

2m11.2822.11

Université de Montréal

Étude de la structure des ARNm et des protéines
impliqués dans les maladies neurodégénératives à prion

par

Isabelle H. Barrette

Département de Biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biochimie

Août, 2000

© Isabelle H. Barrette, 2000



W
4
U58
2001
v. 005

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la structure des ARNm et des protéines
impliqués dans les maladies neurodégénératives à prion

présenté par :

Isabelle H. Barrette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sergei Chteinberg	Président du jury
Dr. François Major	Directeur de recherche
Dr. Stephen Michnick	Codirecteur de recherche
Dr. Sylvie Mader	Membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) sont des maladies neurodégénératives fatales qui affectent la population humaine ainsi qu'une variété d'animaux. Dans les années 1980s, Stanley B. Prusiner a découvert que les ESTs sont causées par une protéine endogène nommée prion qui a la capacité d'adopter deux conformations différentes stables dont une pathogénique.

Les ESTs humaines peuvent être de nature spontanée, familiale et infectieuse. Un exemple récent d'une EST infectieuse est la nouvelle forme de la maladie Creutzfeldt-Jakob transmise des bovins à la population humaine par la consommation de viandes contaminées. Cette maladie fait les manchettes depuis le début des années 1990s en Europe et 50 cas ont maintenant été diagnostiqués. Malheureusement, la cause du changement conformationnel qui est à la source des ESTs n'est pas connue. La protéine prion, dans sa forme native, consiste de trois hélices alpha et d'un petit feuillet bêta anti-parallèle. Ces éléments de structure secondaire se retrouvent tous dans le domaine globulaire carboxy-terminal de la protéine. Le domaine N-terminal de la protéine est non-structuré et contient cinq copies d'une répétition d'un octapeptide. Après la conversion, le montant d'hélice alpha chute et le montant de feuillet bêta augmente dramatiquement.

Des mutations dans le gène du prion ont été reliées aux ESTs familiales. Toutefois, aucune des mutations dans le domaine carboxy-terminal de la protéine ne déstabilise de manière significative la structure tridimensionnelle du prion. Étrangement, lorsque le nombre d'octapeptides est augmenté dans le domaine N-terminal non-structuré, le changement conformationnel se fait plus vite. Se tournant vers l'ARN, P.R. Wills a rapporté la présence d'un pseudonoeud dans la région de l'ARNm codant pour les répétitions en 1992. En se basant sur les résultats de ce chercheur, ce pseudonoeud a été

retrouvé dans toutes les séquences d'ARNm de prions contenues dans GenBank ainsi que dans les séquences des prions de levures Rnq1 et Sup35p à l'aide de RNAMOT. Les seules espèces où ce pseudonoeud n'a pas pu être retrouvé sont la tortue et les oiseaux, qui ont une protéine prion extrêmement différente des autres espèces. Ce pseudonoeud, lorsque présent en grande quantité tel que dans les ESTs familiales, pourrait interférer avec la traduction de la protéine et intervenir dans le repliement. Ce rôle potentiel est bien illustré par la structure du pseudonoeud, modélisé à l'aide de MC-SYM. Le pseudonoeud contient le motif CUGGG ainsi qu'un G-U, qui sont impliqués dans les interactions protéiques et pourrait facilement être une cible d'oligonucléotides thérapeutiques.

Une autre manière de prévenir les ESTs serait d'empêcher les interactions protéiques importantes dans le changement conformationnel. Un endroit important pour l'inhibition d'interactions protéiques serait dans la région hydrophobe conservée qui comprend les résidus 106-126 (PrP106-126). À l'aide de simulations dynamiques, il a été possible d'étudier les interactions inter-moléculaires importantes pour l'agrégation de ce peptide à pH 5 et 7 en forme dimérique. Les simulations dynamiques rapportées ici sont les premières faites sur la forme dimérique de PrP106-126. L'His-111, le seul acide aminé qui devient protoné à pH 5, semble jouer un rôle important. À pH 5, des dimères de PrP106-126 se rigidifient et prennent la forme de tiges. Ces tiges pourraient facilement former des canaux transmembranaires. De tels canaux perméables au calcium ont déjà été rapportés et pourraient être responsables de l'apoptose des diverses cellules nerveuses.

Table des matières

	Page
Page d'identification du jury	i
Sommaire	ii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations	viii
Dédicace et remerciements	xi
Chapitre 1 : Les maladies à prion, les effets d'une protéine polymorphe	1
1.1 Introduction	1
1.2 Encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs)	3
1.2.1 Encéphalopathies spongiformes transmissibles animales	3
1.2.2 Encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines	3
1.2.2.1 Symptômes	4
1.3 Un second regard sur le prion, cette protéine polymorphe	5
1.3.1 Expression et propriétés physicochimiques du prion	6
1.3.2 Structure tridimensionnelle de PrP ^c	7
1.3.3 Conversion de PrP ^c en PrP ^{Sc}	9
1.3.3.1 Effet des membranes sur la production de PrP ^{Sc}	10
1.3.3.2 Effets de mutations familiales sur la production de PrP ^{Sc}	11
1.3.3.3 Rôle de l'ARNm sur la production de PrP ^{Sc}	14
1.3.3.4 Mécanismes de conversion de PrP ^c en PrP ^{Sc}	15
1.3.3.5 Les différentes souches de prion	18
1.3.3.6 La barrière des espèces	19
1.4 Des prions dans les levures?	20
1.5 La protéine jumelle du prion, Doppel (Dpl)	22
1.6 Un lien entre les ESTs et l'Alzheimer?	25
1.7 Thérapeutiques pour les maladies à prion	25
1.8 Références	27
Chapitre 2 : Pseudoknots in prion protein mRNAs confirmed by comparative sequence analysis	39
Abstract	39
Introduction	40
Materials and Methods	42
Results	45
Discussion	46
Acknowledgements	49
References	49
Chapitre 3 : Dynamique moléculaire du fragment 106 à 126 de la protéine prion : implications pour son activité neurotoxique	58
3.1 Introduction	58
3.1.1 Propriétés physicochimiques et pathogéniques	58

	de PrP106-126	58
3.1.2	Structure tridimensionnelle de PrP106-126	63
3.1.3	Peut-on simuler l'agrégation de PrP106-126?	64
3.2	Méthodes	65
3.2.1	Construction des modèles de PrP106-126	65
3.2.2	Dynamique moléculaire des fragments PrP106-126	66
	3.2.2.1 Généralités sur les dynamiques moléculaires	66
	3.2.2.2 Solvants explicites et implicites	67
	3.2.2.3 Application de la dynamique de Langevin au PrP106-126	69
	3.2.2.4 Analyse des trajectoires	71
3.3	Résultats et Discussion	72
3.3.1	Effet du pH sur les interactions inter-monomères dans la forme dimérique de PrP106-126	74
3.3.2	Effet de substitutions hydrophiles sur les interactions inter-monomères dans la forme dimérique de PrP106-126	84
3.4	Conclusion	89
3.5	Références	93
Chapitre 4 :	Conclusion	100

Liste des tableaux

	Page
Chapitre 1 :	
Tableau I : Encéphalopathies spongiformes transmissibles animales	3
Tableau II : Changements de conformation observés chez le prion par spectroscopie infrarouge	7
Tableau III : Mutations observées dans le prion par classe de ESTs familiales	12
Chapitre 3 :	
Tableau I : Conformation de PrP106-126 dans différents environnements	61
Tableau II : Effet de la substitution de l'His-111 sur l'agrégation et la conformation de PrP106-126	62
Tableau III : Peptides PrP106-126 utilisés pour les dynamiques moléculaires	66
Tableau IV : Pourcentages des acides aminés dans la structure moyenne des dimères PrP106-126 et PrP106-126 A117V ayant des angles phi-psi appartenant à la conformation de feuillet bêta	77
Tableau V : Liaisons hydrogènes retrouvées dans le dimère PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S à pH 7	88
Tableau VI : Liaisons hydrogènes retrouvées dans le dimère PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S à pH 7	88

Liste des figures

	Page
Chapitre 1 :	
Figure 1 : Structure tridimensionnelle du prion humain illustrant le domaine globulaire carboxy-terminal	8
Figure 2 : Modèle théorique de PrP ^{Sc} proposé par Fred Cohen	10
Figure 3 : Potentiel électrostatique de surface de la protéine prion	11
Figure 4 : Mutations impliquées dans les ESTs familiales et polymorphismes humains	12
Figure 5 : Mécanismes proposés pour expliquer le changement conformationnel de PrP ^c en PrP ^{Sc}	16
Figure 6 : Rôle de Ure2p et Sup35p, les prions des levures	21
Figure 7 : Comparaison de la structure des protéines prion et doppel	24
Chapitre 2 :	
Figure 1 : Prion pseudoknot secondary structure	52
Figure 2 : RNAMOT descriptor based on the pseudoknot found in the human prion mRNA	53
Figure 3 : Graph of relations used to build the three-dimensional model of the human prion mRNA pseudoknot	54
Figure 4 : FFE distribution of the human prion gene	55
Figure 5 : Alignment of the pseudoknot found in all 78 sequences	56
Figure 6: Stereoview of the pseudoknot three-dimensional model of lowest energy	57
Chapitre 3 :	
Figure 1 : Séquence d'acides aminés du fragment PrP106-126	60
Figure 2 : Variations des énergies libres des différents dimères	74
Figure 3 : Superposition des structures obtenues à toutes les 100 ps des simulations	76
Figure 4 : Rayon de giration en angstrom pour chaque dimère au cours des simulations	77
Figure 5 : Fluctuations atomiques calculées à l'aide de la structure moyenne de chaque dimère obtenue au cours de la dernière 0.5 ns	79
Figure 6 : Données de corrélation entre les déplacements d'atomes mesurés au cours des simulations	80
Figure 7 : Structure moyenne de PrP106-126	82
Figure 8 : Structure moyenne de PrP106-126 A117V	83
Figure 9 : Structure moyenne de PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S à pH 7	87
Figure 10 : Structure moyenne de PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S à pH 7	87
Figure 11 : Organisation possible d'un canal transmembranaire PrP106-126	91

Liste des sigles et abréviations

Sigle ou abréviation	Définition
A117V	Substitution d'une alanine par une valine à la position 117
AFFE	Average folding free energies
ARNm	Acides ribonucléiques messagers
Asp-181	Acide aspartique à la position 181
Asp-197	Acide aspartique à la position 197
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease
D178N	Substitution de l'acide aspartique par une asparagine à la position 178
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dpl	Doppel
E200K	Substitution de l'acide glutamique par une lysine à la position 200
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
ESF	Encéphalopathie spongiforme féline
ESTs	Encéphalopathies spongiformes transmissibles
F198S	Substitution d'une phénylalanine par une sérine à la position 198
FFE	Folding free energies
GPI	Ancre glycosylphosphatidyl inositol
GSS	Syndrôme de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IFF	Insomnie fatale familiale
M232R	Substitution d'une méthionine par une arginine à la position 232

MCI	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MDC	Maladie de dépérissement chronique
mRNA	Messenger ribonucleic acids
nfMCI	Nouvelle forme de la maladie Creutzfeldt-Jakob
nt	Nucléotide
P102L	Substitution d'une proline par une leucine à la position 102
P105 L	Substitution d'une proline par une leucine à la position 105
Pks	Pseudoknots
PrP106-126	Région du prion des résidus 106 à 126
PrP ^c	Prion en forme native
PrP ^{Sc}	Prion « scrapie » ou prion en forme pathogénique
Q217R	Substitution d'une glutamine par une arginine à la position 217
R208H	Substitution d'une arginine par une histidine à la position 208
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNA	Ribonucleic acid
Ser-231	Sérine à la position 231
SPF	Strutural pattern finder
T183A	Substitution d'une thréonine par une alanine à la position 183
V180I	Substitution d'une valine par une isoleucine à la position 180
V210I	Substitution d'une valine par une isoleucine à la position 210

Y145STOP

Fin de la traduction au codon 145

Dédicace et remerciements

J'aimerais dédié cet ouvrage à mes parents, Louise et André Barrette, qui ont toujours été une source incroyable d'encouragement. Je veux aussi les remercier pour toute l'aide qu'ils m'ont offerte au cours des dernières années. J'aimerais aussi remercier Guylaine Poisson pour son aide et son encouragement qui ont été essentiels à ce travail. J'aimerais également remercier Laurent David et Dr. Stephen Michnick pour toute leur aide et leurs précieux conseils. Un autre remerciement à Nancy Bourassa et Julie Allard pour toute leur aide dans l'impression du document. Finalement, j'aimerais également beaucoup remercier Dr. François Major, mon directeur de recherche, pour son aide et ses conseils et aussi pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis d'effectuer ces recherches.

Chapitre 1:

Les maladies à prion, les effets d'une protéine polymorphe

1.1 Introduction

Au cours des années 1990s, un vent de panique soufflait sur l'Europe : la crise de la vache folle faisait son apparition. Aussi connue sous le nom d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), cette maladie neurodégénérative est responsable de la mort de plus de 175 000 bovins au cours de la dernière décennie (1). Cette maladie peu connue venait de faire les manchettes. Plus alarmant encore est le fait que l'ESB a maintenant fait le saut des bovins à la population humaine, projetant cette encéphalopathie au rang des maladies infectieuses. En effet, plusieurs données pointent vers un lien entre l'ESB et une nouvelle forme de la maladie Creutzfeldt-Jakob (n^fMCJ) (2-6), une encéphalopathie spongiforme humaine. Jusqu'à maintenant, approximativement 50 cas de la n^fMCJ ont été signalés chez des adolescents et des jeunes adultes (2-5).

L'ESB et la n^fMCJ sont causées par une protéine endogène nommée prion ayant la capacité d'adopter deux conformations différentes stables, dont une étant pathogénique et responsable des maladies à prion. L'hypothèse que les maladies à prion sont dues à un changement conformationnel de la protéine prion a été proposée pour la première fois en 1967 par J.S. Griffith (7). Ce n'est qu'en 1982 que Stanley B. Prusiner identifiait la protéine prion comme la cause des maladies à prion, aussi connues sous le nom d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) (8, 9) . Prusiner a ensuite gagné le prix Nobel en médecine en 1997 pour ses efforts.

Les ESTs sont des maladies fatales neurodégénératives qui affectent les populations humaines et animales. Malheureusement, la nature de ces maladies demeure obscure. La structure de la forme pathogénique du prion n'est pas encore connue et un prion infectieux n'a pu être généré en laboratoire jusqu'à présent (10, 11).

Ici, un survol des données accumulées dans la littérature sur les prions et les ESTs est présenté. Les différentes ESTs documentées jusqu'à présent sont décrites et les mécanismes proposés pour expliquer la conversion de la protéine prion en sa forme pathogénique sont discutés. Parmi ces mécanismes, le rôle de l'ARNm dans le changement conformationnel du prion sera introduit. Cet aspect a été largement ignoré par la communauté scientifique dans le passé et fait l'objet du deuxième chapitre de ce mémoire qui compte un article soumis au journal *Nucleic Acids Research*. Le rôle des différentes sections de la structure du prion dans le changement conformationnel sera également étudié. Par exemple, l'importance du fragment neurotoxique comprenant les résidus 106-126 du prion est discuté. Le comportement de ce fragment dans divers environnements a été étudié par simulations dynamiques et celles-ci sont décrites dans le troisième chapitre de ce mémoire. En plus général, les prions dans les levures et la protéine doppel (Dpl), qui ont été récemment découverts, sont discutés. De plus, les maladies à prion sont comparées à la maladie d'Alzheimer qui serait aussi causée par le changement conformationnel d'une protéine. Finalement, un regard est tourné sur les thérapies possibles pour ces maladies neurodégénératives.

1.2 Encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs)

1.2.1 Encéphalopathies spongiformes transmissibles animales

Chez les animaux, l'EST la plus célèbre est certainement l'ESB qui serait due à la consommation, par les bovins, de farines de viande et d'os provenant de moutons ayant la tremblante (12). La tremblante du mouton a été la première EST animale reconnue et a été transmise expérimentalement en 1936 (13). Depuis, plusieurs ESTs animales ont été identifiées, dont la maladie de dépérissement chronique chez les chevreuils et les orignaux, qui se transmettent horizontalement et verticalement (14). Les autres ESTs animales connues jusqu'à maintenant sont résumées dans le Tableau I.

Tableau I : Encéphalopathies spongiformes transmissibles animales. Adapté de (15).

Encéphalopathie	Hôte	Source d'infection
Tremblante	Moutons, mouflons, chèvres	Infection avec prions
Encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)	Bovins	Consommation de farines de viande et d'os contaminées
Encéphalopathie transmissible du vison	Vison	Infection avec des prions de moutons ou de bovins
Maladie de dépérissement chronique (MDC)	Chevreuils, orignaux, wapiti, et cerf-mulet des Rocheuses	Inconnue
Encéphalopathie spongiforme féline (ESF)	Chats	Consommation de bœuf contaminé
Encéphalopathie d'ongulés exotiques	Greater kudu, nyala, elan du Cap, et oryx d'Arabie	Consommation de farines de viande et d'os contaminées

1.2.2 Encéphalopathies spongiformes humaines

Les ESTs humaines ont été décrites pour la première fois au début des années 1920s par Creutzfeldt et Jakob (16) En 1936, les chercheurs Gerstmann, Sträussler et Scheinker décrivent les symptômes et la neuropathologie d'une ataxie familiale

neurodégénérative rare associée avec la présence de plaques amyloïdes dans le cervelet (16). Quelques années plus tard, en 1957, Gajdusek et Zigas décrivent le Kuru, une maladie neurodégénérative infectieuse qui affecte majoritairement les femmes et les enfants des Fores, une tribu du district Okapa en Papouasie Nouvelle-Guinée (17). La source du Kuru a été retracée plus tard au cannibalisme pratiqué lors de rites funéraires.

Toutes ces neuropathologies sont regroupées dans la classe des ESTs humaines, qui est sous-divisée en trois catégories : les ESTs infectieuses, les ESTs familiales et les ESTs sporadiques. Les ESTs infectieuses et sporadiques sont connues sous le nom plus général de maladie Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et sont responsables d'environ 85% de tous les cas observés (14). Les ESTs infectieuses comprennent le Kuru, la MCJ iatrogène et la nouvelle forme de la MCJ. La MCJ iatrogène a été retracée à des contaminations neurochirurgicales, des greffes de cornée ou de dure-mère, et à l'utilisation thérapeutique de dérivés hypophysaires d'origine humaine (e.g., hormone de croissance et gonadotropes). La nouvelle forme de MCJ est liée à l'ESB et se démarque des autres ESTs par le jeune âge auquel les symptômes apparaissent (14). Les ESTs sporadiques sont souvent associées à des mutations somatiques dans le gène du prion ou à une conversion conformationnelle spontanée de la protéine prion. Les ESTs familiales comprennent la maladie Creutzfeldt-Jakob familiale (fMCJ), le syndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), et l'insomnie fatale familiale (IFF). Ces ESTs sont toutes associées à des mutations dans le gène du prion, qui seront discutées plus tard.

1.2.2.1 Symptômes

Quelle que soit l'étiologie de l'EST, les victimes de ces maladies neurodégénératives démontrent toutes une accumulation de la forme pathogénique du

prion dans le système nerveux central ainsi que dans les tissus lymphoréticulaires (14). Malheureusement, une grande variété de symptômes est associée aux maladies à prion, ce qui les rend difficiles à diagnostiquer. Les symptômes incluent des troubles nerveux d'ordre cognitif et locomoteur et de l'ataxie locomotrice, soit la perte progressive de la coordination des mouvements volontaires(18). Ils sont tous des réflexions de lésions neurologiques telles que des changements spongiformes, des pertes neuronales et de la gliose, particulièrement dans l'hippocampe et le cervelet (18). On observe également de la vacuolisation de la matière grise et des neurones et l'activation des astrocytes et des cellules microgliales (14).

1.3 Un second regard sur le prion, cette protéine polymorphe

Plusieurs études ont maintenant établi un lien fort entre la forme pathogénique de la protéine prion (PrP^{Sc}) et les ESTs. PrP^{Sc} est détecté seulement dans les cellules où il y a infection (19-21) et des plaques amyloïdes formées de PrP^{Sc} sont retrouvées dans certains cas d'ESTs (22, 23). Aussi, lorsque le gène du prion est surexprimé, la vitesse de formation de PrP^{Sc} augmente, diminuant donc le temps d'incubation (24). De plus, le linkage génétique entre les diverses mutations retrouvées dans la protéine et les ESTs familiales appuie l'hypothèse que ces maladies sont dues à un changement conformationnel chez la protéine prion.

Malheureusement, le mécanisme par lequel le prion en sa forme pathogénique cause les ESTs est encore obscur. Il serait tentant de simplement expliquer les symptômes observés par la présence de plaques amyloïdes qui résultent de l'agrégation de PrP^{Sc} . Toutefois, dans plusieurs cas, aucune plaque amyloïde ou des plaques amyloïdes en très faible concentration sont retrouvées même en stade final de la maladie

(25). Plusieurs données semblent maintenant indiquer que les astrocytes pourraient jouer un rôle dans la pathogénie puisque ces cellules peuvent supporter l'amplification des prions en exprimant le gène, une condition pour le développement de la maladie (26). Les cellules microgliales ont également été impliquées dans les effets pathogéniques du prion (27). Ces cellules joueraient aussi un rôle dans les maladies comme l'Alzheimer et la sclérose en plaque (14). De plus, certaines données indiquent que les cellules B différenciées pourraient jouer un rôle important dans la propagation des ESTs en transportant les prions des tissus lymphatiques aux tissus nerveux (28). La protéine prion a également été retrouvée aux jonctions neuromusculaires (29).

1.3.1 Expression et propriétés physicochimiques du prion

Le gène du prion se retrouve sur le chromosome 20 (p12-pter) (30, 31) et comprend deux exons chez l'humain et trois chez les bovins (32, 33). Toutefois, seulement le deuxième exon chez l'humain et le troisième exon chez le bovin encodent le prion, qui est une protéine de 253 acides aminés. À la suite de la traduction, les premiers 22 acides aminés sont clivés de l'extrémité amino-terminale et 23 acides aminés sont clivés de l'extrémité carboxy-terminale (34). De plus, les résidus Asp-181 et Asp-197 sont glycosylés et une ancre glycosylphosphatidyl inositol (GPI) est ajoutée à la Ser-231 à l'extrémité carboxy-terminale (34, 35). Cette ancre GPI est soupçonnée d'être important pour le changement conformationnel de la protéine (36).

Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives, aucune différence autre que conformationnelle n'a été identifiée entre la forme native du prion (PrP^c) et sa forme pathogénique (PrP^{Sc}) (37). Des données de spectroscopie infrarouge indiquent que le changement conformationnel du prion entraîne une diminution dans le montant d'hélice

alpha dans la forme native et une augmentation du montant de feuillet bêta dans la forme pathogénique du prion (38), tel que décrit dans le Tableau II.

Tableau II : Changements de conformation observés chez le prion par spectroscopie infrarouge (38).

Structure secondaire	PrP ^c	PrP ^{Sc}
Hélice alpha (%)	42%	30%
Feuillet bêta (%)	3%	43%

Le changement conformationnel observé chez le prion est également accompagné de changements dans ses propriétés physicochimiques. PrP^c est monomérique, soluble dans les détergents et sensible à la digestion par diverses protéases telles que la protéase K tandis que PrP^{Sc} est insoluble, majoritairement multimérique et insensible à la digestion par les protéases (38).

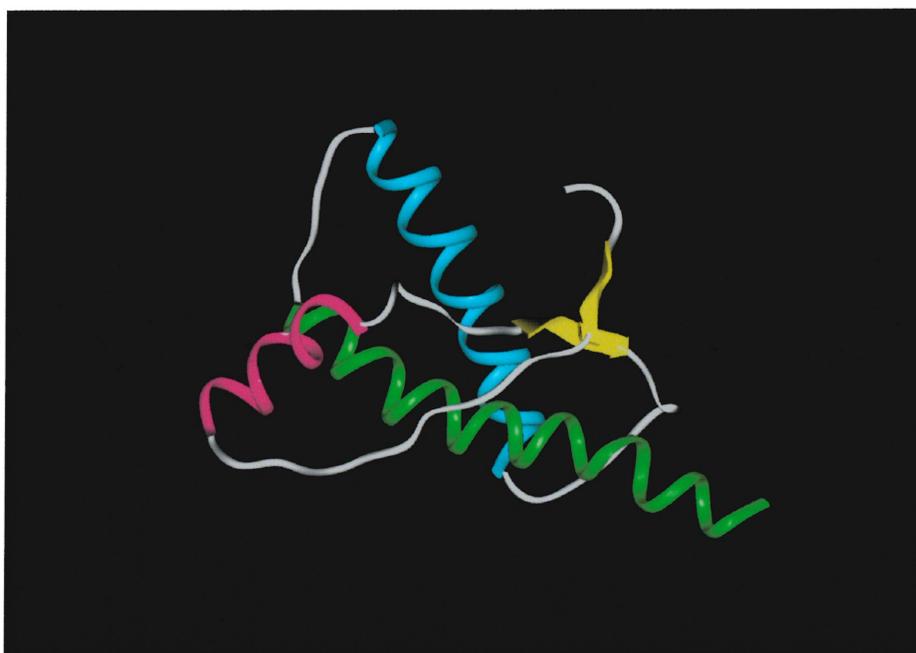
1.3.2 Structure tridimensionnelle de PrP^c

En 1996, l'équipe de Wütrich a publié la structure tridimensionnelle du prion de la souris à partir de résonances magnétiques nucléaires (39). Peu après, en 1997, l'équipe de Dyson a décrit la structure tridimensionnelle du prion du hamster syrien (40). Les mêmes résultats ont été obtenus en 1999 par l'équipe de James (41). Ce ne fut qu'en janvier dernier que l'équipe de Wütrich a décrit la structure tridimensionnelle du prion humain (42), telle qu'illustrée dans la Figure 1.

La structure comprend deux domaines : un domaine amino-terminal flexible et non-résoluble par RMN, et un domaine globulaire carboxy-terminal qui comprend trois hélices alpha allant des résidus 144 à 154, 173 à 194 et 200 à 228. Ce domaine comprend également un petit feuillet bêta anti-parallèle qui comprend les résidus 128 à 131 et 161 à 164. Seulement le domaine globulaire carboxy-terminal est illustré dans la Figure 1. Un pont disulfure est aussi présent entre les résidus Cys-179 et Cys-214. La structure du

prion humain est très similaire à celle du hamster syrien et de la souris (42). Seulement la boucle comprenant les résidus 167 à 171, les résidus 187 à 194 à l'extrémité de la deuxième hélice et les résidus 219 à 228 à l'extrémité carboxy-terminale de la troisième hélice démontrent plus de désordre que les résidus équivalents dans les prions du hamster syrien et de la souris (42).

Figure 1 : Structure tridimensionnelle du prion humain illustrant le domaine globulaire carboxy-terminal. Le feuillet bêta anti-parallèle est coloré en jaune, tandis que les hélices 1, 2 et 3 sont colorés en fuchsia, bleu et vert, respectivement. La figure a été produite avec InsightII (43).



Étrangement, la séquence du prion semble être la plus conservée dans les régions non-structurées de la protéine (44). En effet, les régions comprenant les résidus 113 à 137 et 187 à 202, qui sont deux régions flexibles sont les plus conservées. Il est donc possible que ces régions flexibles soient importantes pour le changement conformationnel du prion. Il est intéressant de noter que la première région flexible comprend les résidus 106 à 126 qui sont mieux connus sous le nom de fragment neurotoxique ou PrP106-126. Cette région est extrêmement bien conservée et est retrouvée chez le poulet où moins de

30% d'identité dans la séquence est observé (45, 46). Ce fragment a aussi été identifié dans le prion retrouvé chez la tortue (47). Beaucoup d'études se sont penchées sur l'importance de ce peptide dans la conversion du prion. Étrangement, lorsque PrP106-126 est éliminé du prion, le changement conformationnel de la protéine est inhibé (48). De plus, ce fragment a été impliqué dans la formation de formes transmembranaires pathogéniques du prion dans le réticulum endoplasmique (49). PrP106-126 possède plusieurs des propriétés physicochimiques et pathogéniques de la forme maligne du prion (PrP^{Sc}) incluant la capacité d'adopter deux conformations différentes à différents pH et dans différents environnements, décrits en détail dans le tableau I du Chapitre 3 (p.61). Ces observations ont amené plusieurs équipes à suggérer que ce peptide pourrait être utilisé pour étudier en détails le mécanisme neurotoxique de PrP^{Sc} (50-55). Il a même été suggéré que PrP106-126 pourrait former des canaux transmembranaires perméables au calcium (56, 57). Dans le deuxième chapitre de ce mémoire, les résultats de simulations dynamiques sur le fragment PrP106-126 sont présentés. Ces résultats appuient les données expérimentales obtenues sur ce fragment et ont permis l'étude des interactions importantes aux propriétés structurales et physicochimiques de PrP106-126.

1.3.3 Conversion de PrP^c en PrP^{Sc}

Dû aux propriétés physicochimiques du prion en forme pathogénique, la structure tridimensionnelle de PrP^{Sc} demeure inconnue. En 1996, l'équipe de Fred Cohen a proposé un modèle théorique de la structure de PrP^{Sc} (58). Toutefois, ce modèle est basé sur l'hypothèse maintenant fautive que PrP^c est un faisceau d'hélices (59). À partir du modèle de faisceau d'hélices, cette équipe suggère que deux des quatre hélices se

transforment en feuillet bêta lors du changement conformationnel, afin de respecter les données de spectroscopie infrarouge. Leur modèle théorique est illustré dans la Figure 2.

Figure 2 : Modèle théorique de PrP^{Sc} proposé par l'équipe de Fred Cohen (58). Quelques mutations associées aux ESTs familiales sont aussi illustrées.



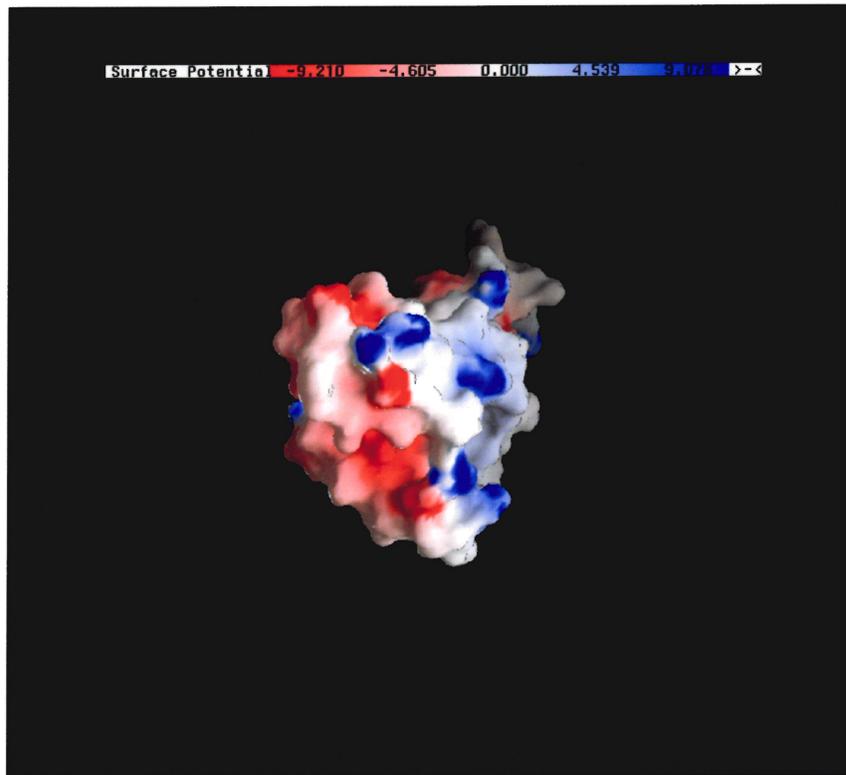
L'événement déclencheur du changement conformationnel du prion demeure inconnu. Comment une protéine peut-elle adopter deux conformations différentes, où les deux formes sont presque aussi stables l'une que l'autre (60)?

1.3.3.1 Effet des membranes sur la production de PrP^{Sc}

Les membranes bilipidiques semblent jouer un rôle dans le changement conformationnel du prion. Comme mentionné plus haut, lorsque l'ancre GPI est éliminée, le changement conformationnel du prion est compromis (36). Ainsi, lorsque les interactions avec les membranes sont diminuées, la production de PrP^{Sc} est affectée. Il a été démontré que le prion peut interagir avec des membranes et que cette interaction devient forte sous conditions acidiqes (61). Lorsque le prion interagit avec les membranes, le domaine amino-terminal de la protéine devient structuré et le domaine globulaire carboxy-terminal est déstabilisé, spécialement sous conditions acidiqes (61). L'interaction du prion avec les membranes pourrait s'effectuer par la face chargée

positivement qui comprend la première hélice du prion (62). Le prion a, en fait, deux faces chargées, dont une chargée positivement et l'autre négativement, tel qu'illustré dans la Figure 3. La face chargée négativement pourrait vraisemblablement interagir avec une autre protéine telle qu'un autre prion.

Figure 3 : Potentiel électrostatique de surface de la protéine prion. La surface chargée positivement est illustrée en bleu, tandis que la surface chargée négativement est illustrée en rouge. Image construite avec GRASP (63).



1.3.3.2 Effets de mutations familiales sur la production de PrP^{Sc}

Plusieurs études se sont penchées sur les diverses mutations observées dans les ESTs familiales afin de tenter de d'expliquer le changement conformationel. Les mutations décrites jusqu'à présent sont identifiées dans la Figure 4 et répertoriées par maladie dans le Tableau III.

Figure 4 : Mutations impliquées dans les ESTs familiales et polymorphismes humains. Adapté de (24).

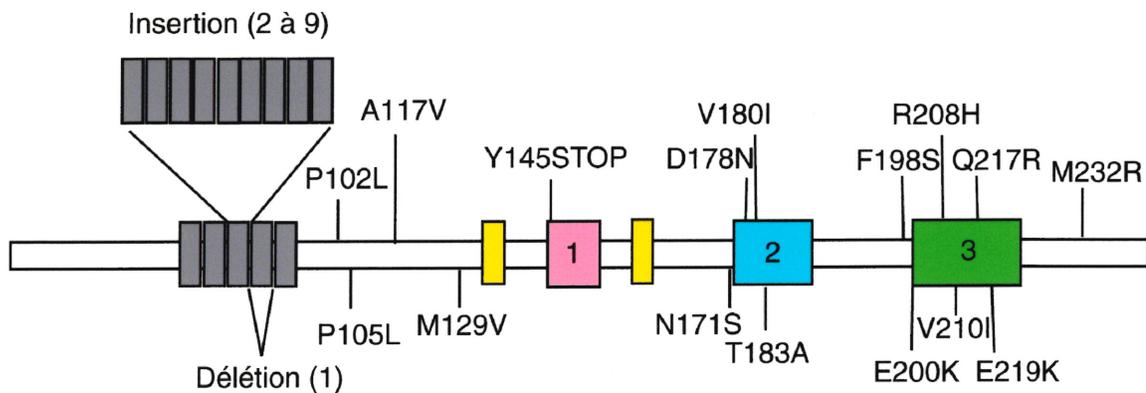


Tableau III : Mutations observées dans le prion par classe de ESTs familiales. Adapté de (16).

EST familiale	Mutation(s)
MCJ	D178N:129V, V180I, T183A, E200K, R208H, V210I, M232R, insertion de copies additionnelles de la répétition de l'octapeptide dans le gène (24 bases, 48 bases, 96 bases, 120 bases, 144 bases, 168 bases, 192 bases, et 216 bases)
GSS	P102L, P105L, A117V, Y145STOP, F198S, Q217R
IFF	D178N:129M

La majorité des mutations impliquées dans les ESTs familiales sont des substitutions simples et certaines consistent en une insertion d'une répétition d'un octapeptide. Il y a aussi un polymorphisme à la position 129 où une méthionine ou une valine est présente. Ce polymorphisme est important dans la détermination du type de maladie héréditaire. En effet, lorsque la mutation D178N est combinée à 129M, l'insomnie fatale familiale résulte tandis que lorsque D178N est combinée à 129V, la maladie Creutzfeldt-Jakob est observée. De plus, certaines données indiquent que ce

polymorphisme pourrait affecter la susceptibilité des individus à la nouvelle forme de MCJ (60). Par contre, le mécanisme par lequel ce polymorphisme agit demeure inconnu.

Tel qu'illustré dans la Figure 4, la majorité des substitutions se retrouvent dans la troisième hélice du domaine globulaire du prion. Malheureusement, les études de l'effet de ces substitutions sur la structure du prion et le changement conformationnel ont été décevantes. La majorité des études thermodynamiques et structurales ont révélé que les substitutions ne semblent pas exercer un changement significatif sur la structure tertiaire et les propriétés physicochimiques du prion (64, 65). Conséquemment, les substitutions ne semblent pas être suffisantes pour déstabiliser la structure du prion et causer le changement conformationnel. Un autre facteur serait donc nécessaire pour que ce changement s'effectue.

L'autre classe de mutations, les insertions d'octapeptides, se retrouvent dans le domaine N-terminal flexible non-structuré. Il est intéressant de noter que seulement les insertions d'octapeptides sont impliqués avec la maladie Creutzfeldt-Jakob familiale (66-69). La délétion d'un octapeptide n'a pas été impliquée avec la MCJ familiale et est plutôt considérée comme un polymorphisme neutre. Plusieurs auteurs ont suggéré que la protéine prion pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie du cuivre dans le corps et que les octapeptides pourraient se lier aux atomes de cuivre (70-73). Un rôle dans l'homéostasie du cuivre est la première fonction proposée pour le prion. En effet, la fonction de cette protéine, quoique très conservée, n'est pas connue. Ainsi, plusieurs ont tenté d'expliquer le lien entre la présence d'octapeptides supplémentaires et la MCJ familiale en citant des problèmes d'homéostasie du cuivre. Toutefois, ces hypothèses ont été remises en question récemment avec la publication de résultats indiquant que le prion ne serait pas

impliqué dans l'homéostasie du cuivre (74). Le même montant de cuivre a été mesuré chez des souris exprimant zéro, une fois et dix fois le montant normal de la protéine prion. Ainsi, une réévaluation du rôle de la protéine prion dans l'homéostasie du cuivre est nécessaire.

1.3.3.3 Rôle de l'ARNm sur la production de PrP^{Sc}

Le lien entre les insertions d'octapeptide et la MCJ familiale est également extrêmement intéressant du point de vue de l'ARNm. Très peu de recherches se sont effectuées sur le rôle de l'ARNm du prion et la traduction dans le changement conformationnel de la protéine. En 1992, P.R. Wills a proposé que la région de l'ARNm qui code pour les octapeptides peut se replier et former un pseudonoeud (75). Cette séquence d'ARNm peut également interagir avec la protéine Tat du VIH et d'autres protéines telle que la gallectin-3 (76). En particulier, la boucle majeure du pseudonoeud contient le motif de séquence CUGGG qui est également contenu dans la boucle de l'ARN TAR. Étrangement, dans les stades finaux du VIH, des symptômes approchant ceux des encéphalopathies spongiformes transmissibles sont observés (77). En 1996, l'équipe de Riesner rapporte que l'ARNm du prion dans la région de l'octapeptide se replierait plutôt en tige-boucle (78). Toutefois, cette équipe a utilisé un logiciel incapable de prédire un pseudonoeud, qui est un motif tridimensionnel. Nous avons repris le pseudonoeud de Wills et l'avons retrouvé à l'aide du logiciel RNAMOT (79) dans toutes les séquences d'ARNm de prions contenues dans GenBank, incluant celles des prions des levures, qui seront décrites plus tard. Ces résultats sont décrits dans le deuxième chapitre de ce mémoire, dans un article soumis au journal *Nucleic Acids Research*. Les pseudonoeuds pourraient possiblement influencer le repliement de la protéine et

favoriser, dans le cas d'insertions, la conformation pathogénique du prion chez les victimes de la MCJ familiale. La production du premier prion en conformation pathogénique pourrait ensuite convertir d'autres prions et causer les ESTs par un des mécanismes décrits ci-bas.

1.3.3.4 Mécanismes de conversion de PrP^c en PrP^{Sc}

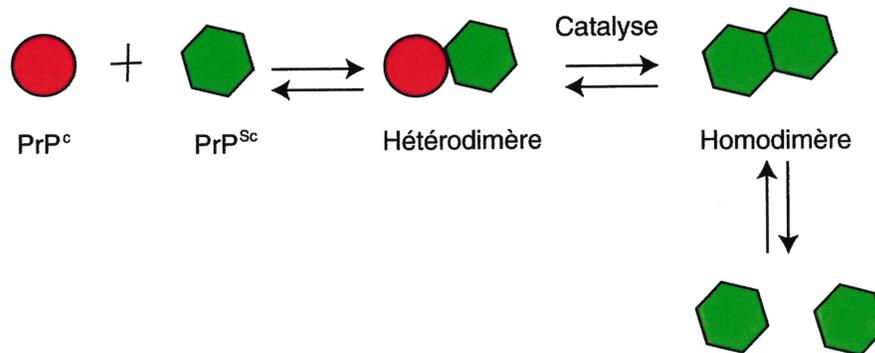
Présentement, deux mécanismes généraux ont été proposés afin d'expliquer la conversion du prion en sa conformation pathogénique lorsque PrP^{Sc} est déjà présent dans l'organisme (14). Ces deux mécanismes sont les suivants : la conversion à partir d'hétérodimères (7, 14, 24) et la conversion à partir de nucléation et de polymérisation auto-catalytique et non-autocatalytique (7, 14, 80-82), tels qu'illustrés dans la Figure 5.

Dans le modèle de conversion par hétérodimères (voir Fig. 5a), PrP^{Sc} garde une forme monomérique et peut se lier à PrP^c pour former un hétérodimère. PrP^{Sc} catalyse ensuite la conversion de PrP^c en sa forme pathogénique (14). Ici, il est assumé que PrP^{Sc} a une plus grande stabilité thermodynamique et que la conversion de PrP^c à PrP^{Sc} est rare si PrP^{Sc} n'est pas présent (14). Ainsi, on peut imaginer que PrP^{Sc} agit comme un modèle qui abaisse la barrière d'activation (ΔG^\ddagger) pour le changement conformationnel (60). La présence de mutations responsables pour les ESTs familiales pourrait également faciliter cette conversion en maximisant des contacts dans l'hétérodimère qui sont essentiels au changement conformationnel (60).

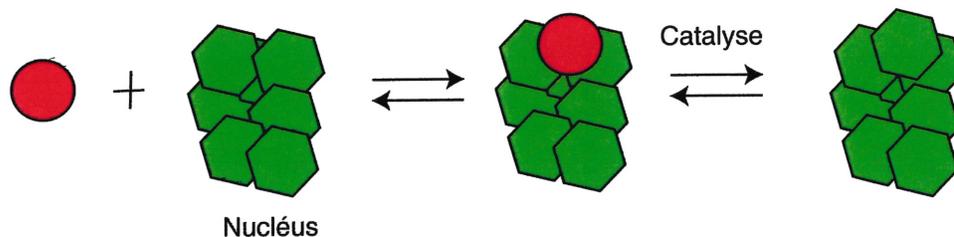
Dans les modèles de conversion par nucléation et polymérisation auto-catalytique et non-catalytique (voir Fig. 5b et 5c), le nucléus ou agrégat de PrP^{Sc} est nécessaire pour stabiliser la conformation pathogénique du prion et encourager son accumulation (14).

Figure 5 : Mécanismes proposés pour expliquer le changement conformationnel de PrP^c en PrP^{Sc} . **(A)** Modèle hétérodimérique; **(B)** Polymérisation par nucléation autocatalytique; **(C)** Polymérisation par nucléation non-catalytique. Adapté de (14).

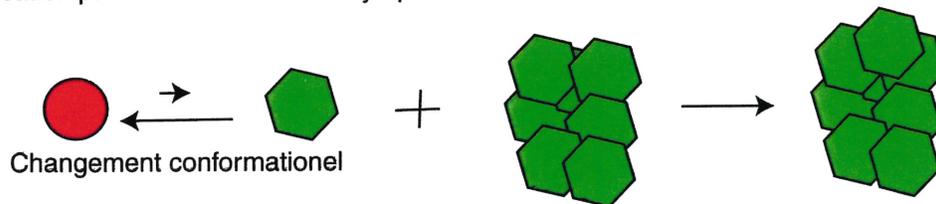
(A) Modèle hétérodimérique



(B) Polymérisation par nucléation autocatalytique



(C) Polymérisation par nucléation non-catalytique



Vu le temps considérable nécessaire pour la formation de ce nucléus, cette étape limite donc la vitesse de réaction (81). Lorsque la conversion se fait par polymérisation autocatalytique (Fig. 5b), le nucléus ou agrégat de PrP^{Sc} se lie à PrP^{c} et catalyse le changement conformationnel tandis que lorsque la conversion se fait par polymérisation non-catalytique, le changement conformationnel de PrP^{c} se fait avant sa liaison avec le nucléus (Fig. 5c).

Des études thermodynamiques et cinétiques sur la conversion de PrP^{c} en PrP^{Sc} ont également révélé que la première étape du changement conformationnel serait la production d'un intermédiaire désigné PrP^* qui a été identifié par spectroscopie (81, 83-86). Récemment, un autre nouveau facteur est entré dans l'équation de la conversion de PrP^{c} en sa forme pathogénique, PrP^{Sc} . En effet, on croit qu'une chaperonne, nommée protéine X, puisque l'on ne connaît pas encore son identité, serait nécessaire pour effectuer le changement conformationnel (87, 88). La substitution des résidus aux positions 214 ou 218 empêche la formation de la forme pathogénique du prion (88). De plus, lorsque les résidus 167 ou 171 sont remplacés par un résidu basique, la formation de PrP^{Sc} est aussi empêchée (88). Il a donc été proposé que les résidus aux positions 167, 171, 214 et 218 forment un épitope sur la surface de la protéine où la protéine X se lie pour participer au changement conformationnel (88). Ainsi, un nouveau mécanisme de conversion peut être formulé. PrP^{c} se lie à la protéine X afin de former le complexe $\text{PrP}^*/\text{protéine X}$ (15). Ensuite, PrP^{Sc} se lie à ce complexe et agit comme modèle afin de transformer PrP^* en PrP^{Sc} (15).

Malheureusement, tous ces mécanismes proposés pour expliquer la conversion de PrP^{c} en PrP^{Sc} ne peuvent toujours pas expliquer la formation du premier PrP^{Sc} . Ceci est

particulièrement intéressant et important pour mieux comprendre les ESTs familiales. C'est pourquoi plus d'attention devrait être portée sur d'autres facteurs, tel que le rôle de l'ARNm décrit plus haut. À noter que la production de prion infectieux *in vitro* n'a pas encore été un succès (11). En 1999, on rapportait la formation d'une molécule non-infectieuse ayant des caractéristiques approchant celles de PrP^{Sc}. Cette molécule avait été obtenue par le clivage du pont disulfure à pH 4 (89). Toutefois, ce pont disulfure est nécessaire pour l'infection et est présent dans PrP^{Sc} (14, 24).

1.3.3.5 Les différentes souches de prion

La présence de souches différentes de prion est un autre facteur qui influence énormément la conversion de PrP^c en PrP^{Sc}. Ces souches demeurent l'argument principal des chercheurs qui insistent que les ESTs seraient plutôt causées par un virus ou une bactérie qu'une protéine endogène comme le prion (90). Les différentes souches de prions ont des propriétés physicochimiques différentes telles que : résistance variée à l'effet des protéases (14, 91-95), insolubilité variée dans des détergents (14, 48, 93), différences dans la structure secondaire (14, 92), différents patrons de glycosylations (5, 14, 96-99), exposition de différents résidus et épitopes aux divers solvants et dénaturants (14, 100), différents résultats de fluorescence ultraviolet multi-spectrale (14, 101), et des différences dans l'ultrastructure du prion (14, 102-104).

Quoique le nombre de différentes souches du prion est controversé (100, 105), tous s'entendent pour dire que les différentes souches de prions et leurs différences physicochimiques sont dues à des différences conformationnelles (92, 106, 107). Ainsi, l'on croit que la souche du prion serait codée dans la structure de la protéine et que ces différences structurales seraient transmises lorsque PrP^{Sc} sert de modèle pour la

conversion de PrP^c. La capacité de ces souches à coder ces différences phénotypes dans la structure de la protéine et à les transmettre à d'autres prions a été bien illustrée avec des études sur des souris transgéniques. Dans l'insomnie fatale familiale, PrP^{Sc}, après déglycosylation, a une masse de 19 kDa tandis qu'il a une masse de 21 kDa dans les autres ESTs familiales (108). Lorsque ces prions différents sont inoculés dans des souris transgéniques exprimant un prion chimère humain-souris, des prions ayant les mêmes caractéristiques que le PrP^{Sc} inoculé sont produits (108). Toutefois, le mécanisme par lequel les souches sont codées et transmises n'est pas connu. Récemment, il a été proposé que les différentes souches pourraient être le résultat de la liaison de divers atomes de métal, tel que le cuivre et le zinc, avec le prion (107).

1.3.3.6 La barrière des espèces

La présence d'une barrière des espèces est un autre facteur important dans l'étude de la conversion de PrP^c en sa forme pathogénique. Cette barrière des espèces a été identifiée en étudiant le temps d'incubation observé lorsque des prions sont passés d'une espèce à une autre (109). À l'aide d'études sur des souris transgéniques, trois facteurs contribuant à la barrière des espèces ont été identifiés : (i) les différences dans les séquences d'acides aminés des prions des espèces; (ii) la souche du prion, telle que décrite plus haut, et (iii) la source de la protéine X (109). Cette barrière des espèces semble plus affecter le changement conformationnel que la liaison entre PrP^c et PrP^{Sc}. En effet, il a récemment été démontré que PrP^{Sc} d'une espèce peut se lier à PrP^c d'une autre espèce sans toutefois induire le changement conformationnel (110). Lorsque des souris exprimant leur prion endogène ainsi que le prion du hamster syrien sont inoculées avec PrP^{Sc} du hamster syrien, seulement des prions en forme pathogénique du hamster sont

produits (111). Lorsque ces mêmes souris sont inoculées avec PrP^{Sc} provenant de la souris, des prions en forme pathogénique de la souris sont produits (111).

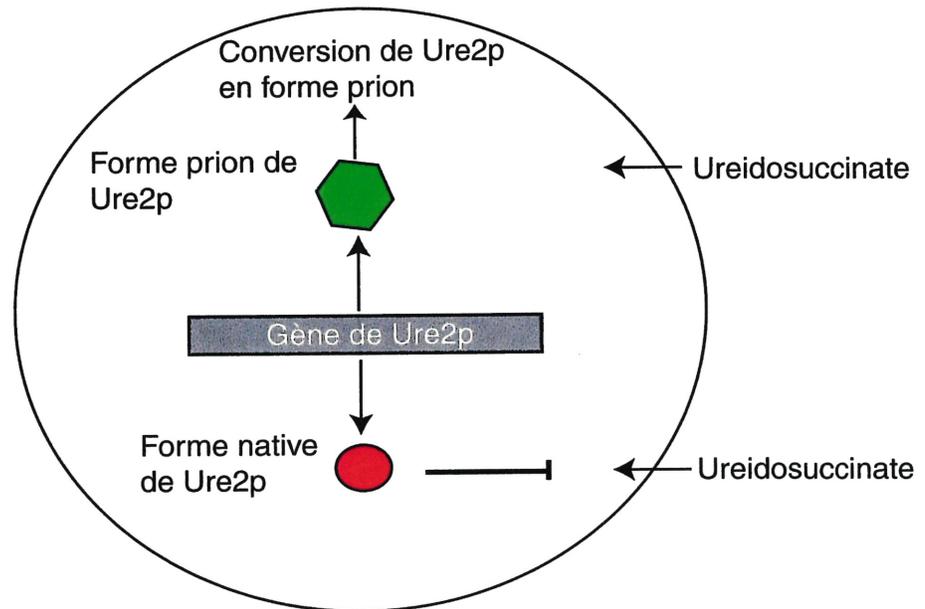
1.4 Des prions dans les levures?

La découverte de prions dans les levures s'est faite largement par accident. En 1971, Lacroute a isolé des mutants de levure étant capables de métaboliser le ureidosuccinate même en présence d'ammoniaque, qui, en temps normal, inhibe l'absorption de ureidosuccinate (112, 113). Lorsque examinées de plus près, il fut noté que ces levures mutantes possédaient cet avantage non pas à cause de la mutation d'un gène mais plutôt d'un autre facteur (114). Ce facteur est la protéine Ure2p, qui comme le prion, a la capacité de changer de conformation. La région comprenant les résidus allant de 1 à 65 est particulièrement importante dans le changement conformationnel (115). Tel qu'illustré dans la Figure 6a, la forme native de la protéine Ure2p peut empêcher l'absorption de ureidosuccinate, tandis que la forme « prion » de la protéine ne peut pas accomplir ce rôle (116).

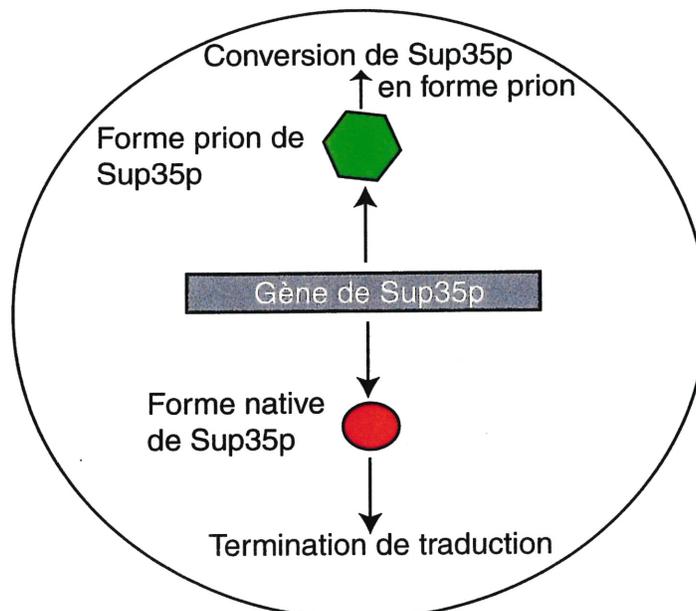
En 1965, le prion [PSI], aussi connu sous le nom de Sup35p, a été découvert par Cox (117). La protéine Sup35p en forme « prion » est incapable de promouvoir la terminaison de la traduction, un rôle qui est accompli par la protéine en sa forme native (voir Fig. 6b). La région comprenant les résidus 1 à 123 est particulièrement importante pour la production de la forme « prion » de Sup35p (118). Sup35p est de loin le prion de la levure qui ressemble le plus aux prions humains et animaux. En effet, on retrouve cinq répétitions de l'oligopeptide PQGGYQQYN, qui est très similaire aux cinq répétitions de l'octapeptide du prion humain et animal, PHGGGWGQ (119). Étrangement, lorsque l'on augmente le nombre de ces répétitions dans les levures ainsi que dans le prion humain et

Figure 6 : Rôle de Ure2p et Sup35p, les prions des levures. **(A)** Fonction de Ure2p. En forme native, Ure2p empêche l'entrée de l'ureidosuccinate. En forme prion, Ure2p est incapable d'empêcher l'entrée de l'ureidosuccinate et catalyse la conversion de d'autres Ure2p en forme prion. **(B)** Fonction de Sup35p. En forme native, Sup35p joue un rôle dans la termination de la traduction. Sup35p est incapable de jouer ce rôle en forme prion et catalyse plutôt le changement conformationnel de d'autres Sup35p. Adapté de (112).

(A)



(B)



animal, le changement conformationnel se produit plus vite ainsi qu'à une plus grande proportion (119, 120). Le pseudonoeud de l'ARNm des prions humains et animaux décrit plus haut est également trouvé dans la région de l'ARNm de Sup35p de la levure (voir Chapitre 2). La conversion de Sup35p dans sa forme prion se déroule aussi sous le contrôle d'une barrière des espèces (121), comme retrouvé chez le prion.

Récemment, un nouveau prion des levures a été identifié, Rnq1 (122). Malheureusement, on ne connaît toujours pas le rôle de cette protéine. Rnq1 a été identifié avec des techniques de bioinformatique, qui incluaient la recherche de protéines contenant un pourcentage élevé d'asparagine et de glutamine dans les banques de données (122). Cette protéine contient un « domaine prion », qui s'étend des résidus 153 à 405 (122) et qui est responsable du changement conformationnel. Lorsque remplacé par le domaine prion de Sup35p, le même changement conformationnel est observé. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque le domaine prion de Sup35p est remplacé par le domaine prion de Rnq1 (122).

L'identification de prions dans les levures est extrêmement intéressante. Il est étrange de voir qu'un mécanisme pouvant être fatal chez certains organismes peut être un avantage chez d'autres. Les levures, grâce aux prions, peuvent acquérir de nouveaux phénotypes qui peuvent devenir un avantage. Le fait que l'on retrouve un pseudonoeud dans les levures qui est similaire à celui retrouvé chez les prions des humains et des animaux suggèrent que ces protéines pourraient être reliées dans l'évolution.

1.5 La protéine jumelle du prion, Doppel (Dpl)

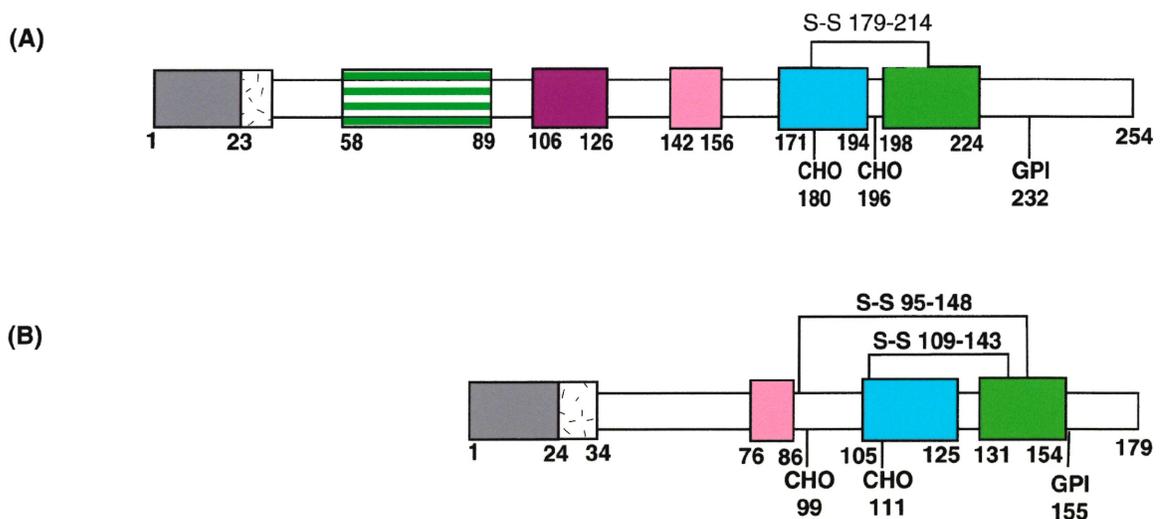
Comme la découverte des prions dans les levures, la découverte de la protéine Doppel (Dpl) s'est également faite par surprise. Beaucoup d'attention a été mise sur la

découverte de la fonction inconnue du prion. Pour ce faire, plusieurs différentes souris transgéniques qui n'avaient pas le gène du prion ont été construites (123-130). Dans les premières souris construites, l'élimination du gène du prion ne semblaient pas avoir d'effets observables (123-125, 128), ce qui était étrange pour une protéine aussi conservée que le prion. Ainsi, d'autres souris transgéniques ne contenant pas le gène du prion ou ne pouvant pas l'exprimer furent construites. Chez certaines de ces souris, on a remarqué une ataxie et des pertes de cellules de Purkinje (126, 127, 130). On a également noté des changements dans l'activité circadienne de ces souris (129). En premier, l'on croyait que ces symptômes pourraient être causés par l'absence du prion. Toutefois, en 1999, l'équipe de David Westaway publie la présence d'une nouvelle protéine, *doppel*, localisée à 16 kb du gène de la protéine prion (126). Dépendamment de la technique utilisée pour éliminer le gène du prion ou empêcher son expression, il y avait surexpression ou non du gène de *doppel* (126, 131).

Le gène de *doppel* code pour une protéine qui contient 179 résidus (126). Comme pour le prion, il y a expression de l'ARNm de *doppel* au cours de l'embryogénèse. Toutefois, il y a peu d'expression de *doppel* dans le système nerveux central (126). La protéine *doppel* possède approximativement 25% d'identité avec toutes les protéines prion connues jusqu'à présent (126). Quoique théorique, l'équipe de Westaway a proposé un modèle de la conformation tridimensionnelle de la protéine, tel qu'illustré dans la Figure 7b. Ils proposent que la protéine comprend trois hélices alpha et deux ponts disulfures (126). Comme le prion, *doppel* aurait également un peptide signal qui serait clivé à l'extrémité amino-terminale. De plus, ils croient avoir identifié deux sites de glycosylation, un au résidu 99 et l'autre au résidu 111. Un site GPI est également

proposé au résidu 155. En contraste avec le prion (comparer Fig. 7a et 7b), doppel ne contient pas la région hydrophobe conservée qui comprend les résidus 106 à 126 et ne contient pas la région des répétitions d'octapeptide. Ces observations ont mené à l'hypothèse que l'apparition de doppel pourrait avoir été causée par une duplication de gène avant que le domaine amino-terminal non-structuré du prion fasse son apparition (126). Une autre hypothèse est que cette protéine soit la mystérieuse protéine X qui agit comme chaperonne dans le changement conformationnel du prion (126). Toutefois, ceci reste à démontrer. Le rôle de doppel dans les ESTs n'est pas clair. Dernièrement, l'équipe de Jean-Louis Laplanche rapportait qu'ils n'avaient pas pu identifier de mutations dans le gène de doppel chez des individus affectés par les ESTs (132). Par contre, ils ont identifié quelques polymorphismes dans le gène. Il restera à voir si ces polymorphismes peuvent jouer un rôle tel que celui du polymorphisme M/V129 chez le prion.

Figure 7 : Comparaison de la structure des protéines prion et doppel. **(A)** Structure secondaire de la protéine prion. Les hélices sont colorées de la façon suivante : l'hélice 1 est en rose, l'hélice 2 en bleu et l'hélice 3 en vert. La région conservée hydrophobe est colorée en mauve tandis les répétitions sont colorés en vert et blanc. Le peptide de signal est en gris et la région contenant des résidus basiques est en pointillé. **(B)** Structure secondaire proposée pour doppel. La coloration est telle que décrite pour le prion. Adapté de (126).



1.6 Un lien entre les ESTs et l'Alzheimer?

Les ESTs sont des maladies fascinantes. Que le changement de conformation d'une protéine qui semble inoffensive dans sa forme native puisse causer de telles maladies est incroyable. Le même genre de symptômes dans les cas d'Alzheimer ont mené plusieurs auteurs à comparer cette maladie avec les maladies à prion (133, 134). Ces deux maladies partagent plusieurs aspects communs. Elles sont des maladies chroniques, progressives et fatales du système nerveux central (133). De plus, les deux maladies peuvent être d'origine familiale (133) et elles sont causées par le changement conformationnel d'une protéine. Dans l'Alzheimer, le changement conformationnel de la protéine amyloïde- β semble être la cause de la maladie. Étrangement, cette protéine peut également adopter différentes conformations dans différents solvants comme pour le prion (134). Les similarités entre ces deux maladies pourraient certainement aider dans la recherche de thérapeutiques. Il est clair que la prévention du changement conformationnel est la clé qui permettra d'empêcher ces maladies fatales.

1.7 Thérapeutiques pour les maladies à prion

Les maladies à prion présentent un dilemme pour les thérapeutiques disponibles présentement. Comment fait-on pour prévenir le changement conformationnel d'une protéine native? Comment faire pour intervenir dans le repliement d'une protéine, qui est, malheureusement, un aspect de la biologie structurale qui demeure ardu? Récemment, l'équipe de Fred Cohen a rapporté un composé étant capable d'inhiber la conversion du prion en sa forme pathogénique (135). Ces recherches marquent le début de notre succès pour vaincre ces maladies. Ce composé, nommé Cp-60, imite l'épitope reconnu par la protéine X (135), la chaperonne essentielle au changement

conformationnel. De plus amples études sont nécessaires et, avec un peu de chance, résulteront en une bonne thérapeutique et des connaissances accrues sur le changement conformationnel à la source de ces maladies. Un autre aspect qui devrait être étudié est la possibilité d'inhiber l'expression de la protéine prion. À noter que l'expression du prion est essentielle à la progression de la maladie. Des antisens pourraient être construits et ciblés à l'ARNm dans la région des répétitions où des structures furent découvertes (voir Chapitre 2). Avec de plus amples études, ces avenues déboucheront certainement sur des thérapeutiques efficaces et sécuritaires.

1.8 Références

1. Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E.J., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R.E., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R., et Wells, G.A. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle, *Nature* **382**, 779-788
2. Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C.I., Blättler, T., Aguzzi, A., et Kopp, N. (1996) New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man, *Lancet* **347**, 1181
3. Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., et Smith, P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK, *Lancet* **347**, 921-925
4. Cousens, S.N., Vynnycky, E., Zeidler, M., Will, R.G., et Smith, P.G. (1997) Predicting the CJD epidemic in humans, *Nature* **385**, 197-198
5. Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., et Hill, A.F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD, *Nature* **383**, 685-690
6. Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.-O.B., Tremblay, P., DeArmond, S.J., et Prusiner, S.B. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15137-15142
7. Griffith, J.S. (1967) Self-replication and scrapie, *Nature* **215**, 1043-1044
8. Bolton, D.C., McKinley, M.P., et Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion, *Science* **218**, 1309-1311
9. Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science* **216**, 136-144
10. Aguzzi, A., et Weissmann, C. (1998) Prion research : the next frontiers, *Nature* **389**, 795-798
11. Aguzzi, A. et Brandner, S. (1999) Shrinking prions : new folds to old questions, *Nat. Med.* **5**, 486-487
12. Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M., Hueston, W.D., et Hoinville, L.J. (1992) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990, *Vet. Rec.* **130**, 90-94

13. Cuille, J., et Chell, P.L. (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?, *C.R. Acad. Sci.* **203**, 1552-1554
14. Horiuchi, M., et Caughey, B. (1999) Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies, *Structure* **7**, R231-R240
15. Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., et Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology, *Cell* **93**, 337-348
16. Ironside, J.W. (1998) Prion diseases in man, *J. Pathol.* **186**, 227-234
17. Gajdusek, D.C., et Zigas, V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: the endemic occurrence of 'kuru' in the native population, *N. Engl. J. Med.* **257**, 974-978
18. Prusiner, S.B., et DeArmond, S.J. (1991) Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans, *Brain Pathol.* **1**, 297-310
19. McKinley, M.P., Bolton, D.C., et Prusiner, S.B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion, *Cell* **35**, 57-62
20. Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D.F., Prusiner, S.B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6617-6621
21. Taraboulos, A., Serban, D., et Prusiner, S.B. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells, *J. Cell Biol.* **110**, 2117-2132
22. Bendheim, P.E., Barry, R.A., DeArmond, S.J., Stites, D.P., Prusiner, S.B. (1984) Antibodies to a scrapie prion protein, *Nature* **310**, 418-421
23. Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R.A., DeArmond, S.J., et Prusiner, S.B. (1986) Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease strain with prion protein antibodies, *Ann. Neurol.* **20**, 204-208
24. Prusiner, S.B. (1998) Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13363-13383
25. Collinge, J., Owen, F., Poulter, M., Leach, M., Crow, T.J., Rossor, M.N., Hardy, J., Mullan, M.J., Janota, I., et Lantos, P.L. (1990) Prion dementia without characteristic pathology, *Lancet* **336**, 7-9
26. Raeber, A.J., Race, R.E., Brandner, S., Priola, S.A., Sailer, A., Bessen, R.A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M.B., Weissmann, C., et Chesebro, B. (1997) Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie, *EMBO J.* **16**, 6057-6065

27. Brown, D.R., Schmidt, B., et Kretzschmar, H.A. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* **380**, 345-347
28. Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A.J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R.M., et Aguzzi, A. (1997) A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie, *Nature* **390**, 687-690
29. Gohel, C., Grigoriev, V., Escaig-Haye, F., Lasmézas, C.I., Deslys, J.-P., Langeveld, J., Akaaboune, M., Hantaï, D., et Fournier, J.-G. (1999) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP^c) at the neuromuscular junction, *J. Neurosci. Res.* **55**, 261-267
30. Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E.K., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., DeArmond, S.J., Westaway, D., Prusiner, S.B., et Weiner, L.P. (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7358-7362
31. Kretzschmar, H.A., Stowring, L.E., Westaway, D., Stubblebine, W.H., Prusiner, S.B., et DeArmond, S.J. (1986) Molecular cloning of a human prion protein cDNA, *DNA* **5**, 315-324
32. Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y., et Shinagawa, M. (1998) Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA, *Animal Genetics* **29**, 37-40
33. Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., et Shinagawa, M. (1997) Characterization of the bovine prion protein gene : the expression requires interaction between the promoter and intron, *J. Vet. Med. Sci.* **59**, 175-183
34. Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., et Prusiner, S.B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid, *Cell* **51**, 229-240
35. Stahl, N., Borchelt, D.R., et Prusiner, S.B. (1990) Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C, *Biochemistry* **29**, 5404-5412
36. Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S.B., et Avraham, D. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform, *J. Cell Biol.* **129**, 121-132
37. Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., et Prusiner, S.B. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing, *Biochemistry* **32**, 1991-2002

38. Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., et Prusiner, S.B. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10962-10966
39. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., et Wütrich, K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231), *Nature* **382**, 180-182
40. Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wrigth, P.E., et Dyson, H.J. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13452-13457
41. Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N.B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., et James, T. L. (1999) Solution structure of syrian hamster prion protein rPrP(90-231), *Biochemistry* **38**, 5362-5377
42. Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lòpez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., et Wütrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 145-150
43. InsightII, BioSym Technologies, Inc.
44. Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T., et Schätzl, 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
45. Harris, D.A., Falls, D.L., Johnson, F.A., et Fischbach, G.D. (1991) A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7664-7668
46. Gabriel, J.M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. et Prusiner, S.B. (1992) Molecular cloning of a candidate chicken prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9097-9101
47. Simonic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Ceciliani, F., et Ronchi, S. (2000) cDNA cloning of turtle prion protein, *FEBS Lett.* **469**, 33-38
48. Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F.E., et Prusiner, S.B. (1996) Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15457-15462

49. Hedge, R., Mastriaani, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., et Lingappa, V.R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative diseases, *Science* **279**, 827-834
50. De Gioia, L., Selvaggini, C., Ghibaudi, E., Diomede, L., Bugiani, O., Forloni, G., Tagliavini, F., et Salmona, M. (1994) Conformational polymorphisms of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein, *J. Biol. Chem.* **269**, 7859-7862
51. Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G., Salmona, M., Bugiani, O., et Frangione, B. (1993) Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9678-9682
52. Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., et Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* **362**, 543-546
53. Forloni, G., Del Bo, R., Angeretti, N., Chiesa, R., Smirolto, S., Doni, R., Ghibaudi, E., Salmona, M., Porro, M., Verga, L., *et al.* (1994) A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy, *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1415-1422
54. Brown, D.R., Schmidt, B., et Kretzschmar, H.A. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* **380**, 345-347
55. Selvaggini, C., De Gioia, L., Cantù, L., Ghibaudi, E., Diomede, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., et Salmona, M. (1993) Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 1380-1386
56. Lin, M.-C., Mirzabekov, T., et Kagan, B.L. (1997) Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment, *J. Biol. Chem.* **272**, 44-47
57. Kawahara, M., Kuroda, Y., Arispe, N., Rojas, E. (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism, *J. Biol. Chem.* **275**, 14077-14083
58. Huang, Z., Prusiner, S.B., et Cohen, F.E. (1996) Scrapie prions : a three-dimensional model of an infectious fragment, *Fold. Design* **1**, 13-19

59. Huang, Z., Gabriel, J.-M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., et Cohen, F.E. (1994) Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7139-7143
60. Cohen, F.E. (1999) Protein misfolding and prion diseases, *J. Mol. Biol.* **293**, 313-320
61. Morillas, M., Swietnicki, W., Gambetti, P., et Surewicz, W.K. (1999) Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein, *J. Biol. Chem.* **274**, 36859-36865
62. Warwicker, J. (1999) Modelling charge interactions in the prion protein: predictions for pathogenesis, *FEBS Lett.* **450**, 144-148
63. Nicholls, A., Sharp, K.A., et Honig, B. (1991) Protein folding and association insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins* **11**, 281-296
64. Cappai, R., Stewart, L., Jobling, M.F., Thyer, J.M., White, A.R., Beyreuther, K., Collins, S.J., Masters, C.L., et Barrow, C.J. (1999) Familial prion disease mutation alters the secondary structure of recombinant mouse prion protein : implications for the mechanism of prion formation, *Biochemistry* **38**, 3280-3284
65. Liemann, S., et Glockshuber, R. (1999) Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein, *Biochemistry* **38**, 3258-3267
66. Collinge, J., Beck, J., Campbell, T., Estibeiro, K. et Will, R.G. (1996) Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease, *Lancet* **348**, 56
67. Krasemann, S., Zerr, I., Weber, T., Poser, S., Kretzschmar, H., Hunsmann, G. and Bodemer, W. (1995) Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene, *Brain Res Mol. Brain Res.* **34**, 173-176
68. Laplanche, J.L., Hachimi, K.H., Durieux, I., Thuillet, P., Defebvre, L., Delasnerie-Laupetre, N., Peoc'h, K., Foncin, J.F. and Destee, A. (1999) Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene, *Brain* **122**, 2375-2386
69. Goldfarb, L.G., Brown, P., McCombie, W.R., Goldgaber, D., Swergold, G.D., Wills, P.R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C.J. and Gajdusek, D.C. (1991) Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10926-10930

70. Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., et Candy, J.M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 621-629
71. Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., et Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo, *Nature* **390**, 684-687
72. Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., et Prusiner, S.B. (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions, *Biochemistry* **37**, 7185-7193
73. Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., et Dyson, H.J. (1999) Copper binding to the prion protein : structural implications of four identical cooperative binding sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2042-2047
74. Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casareno, R.L., Prohaska, J.R., Gitlin, J.K., et Harris, D.A. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level, *J. Biol. Chem.* **275**, 7455-7458
75. Wills, P.R. (1992) Potential pseudoknots in the PrP-encoding mRNA, *J. Theor. Biol.* **159**, 523-527
76. Scheffer, U., Okamoto, T., Forrest, J.M.S., Rytik, P.G., Müller, W.E.G., et Schröder, H.C. (1995) Interaction of 68-kDa TAR RNA-binding protein and other cellular proteins with prion protein-RNA stem-loop, *J. Neurovirology*, **1**, 391-398
77. Wills, P.R., et Hughes, A.J. (1990) Stem loops in HIV and prion protein mRNAs, *J. Acq. Imm. Def. Synd.* **3**, 95-97
78. Lück, R., Steger, G., et Riesner, D. (1996) Thermodynamic prediction of conserved secondary structure : application to the RRE element of HIV, the tRNA-like element of CMV and the mRNA of prion protein, *J. Mol. Biol.* **258**, 813-826
79. Gautheret, D., Major, F., et Cedergren, R. (1990) Pattern searching/alignment with RNA primary and secondary structures: an effective descriptor for tRNA, *Comput. Appl. Biosci.* **6**, 325-331
80. Gadjusek, D.C. (1988) Transmissible and nontransmissible amyloidoses : autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to β -pleated configurations, *J. Neuroimmunol.* **20**, 95-110
81. Jarrett, J.T., et Lansbury, P.T. Jr. (1993) Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid : a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell* **73**, 1055-1058

82. Lansbury, P.T. Jr., et Caughey, B. (1995) The chemistry of scrapie infection : implications of the 'ice 9' metaphor, *Chem. Biol.* **2**, 1-5
83. Cohen, F.E., Pan, K.-M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J., et Prusiner, S.B. (1994) Structural clues to prion replication, *Science* **264**, 530-531
84. Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., et Gibbs, C.J. Jr. (1994) Scrapie amyloid (prion) protein has the conformational characteristics of an aggregated molten globule folding intermediate, *Biochemistry* **33**, 8375-8383
85. Hornemann, S., et Glockshuber, R. (1998) A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6010-6014
86. Wildegger, Liemann, S., et Glockshuber, R. (1999) Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 550-553
87. Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., et Prusiner, S.B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein, *Cell* **83**, 79-90
88. Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E., et Prusiner, S.B. (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10069-10074
89. Jackson, G.S., Hosszu, L.L.P., Power, A., Hill, A.F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C.J., Waltho, J.P., Clarke, A.R., et Collinge, J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformation, *Science* **283**, 1935-1937
90. Carlson, G.A. (1998) Proof of the primacy of prion protein, *Nat. Gen.* **18**, 94-95
91. Safar, J., Ceroni, M., Gajdusek, D.C., et Gibbs, C.J. Jr. (1991) Differences in the membrane interaction of scrapie amyloid precursor proteins in normal and scrapie- or Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains, *J. Infect. Dis.* **163**, 488-494
92. Caughey, B., Raymond, G.J., et Bessen, R.A. (1998) Strain-dependent differences in β -sheet conformations of abnormal prion protein, *J. Biol. Chem.* **273**, 32230-32235
93. Bessen, R.A., et Marsh, R.F. (1994) Distinct PrP molecules suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy, *J. Virol.* **68**, 7859-7868

94. Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.T. Jr., et Caughey, B. (1995) Nongenetic propagation of strain-specific phenotypes of scrapie prion protein, *Nature* **375**, 698-700
95. Tagliavini, F., *et al.*, et Frangione, B. (1994) Amyloid fibrils in Gerstmann-Straüssler-Scheinker disease (Indiana and Swedish kindreds) express only PrP peptides encoded by the mutant allele, *Cell* **79**, 695-703
96. Kasczak, R.T., *et al.*, et Diringler, H. (1986) Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with 4 different scrapie strains, *J. Virol.* **59**, 676-683
97. Monari, L., *et al.*, et Autilio-Gambetti, L. (1994) Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease : different prion proteins determined by a DNA polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2939-2942
98. Somerville, R.A., Chong, A., Mulqueen, O.U., Birkett, C.R., Wood, S.C., et Hope, J. (1997) Biochemical typing of scrapie strains, *Nature* **386**, 564
99. Hope, J., *et al.*, et Bostock, C.J. (1999) Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641, *J. Gen. Virol.* **80**, 1-4
100. Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., et Prusiner, S.B. (1998) Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations, *Nat. Med.* **4**, 1157-1165
101. Rubenstein, R., Gray, P.C., Wehlburg, C.M., Wagner, J.S., et Tisone, G.C. (1998) Detection and discrimination of PrP^{Sc} by multi-spectral ultraviolet fluorescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 100-106
102. Giaccone, G., Verga, L., Bugiani, O., Frangione, B., Serban, D., Prusiner, S.B., Farlow, M.R., Ghetti, B., et Tagliavini, F. (1992) Prion protein preamyloid and amyloid deposits in Gerstmann-Straüssler-Scheinker disease, Indiana kindred, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9349-9353
103. McKinley, M.P., *et al.*, et Prusiner, S.B. (1991) Scrapie prion protein rod formation *in vitro* requires both detergent extraction and limited proteolysis, *J. Virol.* **65**, 1340-1351
104. Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Bruce, M.E., McBride, P.A., et Farquhar, C. (1994) Morphogenesis of amyloid plaques in 87V murine scrapie, *Neuropath. Appl. Neurosci.* **20**, 535-542
105. Parchi, R., Capellari, S., Chen, S.G., Petersen, R.B., Gambetti, P., Kopp, N., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Giese, A., et Kretzschmar, H.A. (1997) Typing prion isoforms, *Nature* **386**, 232-233

106. Aguzzi, A. (1998) Protein conformation dictates prion strain, *Nat. Med.* **4**, 1125-1126
107. Wadsworth, J.D.F., Hill, A.F., Joiner, S., Jackson, G.S., Clarke, A.R., et Collinge, J. (1999) Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions, *Nat. Cell Biol.* **1**, 55-59
108. Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., et Prusiner, S.B. (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity, *Science* **274**, 2079-2082
109. Prusiner, S.B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis, *Science* **278**, 245-251
110. Horiuchi, M., Priola, S.A., Chabry, J., et Caughey, B. (2000) Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5836-5841
111. Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.-M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.-L., Serban, D., Carlson, G.A., et al. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication, *Cell* **63**, 673-686
112. Wickner, R.B., et Masison, D.C. (1996) Evidence for two prions in yeast : [URE3] and [PSI], dans *Prions, Prions, Prions*, S.B. Prusiner (Ed.), New York, *Current Topics in Microbiology and Immunology* **207**, 147-160
113. Drillien, R., et Lacroute, F. (1972) Ureidosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation, *J. Bacteriol.* **109**, 203-208
114. Aigle, M., et Lacroute, F. (1975) Genetical aspects of [URE3], a non-Mendelian, cytoplasmically inherited mutation in yeast, *Mol. Gen. Genet.* **136**, 327-335
115. Masison, D.C., et Wickner, R.B. (1995) Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells, *Science* **270**, 93-95
116. Wickner, R.B., Masison, D.C., Edskes, H.K., et Maddelein, M.-L. (1996) Prions of yeast, [PSI] and [URE3], as models for neurodegenerative diseases, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **LXI**, 541-550
117. Cox, B.S. (1965) PSI, a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast, *Heredity* **20**, 505-521
118. Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., et Sminov, V.N. (1994) The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the

maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **137**, 671-676

119. Liu, J.-J., et Lindquist, S. (1999) Oligopeptide-repeat expansions modulate 'protein-only' inheritance in yeast, *Nature* **400**, 573-576
120. Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B., et Harris, D.A. (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing aprion protein with an insertional mutation, *Neuron* **21**, 1339-1351
121. Santoso, A., Chien, P., Osherovich, L.Z., et Weissman, J.S. (2000) Molecular basis of a yeast prion species barrier, *Cell* **100**, 277-288
122. Sondheimer, N., et Lindquist, S. (2000) Rnq1 : an epigenetic modifier of protein function in yeast, *Mol. Cell* **5**, 163-172
123. Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., et Weissmann, C. (1992) Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein, *Nature* **356**, 577-582
124. Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., et Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie, *Cell* **73**, 1339-1347
125. Manson, J.C., Clarke, A.R., McBride, P.A., McConnell, I., et Hope, J. (1994) PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology, *Neurodegeneration* **3**, 331-340
126. Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E., et Westaway, D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel, *J. Mol. Biol.* **292**, 797-817
127. Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Katoaka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., et Noda, T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene, *Nature* **380**, 528-531
128. Manson, L.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., et Hope, J. (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal, *Mol. Neurobiol.* **8**, 121-127

129. Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., et Manson, J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein, *Nature* **380**, 639-642
130. Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., et Jeffreys, J.G.R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function, *Nature* **370**, 295-297
131. Weissmann, C., et Aguzzi, A. (1999) PrP's double causes trouble, *Science* **286**, 914-915
132. Peoc'h, K., Guérin, C., Brandell, J.-P., Launay, J.-M., et Laplanche, J.-L. (2000) First report of polymorphisms in the prion-like protein gene (*PRND*): implications for human prion diseases, *Neurosci. Lett.* **286**, 144-148
133. Price, D.L., Borchelt, D.R., et Sisodia, S.S. (1993) Alzheimer disease and the prion disorders amyloid β -protein and prion protein amyloidoses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6381-6384
134. Soto, C. (1999) Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches, *J. Mol. Med.* **77**, 412-418
135. Perrier, V., Wallace, A.C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S.B., et Cohen, F.E. (2000) Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6073-6078

Chapitre 2¹:

Pseudoknots in prion protein mRNAs confirmed by comparative sequence analysis

Isabelle Barrette†, Guylaine Poisson†, Patrick Gendron & François Major*.

*Département d'informatique et de recherche opérationnelle, Université de Montréal,
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*

† *These authors contributed equally to the work*

**To whom correspondence should be addressed. E-mail:* [REDACTED]

ABSTRACT

The human prion gene contains five copies of a 24-nucleotide repeat that is highly conserved among species. The folding free energies of the human prion mRNA, and in particular of the repeat region, were analyzed and indicate a biased codon selection and the presence of RNA patterns. Pseudoknots, similar to the one predicted by Wills in the human prion mRNA, were found in the repeat region of all available prion mRNAs found in GenBank, but not those of avians and the red slider turtle. An alignment of prion mRNAs, which share low sequence homology,

¹ Ce chapitre contient un article soumis au journal *Nucleic Acids Research* et est inclus dans le format requis pour une soumission dans ce journal. En collaboration égale avec Guylaine Poisson, j'ai développé un protocole pour la recherche de pseudonoeuds dans l'ARNm du prion. Cette méthode est basée sur celle de D.R. Forsdyke, et de W. Seffens et de D. Digby. Avec ce protocole, nous avons retrouvé le pseudonoeud identifié en premier par P.R. Wills dans l'ARNm du prion humain ainsi que dans tous les autres ARNm de prion contenu dans GenBank. Patrick Gendron a automatisé le protocole dans un programme informatique que nous avons nommé RNA Structural Pattern Finder (SPF).

shows several covariations to maintain the pseudoknot pattern. The presence of pseudoknots in yeast Sup35p and Rnq1 suggests the acquisition of a pseudoknot back to the prokaryotic era. A three-dimensional model of the human prion pseudoknot highlight protein and RNA interaction domains, which suggest a possible effect in prion protein translation. The possible role of pseudoknots in prion diseases is discussed as individuals with extra copies of the repeat develop the familial form of Creutzfeldt-Jakob disease.

INTRODUCTION

Approximately 15% of all documented human Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) cases are due to inherited mutations in the prion gene (1). A subset of these cases are due to insertional mutations, where four to nine extra copies of a 24-nucleotide (nt) repeat in the prion protein gene are implicated with the development of the disease (1-4). Normally, the human prion gene contains five copies of this repeat, which are highly conserved among species in prion genes (5), and have even been found in the yeast prion Sup35p (6). The repeats might have appeared through unequal crossover events (4), and vary in number among species and individuals. Recently, it was demonstrated that the cloning in mice of a mouse homologue of the human prion gene containing four extra repeats caused the occurrence of a prion disease, whose symptoms resembled those of human familial CJD (7). Moreover, it was later shown that the expression of a prion protein containing 14 copies of the repeat in mice resulted in apoptosis of cerebellar granule cells (8). However, the exact function of these repeats has remained elusive. The oligopeptides resulting from the repeats have been shown to bind copper, and it was suggested that prion protein diseases could be due to defective copper metabolism (9). Recently, however, the prion's role in copper metabolism was challenged by finding that overexpression of the prion protein did not alter copper levels in mice (10).

Thermodynamic analyses of the 24-nt repeat region suggest the presence of several hairpin-loop structures (11-12), but more interestingly, Wills proposed the presence of a RNA pseudoknot (pk) (Fig. 1a) (13). Pks are known to interfere in translation speed, and to cause frameshifting (14). However, it is now known that frameshifting does not occur in prion diseases, but rather that the eight strains of the scrapie form of the prion protein, PrP^{Sc}, are composed of the same polypeptide sequence (15).

In an attempt to identify functional RNA motifs in prion genes, we performed an extensive analysis of the folding free energies (FFE) of the prion mRNA. These analyses are based on the work by Seffens and Digby who reported that messenger RNAs (mRNA) contain fragments of greater negative folding energies than their shuffled or codon choice randomized counterparts (16). Forsdyke performed the same type of studies on DNA, and observed similar results (17). In some cases, the codon choice in mRNAs and DNA is biased to conserve functional elements, which may participate in regulatory processes (14, 18, 19).

We developed a computer program, a RNA Structural Pattern Finder, which was used to confirm the presence of codon choice biased regions in the human prion mRNA, and, in particular, in the 24-nt repeat region that was suggested by Wills to contain a pk. More importantly, using the computer program RNAMOT (20), a prion pk descriptor was developed, which allowed us to find similar pks in the repeat region of all prion mRNA sequences currently contained in GenBank, but not those of avians and the red slider turtle. The mRNA sequences are not homologous in the repeat region as was demonstrated using BLAST (21). An alignment of the mRNA sequences in the repeat region shows several covariations to maintain the pseudoknot pattern. Finally, a three-dimensional model of the human prion pk was built using the molecular modeling package MC-SYM (22). The model suggests the exposure to the solvent of reactive

chemical groups, and in particular of the common UNR (U-turn) motif in the major loop of the pk, suggesting interactions with proteins and/or other RNAs.

MATERIALS AND METHODS

Analysis of the folding free energies (FFE) of human PrP mRNA

The total folding free energies (FFE) of a sequence results from base order and composition (17), and represents the minimum of its free energy profiles (16). The FFE of a sequence is determined from base pairing and stacking energies of its most stable predicted secondary structure. For instance, we compute the FFE of a sequence by using the dynamic programming algorithm and thermodynamic parameters developed by Rivas et al. (23). To compute the base order dependent FFE of a sequence, we compare its FFE with the FFEs of sequences obtained from randomly permuting its base order. The average FFE (AFFE) of the permuted sequences reflects the base composition dependent FFE. The base order dependent FFE is given by the difference between the AFFE of the permuted sequences and the FFE of the native sequence, $\Delta\text{FFE} = \text{AFFE} - \text{FFE}$. Positive values of ΔFFE indicate that the choice of codons in a particular region is biased in order to accommodate functional elements (17).

We developed a Structural Pattern Finder (SPF) computer program for detecting the regions of a RNA sequence that significantly deviate from the AFFEs of its shuffled sequences. The RNA sequence is divided into n windows of m nts, which overlap the preceding window by l nts. Each window is folded and its FFE measured. Then, all of the windows are shuffled x times and folded again. The 2415-nt human prion mRNA (GenBank accession number NM_000311) was selected for the study. Forty-five windows of 200 nts overlapping the preceding ones by 150 nts were defined and shuffled 500 times. The statistical significance was tested for the biases observed in the calculated FFEs between the native human prion mRNA and the 500 randomized sequences.

Pseudoknot motif search

RNAMOT (20) was used to search for pks in eighty-seven mRNA sequences taken from GenBank. The RNAMOT descriptor was developed and generalized from the one predicted by Wills (13) in human prion mRNA (see Fig. 1a) and is shown in Fig. 2. The descriptor was constructed keeping only the features important for function and structural stability. For instance, the presence of the UNR motif was required in Loop I. This motif is thought to play an important role in protein-RNA and RNA-RNA interactions (24). To regulate the allowed length of Loop I, zero to seven nucleotides were permitted 5' to the UNR motif, while one to five nucleotides were required 3'. No sequence restraints were applied for Loop II. Only the length was regulated by requiring the presence of a minimum of four nucleotides, but allowing a maximum of two extra nucleotides. In Stem I, a G-B base pair was required, as this type of base pair has been shown to be important in RNA-protein interactions (25). A minimum of 4 base pairs with the possibility of adding 2 extra base pairs was chosen in order to maximize the stability of the structure for both Stem I and Stem II.

The accession numbers of the searched sequences are: AF003087, AF009181, AF015603, AF090852, AF113937, AF113938, AF113939, AF113941, AF113942, AF113943, AF113944, AF113945, AF117309, AF117310, AF117311, AF117312, AF117313, AF117314, AF117315, AF117316, AF117317, AF117318, AF117319, AF117320, AF117321, AF117322, AF117323, AF117324, AF117325, AF117326, AF117327, AF117328, AF117329, AF157954, AF157955, AF157956, AF157957, AF157958, AF157959, AF157960, AJ223072, AJ245488, D50093, K02234, L07623, M13685, M21129, M33958, M61145, M95404, NC_001135, NM_000311, U08291, U08292, U08293, U08294, U08295, U08296, U08297, U08298, U08299, U08300, U08301, U08302, U08303, U08304, U08305, U08306, U08307, U08308, U08309, U08310, U08311, U08312, U08952, U21210, U28334, U75382, U75383, U75384,

U75385, U75386, U75387, U75388, U75389, X74759, Y09760, Y09761. The rate of false positives was computed by searching for prion pks in 1000 randomly generated sequences of 120 nucleotides. The prion pk was found in 90 random sequences, giving a false positive rate of approximately 0.09.

Modeling of PrP mRNA pseudoknot

The pk secondary structure (see Fig. 1a), predicted by Wills (13), was used to generate three-dimensional models using the MC-SYM molecular modeling computer program (22) on a dual Intel 600 MHz PentiumIII with 1 Gb of RAM. The models were built by sections and the resulting graph of relations is shown in Fig. 3. The MC-SYM molecular modeling computer program is available on the Web at www-lbit.iro.umontreal.ca/mcsym/mcsym. Standard A-RNA type helices were assumed for the two stems, and the wobble hydrogen-bonding pattern was assigned to the G-U base-pair at the end of the first stem. The nucleotides in the minor loop region were assigned C3'-*endo* sugar pucker conformations combined with *anti* orientations of their glycosyl bond torsion angle. The nucleotides in the major loop were allowed to adopt any type of conformations. However, to model the UNR motif, distance constraints were applied between N3 of uridine and the phosphate of the nucleotide immediately following the motif. Moreover, the nucleotides 5' to the UNR motif were required to be stacked upon each other. Different combinations of nucleotides in the stacked conformation were tried and evaluated using energy minimization. The potential energy of the models was minimized using the program CHARMM (26), and the CHARMM forcefield parameters 1997 (27). The minimization was performed using a distance-dependent constant dielectric ($\epsilon = 4r$). The obtained structures were then used to calculate the electrostatic solvation free energy using the program UHBD (28) with a grid of 100^3 points separated by 0.8 Å. The Poisson-Boltzmann linear equation was applied with a bulk salt concentration of 400 mM. The sums of the potential energies obtained in CHARMM and

the electrostatic solvation free energies calculated in UHBD were used to compare the models.

RESULTS

Folding free energies (FFEs)

The randomized human prion mRNA FFEs are normally distributed, as shown in Fig. 4a. The fourth window of the native sequence, containing the repeat region, has a FFE of -92.7 kcal/mol, which is one of the lowest energies obtained. The AFFE of the shuffled sequences for the fourth window, -83.8 +/- 0.4 kcal/mol, is approximately two standard deviations away from the native sequence, indicating an evolutionary biased codon selection. The error margin comes from the 500 shuffled sequences at a confidence level of 95%. Several other regions were under an evolutionary biased codon selection (Fig. 4b), but the fourth window has one of the largest Δ FFEs obtained.

Motif search

Using our RNAMOT descriptor, the pk was located in all 76 mammalian prion genes contained in GenBank, as well as in the yeast prion genes Sup35p and the recently discovered Rnq1 (29). The only species in which no pks were found are the nine available avians and the red slider turtle (30), which possess genes significantly different from the others (5, 30). The secondary structures of human, bovine, and yeast pks are shown in Fig. 1. An alignment of the 78 mRNA sequences in the pk region is shown in Fig 5, where the pseudoknots are classified into 34 groups based on sequence only. The pseudoknots can also be grouped into nine different classes, depending on species and the sequence of the pseudoknots. From these nine classes, the likelihood of finding by chance the prion pk in these 78 genes, computed from the RNAMOT rate of false positives (see Materials and Methods), was evaluated to be less than $1/10^9$. The use of the nine classes to calculate the rate of false positives gives a better estimate as not all the

sequences are independent events. When the pseudoknot sequences were used in BLAST (21), the human pseudoknot sequence could not match that of the two yeast pseudoknot sequence. In fact, it was impossible to locate all of the pseudoknots found using RNAMOT (20) when BLAST was used and only the sequence of the pseudoknots was examined.

Three-dimensional modeling of the prion pseudoknot (pk)

Using different scripts, the molecular modeling computer program MC-SYM (22) generated multiple models of the human pk for each script. After visual inspection and energy minimization with CHARMM (26, 27) and UHBD (28), the model shown in Fig. 6 was selected (available at www-lbit.iro.umontreal.ca/en/archives) and was generated using the script shown in Fig. 3. In this model, there is a hydrogen bond between the uridine of the UNR motif and the phosphate of the nucleotide following the R. The nucleotides preceding the UNR motif are also stacked. It is clear from Fig. 6 that the UNR motif, the stacked nucleotides, as well as the G-U base pair are all solvent-accessible.

DISCUSSION

The FFE analysis suggests that the human prion mRNA sequence was biased through evolution to conserve structural elements (Fig. 4b). From the results of our analyses, the region containing the 24-nt repeats possesses one of the highest Δ FFE_s obtained, thereby supporting the presence of a functional RNA pseudoknot, first proposed by Wills (13). Using RNAMOT, this pseudoknot could be located in 78 different prion sequences, including those of yeast. The presence of a pk in yeast Rnq1 and Sup35p is extremely interesting. First, note the striking similarity between the pks in yeast Rnq1 and in human PrP^C (compare Fig. 1a and 1c). Rnq1 has a prion domain that does not contain the 24-nt repeat. This suggests that the pk carried out through the repeat

region, was probably acquired from yeast. The finding of a pk in Rnq1 also supports our low likelihood of finding the pks by chance in all mRNAs. The prion domain in Rnq1 was determined in the primary mRNA sequence from mutagenesis experiments (29).

An infrequent polymorphism occurs in the 24-nt repeats (see the alignment of the 78 mRNA sequences in Fig. 5), where the G-U wobble base-pair is substituted by a G-C Watson-Crick base-pair, and in rare occasions by a G-G base-pair. In particular, the G-U and G-G base-pairs at a terminal position of a stem have been observed in RNA-RNA and RNA-protein interactions (25). The UNR motif found in the major loop of the prion pks can adopt the U-turn motif known to be involved in RNA loop-loop interactions (24). The UNR U-turn motif is stabilized by a hydrogen bond between the U and the phosphate of the nucleotide following the R (31, Fig. 6). This particular arrangement exposes the acceptor and donor groups of the NR and following base to the solvent (Fig. 6), such as in the anticodon loop of tRNAs (31). The CUGGG motif in the human prion pk was also found in the loop of HIV TAR RNA (12), and Tat, p68 and galectin-3 have been shown to interact with the human prion mRNA (32).

The YUNR and UNR motifs are also good targets for antisense sequences (12, 24). We were interested in searching and finding in the 3'UTR regions of the prion protein mRNAs (results not shown) antisense hairpins complementary to their associated prion pk UNR motifs in human, bovine, and yeast Rnq1. Although highly speculative, the co-acquired antisense could inhibit the formation of pk-protein complexes that would interfere during translation. Thanaraj and Argos noticed that alpha helices were preferentially coded by mRNA regions, where the rate of translation is fast, whereas beta strands and coils were coded by regions where the rate is slow (33). In fact, a correlation exists between the use of certain codons in the mRNA and the topological features of the resulting protein (33). This observation is interesting in light of the conformational change occurring in the prion protein, where the mainly alpha-helical protein, PrP^c,

attains a beta-sheet rich conformation in its infectious form, PrP^{Sc}. In this case, the pk may serve as a potential therapeutic target since it has been shown that the symptoms of prion diseases may be related to the concentration of prion protein expressed (7).

However, although our observations suggest the presence of pks in the mRNAs of prion protein genes, their actual folding and possible interference in PrP^c translation are yet to be demonstrated experimentally. Nevertheless, it is tempting to suggest that these pks could be involved in the conformational changes of PrP^c into PrP^{Sc}, which arises at the endoplasmic reticulum where translation occurs (34). In particular, pk-protein complexes could form and interfere during translation and lead to the folding of the prion protein into its pathogenic form.

CONCLUSION

The finding of a RNA pk in 78 prion mRNA sequences, including those of yeast Sup35p and Rnq1, suggests its involvement in familial forms of CJD. The presence of a RNA pk in primitive species such as yeast, and in particular in yeast Rnq1, suggests its conservation through evolution since the procaryotic era, an interesting phenomenon regarding CJD, and more generally prion protein diseases. Using bioinformatics, a re-evaluation of the role of RNAs in familial CJD is warranted, and incisive experiments are suggested. We are planning in using our computer program SPF, which combined with RNAMOT, will help us identify other structured RNA in the genes implicated in other amyloid diseases, such as Alzheimer's.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Laurent David for his help with CHARMM and UHBD and we thank Anthony Kusalik and Stephen Michnick for reviewing the manuscript. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT-14604) to FM. GP holds a Ph.D. scholarship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec.

REFERENCES

1. Collinge, J., Beck, J., Campbell, T., Estibeiro, K. and Will, R.G. (1996) *Lancet*, **348**, 56.
2. Krasemann, S., Zerr, I., Weber, T., Poser, S., Kretzschmar, H., Hunsmann, G. and Bodemer, W. (1995) *Brain Res Mol. Brain Res.*, **34**, 173-176.
3. Laplanche, J.L., Hachimi, K.H., Durieux, I., Thuillet, P., Defebvre, L., Delasnerie-Laupetire, N., Peoc'h, K., Foncin, J.F. and Destee, A. (1999) *Brain*, **122**, 2375-2386.
4. Goldfarb, L.G., Brown, P., McCombie, W.R., Goldgaber, D., Swergold, G.D., Wills, P.R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C.J. and Gajdusek, D.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10926-10930.
5. Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T. and Schätzl, H.M. (1999) *J. Mol. Biol.*, **289**, 1163-1178 (1999).
6. Liu, J.-J. and Lindquist, S. (1999) *Nature*, **400**, 573-576.
7. Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. and Harris, D.A. (1998) *Neuron*, **21**, 1339-1351.
8. Chiesa, R., Drisaldi, B., Quaglio, E., Migheli, A., Piccardo, P., Ghetti, B., Harris, D.A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5574-5579.

9. Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H. (1997) *Nature*, **390**, 684-687.
10. Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casareno, R.L., Prohaska, J.R., Gitlin, J.D. and D.A. Harris (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 7455-7458.
11. Lück, R., Steger, G., and Riesner, D. (1996) *J. Mol. Biol.*, **258**, 813-826.
12. Wills, P.R., and Hughes, A.J. (1990) *J. Acq. Imm. Def. Synd.*, **3**, 95-97.
13. Wills, P.R. (1992) *J. Theor. Biol.*, **159**, 523-527.
14. Draper, D.E., Gluick, T.C. and Schlax, P.J. (1998) In Simons, R.W. and Grunberg-Manago, M. (eds.), *RNA Structure and Function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, pp. 415-436.
15. Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998) *Nat. Med.*, **4**, 1157-1165.
16. Seffens, W. and Digby, D. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1578-1584.
17. Forsdyke, D.R. (1995) *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 949-958.
18. de Smit, M.H. and van Duin, J. (1990) *Prog. Nucleic Acids Res.*, **38**, 1-35.
19. Love, H.D. Jr., Allen-Nash, A., Zhao, Q., and Bannon, G.A. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 427-432.
20. Gautheret, D., Major, F. and Cedergren, R. (1990) *Comp. Appl. Biosci.*, **6**, 325-331.
21. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
22. Major, F., Turcotte, M., Gautheret, D., Lapalme, G., Fillion, E. and Cedergren, R. (1991) *Science*, **253**, 1255-1260.

23. Rivas, E. and Eddy, S.R. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 2053-2068.
24. Franch, T., Petersen, M., Wagner, E.G.H., Jacobsen, J.P. and Gerder, K. (1999) *J. Mol. Biol.*, **294**, 1115-1125.
25. Hermann, T. and Westhof, E. (1999) *Chem. Biol.*, **6**, R335-R343.
26. Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. and Karplus, M. (1983) *J. Comp. Chem.*, **4**, 187-217.
27. MacKerell, A.D. Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L. Jr., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., *et al.* (1998) *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3586-3616.
28. Davis, M.E., Madura, J.D., Luty, B.A. and McCammon, J.A. (1991) *Comp. Phys. Comm.*, **62**, 187-197 (1991).
29. Sondheimer, N. and Lindquist, S. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 163-172.
30. Simonic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Ceciliani, F. and Ronchi, S. (2000) *FEBS Lett.*, **469**, 33-38.
31. Gutell, R. R., Cannone, J., Konings, D. Gautheret, D. *J. Mol. Biol.*, in press.
32. Scheffer, U., Okamoto, T., Forrest, J.M.S., Rytik, P.G., Muller, W.E.G. and Schroder, H.C. (1995) *J. Neurovirol.*, **1**, 391-398.
33. Thanarag, T.A. and Argos, P. (1996) *Protein Sci.*, **5**, 1973-1983.
34. Hedge, R.S. Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R. (1998) *Science*, **279**, 827-834.

Figure 2 : RNAMOT descriptor based on the pseudoknot found in the human prion mRNA. The nucleotides are colored in the following manner. The motifs important for function are colored in orange. The flexible nucleotides are coloured in green.. N is for any base, R is for purines, while B is for either C, G or U.

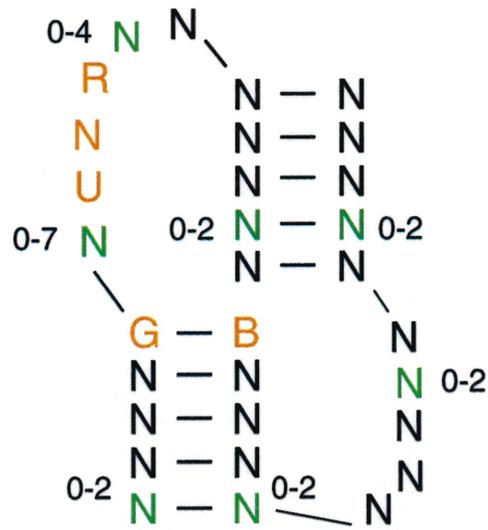


Figure 3: Graph of relations used to build the three-dimensional model of the human prion mRNA pseudoknot. Nodes represent the nucleotides, which are numbered according to the human prion mRNA sequence (GenBank accession number NM_000311). Edges represent the relations between the nucleotides. The direction of the arrows illustrates the construction pathway.

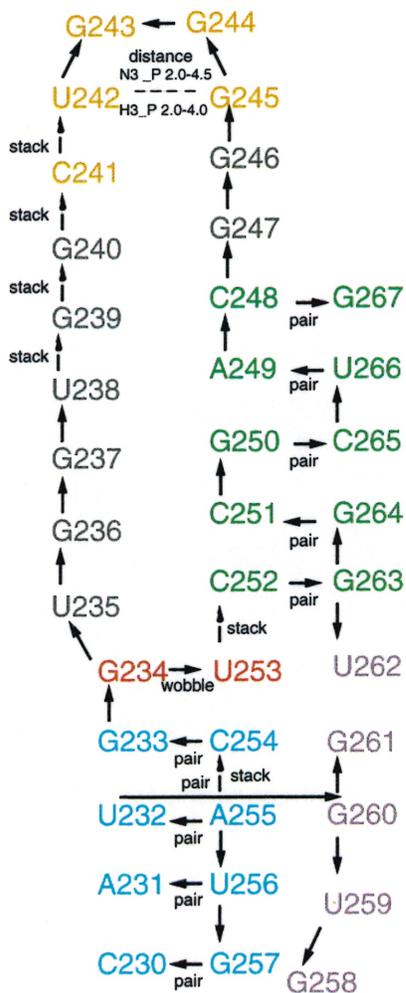


Figure 4: FFE distribution of the human prion gene. **A**, Distribution of the FFEs of the shuffled sequences from the fourth 200-nt window encompassing nucleotides 150 to 350. The red bold line represents the FFE of the fourth window in the native sequence. **B**, Δ FFEs of the 45 windows. The Δ FFEs of windows in the coding sequence, nucleotides 50 to 811, are shown in the grey area. The Δ FFE peak of the fourth window is circled in blue.

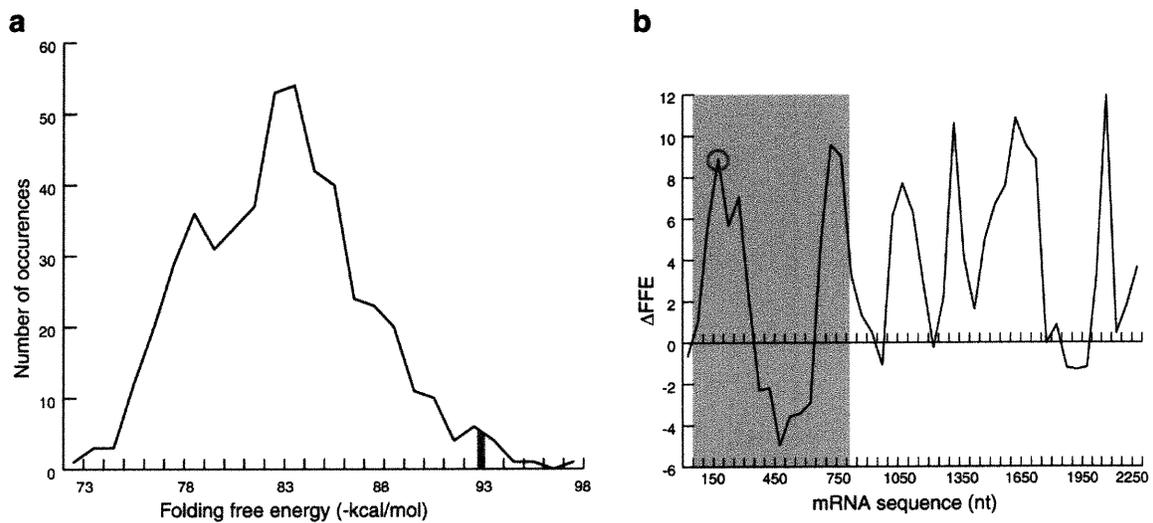
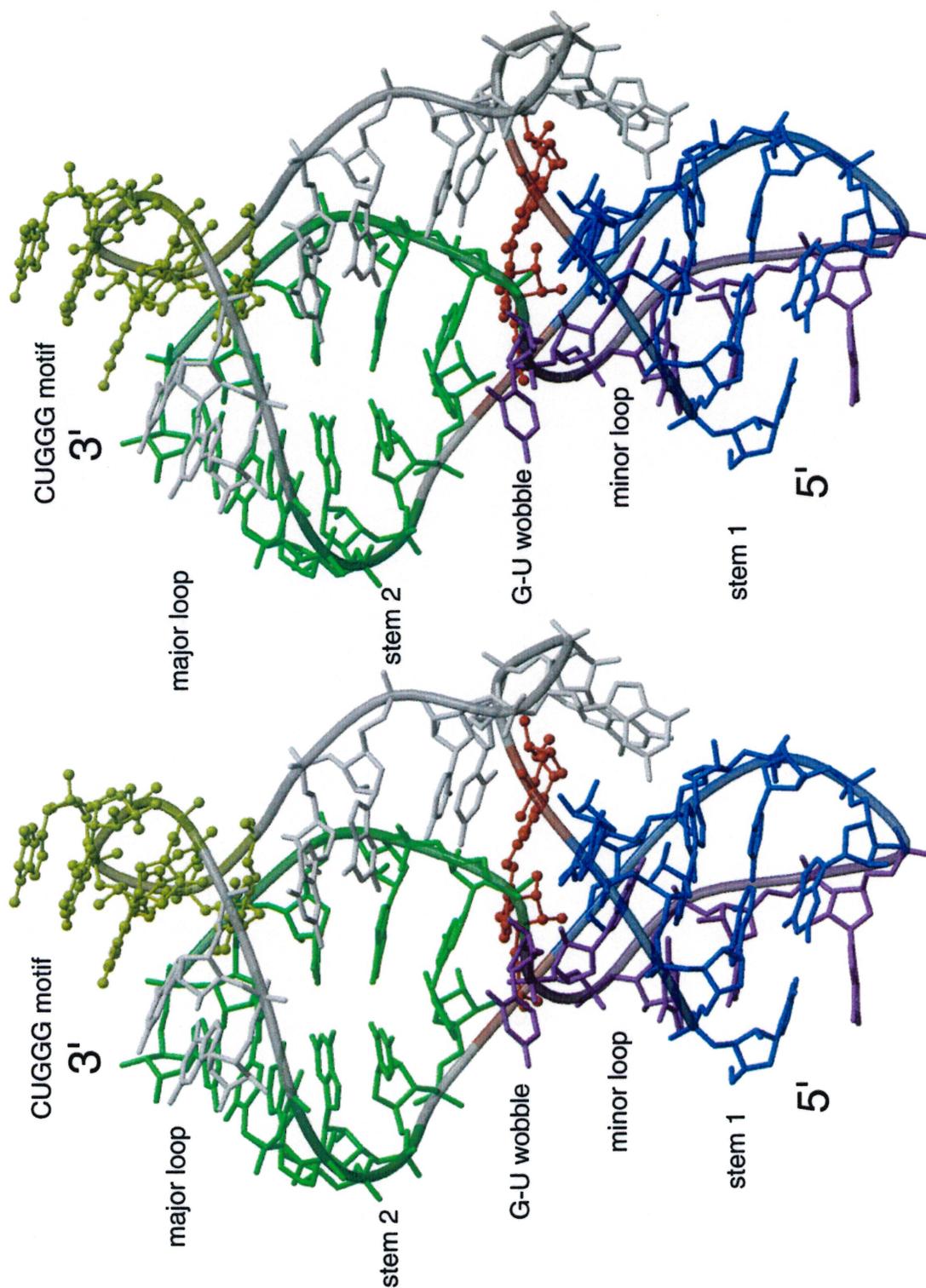


Figure 5: Alignment of the pseudoknot found in all 78 sequences. The nucleotides are coloured following the rules of Fig. 1.

U08309	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117327	UCAUGGAGGUGGUGGG--CCAGCCUCAUGG--AGGUGGCGUGG
U08292	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117313	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--AGGUGGCGUGG
U08291	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117322	UCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--CGGGGGCGUGG
U75384	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117321	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGUGUGG
U08304	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117316	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
U08295	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117309	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF117314	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--CGGGGGCGUG-	AF113945	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
U08293	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117315	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
U08312	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117326	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
U75382	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117319	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
U08310	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF117320	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
K02234	CCAUGGUGGCGGUGGGGA--CAGCCCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF113944	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
M33958	CCAUGGUGGUGGAUGGGGA--CAGCCCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF113942	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGUGUGG
M13685	CAUGGG--GGCAGCUGGGGA--CAAC-CUCAUGGUGGUAUG--	AF113941	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF117324	CCAUGGUGGUGGUGGGG--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF003087	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF117325	CCAUGGUGGUGGUGGGG--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF009181	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF015603	CCAUGGUGGUGGUGGGG--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AJ223072	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
U28334	CCAUGGUGGUGGUGGGG--CAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-	AF090852	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF113939	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUGG	U21210	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF113938	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUGG	Y09761	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG
AF113937	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG	U75389	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117318	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG	U08297	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117317	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG	U08298	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117312	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG	U08301	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117329	CCAUGGUGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG	U08311	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117328	CCAUGGAGGUGGUGGG--CCAGCCUCAUGG--AGGUGGCGUGG	U08307	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117310	CCAUGGAGGUGGUGGG--CCAGCCUCAUGG--AGGUGGCGUGG	U08306	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
L07623	--GUGG-----CUGGGGA--CAGCCCCAC--GGAGGUGGCGUG-	U75386	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
Y09760	--GCUG-----GGGUCAG-----CCCCACGGA--GGCGGCGUGGG-	U75387	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF113943	--GCUG-----GGGUCAG-----CCCCACGGA--GGAGGCGUGGG-	U75388	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117311	--GUGG-----UGGCUGGGGA--CAGCCCCAC--GGUGGUGGCGUG-	U75385	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
D50093	-CAUGGGAUAUGUUAU---AUGU-GUAUG-GGGCU-GUGU--	U08294	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
X74759	-CAUGGAGGUGGCGUGGG--CCAGCCUCAUG--UAGGUGGCGUGG	U08305	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
AF117323	-CAUGGAGGUGGCGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUGG	NM_003111	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
M21129	-GCAAG---GAUAUCA---GCUGGUUUC-CAACCA-CAGU-	U08302	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
		U08308	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
		U08300	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
		U08299	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
		U08296	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCUCAUGG--UGGUGGCGUG-
		U75383	UCAUGGAGGUGGUGGG--UCAGCCCAUGG--UGGUGGCGUG-
		U08952	CGGGGG---UGGCUGGGGA--CAGC-CCACAGGGGGUG-GCUG-
		NC_001135	--AAGGACAAGG-UCAGGUCAGGUUCUU--UUACU-GCUUUG

Figure 6: Stereoview of the pseudoknot three-dimensional model of lowest energy. The ribbon joins the phosphates. The ribbon and nucleotides are coloured following the rules of Fig. 1.



Chapitre 3:

Dynamique moléculaire du fragment 106 à 126 de la protéine prion : implications pour son activité neurotoxique

3.1 Introduction

Parmi les encéphalopathies liées aux prions, la maladie familiale Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) est caractérisée par la présence de la plus grande concentration d'amyloïde parenchymateux (1, 2). Le GSS est une maladie autosomale dominante qui se déclare à l'âge adulte et affecte les fonctions posturales et cognitives. Une des mutations impliquées dans la maladie GSS est la substitution d'une alanine pour une valine à la position 117 (A117V) dans la protéine prion (3-5). Cette mutation se retrouve dans la partie flexible N-terminale de la protéine, au centre de la région qui comprend les acides aminés 106 à 126, mieux connu sous le nom de « fragment neurotoxique » ou PrP106-126. En effet, la déletion de ce fragment neurotoxique avec la déletion des résidues 23 à 88 empêchent la formation de la forme pathogénique du prion (6), indiquant que PrP106-126 jouerait un rôle important dans le changement conformationnel de la protéine.

3.1.1 Propriétés physicochimiques et pathogéniques de PrP106-126

PrP106-126 possède plusieurs des propriétés physicochimiques et pathogéniques de la forme maligne du prion (PrP^{Sc}). Ces observations ont amené plusieurs équipes à suggérer que ce peptide pourrait être utilisé pour étudier en détails le mécanisme neurotoxique de PrP^{Sc} (1, 2, 7-10). Tel que la forme pathogénique du prion, PrP106-126 est résistant à la dégradation par la protéinase K et la pronase (10). Ce fragment forme des fibrilles d'un diamètre de 4 à 8 nm qui varient en longueur de 0.1 à 2 µm et qui émettent de la biréfringence verte sous de la lumière polarisée après coloration avec du

Congo rouge (2). En présence de l'expression de protéine prion endogène (11-15), PrP106-126 cause l'apoptose des cellules nerveuses, tels que les neurones de l'hippocampe du rat (7, 10) et les neurones corticaux des embryons de souris âgés de 16 jours (16), induit l'hypertrophie et la prolifération des astrocytes, et provoque l'activation des cellules microgliales *in vitro* (7-9).

La présence de cellules microgliales semble être très importante pour la neurotoxicité de PrP106-126 (17). Après leur activation par de gros agrégats de PrP106-126 riches en feuillets bêta, les cellules microgliales relâchent une concentration élevée de superoxyde (9, 17). De plus petits agrégats de PrP106-126, moins riches en feuillets bêta, affectent directement les neurones en réduisant leur résistance au stress d'oxydation par l'inhibition de l'activité de la dismutase superoxyde (17).

PrP106-126 peut aussi augmenter la microviscosité de la membrane d'une grande variété de cellules, incluant les neurones et les astrocytes, la migration cellulaire des leucocytes, et la production de superoxyde dans les monocytes et les neutrophiles (14, 18). Récemment, il a aussi été démontré que PrP106-126 pouvait interagir avec les protéines alpha et beta tubuline (16). Ce fragment serait donc peut-être responsable de la déstabilisation du cytosquelette, tel qu'observé dans le GSS (19). Ce peptide a aussi l'effet d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium.

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium pourrait être causée par la formation de canaux dans les membranes cellulaires. En effet, PrP106-126 peut former des canaux perméables à plusieurs ions physiologiques dans des membranes bilipidiques (20, 21). Ces canaux seraient assez gros et nonsélectifs pour induire l'apoptose par la perte du potentiel membranaire, par des changements dans

l'homéostasie ionique, et plus spécifiquement, par l'influx de calcium (20). La formation de ces canaux est grandement facilitée lorsque la concentration d'agrégats est élevée. Ce genre de phénomène a aussi été noté dans l'Alzheimer (21-23) et le diabète mellitus de type II (21, 24). Toutefois, ces observations ont été contestées; l'équipe de Florio suggère plutôt que l'effet apoptotique de PrP106-126 serait dû à une inactivation des canaux de calcium du type L (25).

Toutefois, lorsque l'ordre des acides aminés de PrP106-126 est permuté, aucun des effets neurotoxiques rapportés jusqu'à présent n'est observé (10). Les effets neurotoxiques de PrP106-126 semblent donc être étroitement liés à la séquence même de ce fragment. Le peptide PrP106-126 est divisé en deux parties: une tête hydrophile qui comprend les résidues KTNMKH et une queue hydrophobe qui englobe les résidues MAGAAAAGAVVGGLG, tel qu'illustré dans la Figure 1. Cette organisation pourrait être vraisemblablement liée aux conditions requises pour la formation de canaux dans des membranes bilipidiques.

Figure 1 : Séquence d'acides aminés du fragment PrP106-126. Le rectangle rouge représente la région hydrophile tandis que le rectangle bleu représente la région hydrophobe.

NH₂ - KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG - COOH



Les régions hydrophiles et hydrophobes ont chacune leur rôle dans les propriétés physicochimiques et neurotoxiques de PrP106-126. La tête hydrophile semble influencer grandement ces propriétés. Lorsque la tête hydrophile est éliminée, les fibrilles résultantes, qui sont présentes en moins grande concentration, ont un diamètre de trois à cinq nanomètres et une longueur de 0,4 µm (2). De plus, la charge nette de PrP106-126 dépend de l'ionisation de l'His-111, un acide aminé contenu dans la tête hydrophile. À

un pH supérieur à 7,0 PrP106-126 a une charge nette positive de 2, tandis qu'à un pH de moins de 6,0, il possède une charge nette positive de 3, ce qui est attribuable à l'ionisation de l'His-111 à un pH de 6,5. À noter, un changement conformationnel s'effectue chez PrP106-126 lorsque le pH passe de 7 à 5 et que les conditions ioniques sont variées, tel que décrit dans le Tableau I. De plus, même si PrP106-126 adopte une conformation plus riche en feuillet bêta à un pH de 5, l'agrégation est plus grande à un pH de 7 (26). Apparemment, la protonation de l'His-111 augmente la solubilité du peptide à un pH de 5 et oppose les forces hydrophobes intramoléculaires (26). Plusieurs études ont donc suggéré que l'His-111 pourrait jouer un rôle important dans le changement conformationnel de PrP106-126 (26-28).

Tableau I: Conformation de PrP106-126 dans différents environnements

Environnement	Conformation déterminée par dichroïsme circulaire ^{1, 10}
Eau déionisé	Non structuré
Tampon phosphate 200 mM, pH 7,0	Combinaison de régions non structurées et de feuillet bêta
Tampon phosphate 200 mM, pH 5,0	Feuillet bêta
2,2,2-trifluoroéthanol ^a , pH 7,0	Hélice alpha
2,2,2-trifluoroéthanol ^a , pH 5,0	Feuillet bêta
Tampon phosphate 5 mM, pH 7.4 avec liposomes	Feuillet bêta

^a Le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) est un solvant qui stabilise les hélices alpha.

Afin de tenter d'expliquer le rôle exact de l'His-111, des peptides synthétiques, où l'His-111 a été substituée par divers autres acides aminés, ont été fabriqués par l'équipe de Tagliavini (26). Les résultats de l'étude sont résumés dans le Tableau II. D'après les résultats obtenus par Tagliavini, un acide aminé ionisé doit se trouver à la jonction des régions hydrophile et hydrophobe afin de retrouver les mêmes propriétés que celles de PrP106-126 du type sauvage. Lorsqu'un acide aminé autre que le L-His-111 se retrouve à

cette jonction, le changement conformationnel est compromis, et l'agrégation et le contenu en feuillet bêta sont grandement diminués.

Tableau II: Effet de la substitution de l'His-111 sur l'agrégation et la conformation de PrP106-126. Adapté de Salmons *et al.* (1999) *Biochem. J.* **324**, 207-214 (26).

Peptide	Mutation	Effet sur l'agrégation et la conformation	Cause probable
PrP106-126H _D	L-His-111 par D-His	<ul style="list-style-type: none"> • Abolir le changement conformationnel dû au pH • Cause une perte de la stabilité du feuillet bêta • Diminue l'agrégation 	Encombrement stérique dû à la direction opposée de l'imidazole
PrP106-126A	His-111 par Ala	<ul style="list-style-type: none"> • Insolubilité du fragment • Concentration élevée de feuillet bêta • Forme des agrégats amorphes 	Force hydrophobe intermoléculaire facilite l'agrégation
PrP106-126K	His-111 par Lys	<ul style="list-style-type: none"> • Modifie le changement de conformation dû au pH • L'agrégation n'est pas affectée 	pKa de Lys peut être modifié par les acides aminés environnants. Stabilité du feuillet bêta dépend d'un résidu ionisé à la position 111.
PrP106-126NH ₂	Amidation de l'extrémité carboxy-terminale	<ul style="list-style-type: none"> • Perte de structure • Faible concentration d'agrégats • Perte du changement conformationnel 	Élimination des charges à l'extrémité carboxy-terminale favorise la perte de structures organisées. Agrégats observés dû aux forces de van der Waals.
PrP106-126V	Ala-117 par Val	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun changement majeur dans l'agrégation 	Masquage de l'effet de cette substitution dû à la présence de charge à l'extrémité carboxy-terminale.
PrP106-126VNH ₂	Ala-117 par Val et amidation du carboxy terminus	<ul style="list-style-type: none"> • Plus d'agrégation que le peptide où la seule modification est l'amidation de l'extrémité carboxy-terminale 	La valine est un acide aminé plus hydrophobe que l'alanine.

Les résultats obtenus avec les peptides PrP106-126NH₂ et PrP106-126VNH₂ démontrent aussi l'importance de la queue hydrophobe du fragment. Le fait qu'un nombre limité de fibrilles a été observé pour PrP106-126NH₂ suggère que les forces de van der Waals, qui résultent du segment hydrophobe du peptide, jouent un rôle important dans la formation de fibrilles amyloïdes (26). L'importance du segment hydrophobe AGAAAAGA de PrP106-126 a aussi été récemment illustré par l'équipe de Cappai (29). En substituant de deux à quatre résidus hydrophobes par des sérines, une diminution dans le contenu en feuillet bêta était observée et l'effet neurotoxique sur les neurones du cervelet de la souris disparaissait. Ce même genre d'observations a été fait pour la protéine A β , impliquée dans la maladie Alzheimer (30-31). En effet, la région hydrophobe englobant les acides aminés 25 à 35 de la protéine A β serait responsable de l'agrégation stable du peptide (30, 32). Comme l'Alzheimer, il serait donc possible que la région hydrophobe de PrP106-126 influence l'agrégation des fragments afin de créer une structure stable et neurotoxique.

3.1.2 Structure tridimensionnelle de PrP106-126

Les résultats obtenus avec les peptides PrP106-126NH₂, PrP106-126VNH₂ et PrP106-126A ont permis à Tagliavini de faire l'hypothèse que PrP106-126 pourrait s'assembler en feuillets bêta anti-parallèles. Ces feuillets bêta anti-parallèles seraient stabilisés par des interactions ioniques entre Lys-106 et Lys-110 et le groupe carboxy de Gly-126 (26). D'autres ont aussi suggéré que ce fragment pourrait être organisé en structure lamellaire (20). L'arrangement des acides aminés en deux sections, une hydrophile et l'autre hydrophobe, supporte ces hypothèses. En effet, lorsque l'ordre des acides aminés est permuté, aucune agrégation n'est observée (10).

Récemment, la structure monomérique de PrP106-126 a été obtenue par ^1H -RMN dans de l'eau déionisée/TFE 50:50 (v/v) et dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (33). Dans l'eau déionisée à un pH de 3,5, la région qui comprend les acides aminés Met-112 à Leu-125 se replie en hélice-alpha et des ponts hydrogène stables se forment entre Ala-115 et Ala-118. L'hélice se fait plus stable lorsque du TFE est ajouté. Par contre, lorsque le pH est augmenté à 7, la région qui s'étend de Ala-120 à Gly-124 se déplie pour adopter une conformation de feuillet bêta (33). Cette conformation est également obtenue pour toute la région hydrophobe lorsque le peptide est dans le DMSO. En effet, l'hélice n'est pas très stable surtout au niveau de Val-121 et Val-122. Comme la valine déstabilise les hélices alpha, l'introduction d'une valine additionnelle à la position 117 tel que dans le GSS déstabilise donc encore plus l'hélice et expliquerait peut-être l'apparition de fibrilles amyloïdes.

Toutefois, la région qui comprend les résidus Asn-108 à Met-112 conserve une conformation de boucle dans toutes les conditions expérimentales (33). Cette observation a donné lieu à l'hypothèse que l'His-111 pourrait, dans des conditions très ioniques, interférer avec le dipole de l'hélice et induire une déstabilisation. De plus, les auteurs suggèrent que l'agrégation serait influencée par des interactions entre les chaînes latérales du coeur hydrophobe de PrP106-126 (33).

3.1.3 Peut-on simuler l'agrégation de PrP106-126?

En 1995, l'équipe de Daggett (34) rapporte la première dynamique moléculaire fait sur la région comprenant les résidus 109 à 122 de la forme monomérique de PrP106-126. Toutefois, cette dynamique avait comme hypothèse principale que cette région constituait la première hélice alpha de la protéine prion, qui devait se replier en faisceau

de quatre hélices (35). Toutefois, il a maintenant été démontré que la protéine prion ne se replie pas en faisceau de quatre hélices, mais qu'elle contient plutôt trois hélices et un petit feuillet bêta antiparallèle. La région comprenant les acides aminés 109 à 122 fait plutôt partie de l'extrémité N-terminale non structurée, ce qui remet en question les données obtenues de la dynamique de Daggett.

Jusqu'à présent, aucune dynamique moléculaire n'a été publiée sur PrP106-126 en sa forme dimérique. Ce présent chapitre rapporte les résultats de six dynamiques moléculaires effectuées sur le fragment PrP106-126 dans sa forme dimérique à différents pH et avec différentes substitutions d'acides aminés.

3.2 Méthodes

3.2.1 Construction des modèles de PrP106-126

Plusieurs fragments différents de PrP106-126 ont été construits et modélisés à l'aide de InsightII (36). Les modèles tridimensionnels de PrP106-126 ont été construits en utilisant l'hypothèse que ce fragment, lorsqu'il est en forme dimérique, adopte une conformation de feuillet bêta antiparallèle. Les abréviations utilisées ainsi qu'une description de chaque peptide se retrouvent dans le Tableau III. Pour les substitutions hydrophiles, la sérine était un bon choix puisque cet acide aminé est non chargé et relativement petit, minimisant donc la possibilité qu'il y ait interférence avec le repliement de ce fragment. Un peptide contenant la mutation familiale A117V a également été construit afin d'étudier l'effet de cette mutation sur le polymorphisme conformationnel et l'agrégation. Pour les dynamiques moléculaires qui ont été effectuées à pH 5, l'atome NE2 de l'His-111 a été protoné.

Tableau III: Peptides PrP106-126 utilisés pour les dynamiques moléculaires. Adapté de Jobling, M.F. *et al.* (1999) *J. Neurochem.* **73**, 1557-1565 (29).

Peptide avec abbréviation	Séquence
PrP106-126	KTNMKHMAG AAAA GAVVGGLG
PrP106-126 A117V	KTNMKHMAG AAVAG AVVGGLG
PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S	KTNMKHMAG SSSS GAVVGGLG
PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S	KTNMKHMAG AASSG ASSGGLG

L'énergie de chaque dimère a été minimisée en utilisant le programme CHARMM (37) et les paramètres de champs de force de CHARMM 27 (38). Le protocole suivant a été adopté: 5000 pas avec une descente de gradient, 5000 pas avec un gradient conjugué, 5000 pas avec un gradient conjugué suivant la méthode de Powell, et 5000 pas avec le « Adopted Basis Newton-Raphson » (ABNR) (37, 38). Ce cycle fut répété trois fois pour chaque dimère. Les minimisations d'énergie furent effectuées avec une constante diélectrique dépendante de la distance ($\epsilon_{ij} = 4r_{ij}$) pour simuler l'effet d'écrantage du solvant.

3.2.2 Dynamique moléculaire des fragments PrP106-126

3.2.2.1 Généralités sur les dynamiques moléculaires

Les dynamiques moléculaires sont de plus en plus utilisées pour simuler le mouvement de protéines (39) et de petits peptides (40). Dans ces simulations, les atomes de la molécule d'intérêt se déplacent grâce à leur propre énergie cinétique et aux forces exercées par tous les autres atomes dans le système (34). Cette technique utilise un champs de force qui contient tous les paramètres qui sont nécessaires pour le calcul de l'énergie potentielle du système. Ces paramètres incluent les constantes de forces, les longueurs et les angles d'équilibre pour les oscillateurs, et les charges et les rayons de chaque atome (41). Trois méthodes principales existent pour faire des simulations : la dynamique de Newton, la dynamique de Langevin et la dynamique de Monte Carlo (41).

Toutes ces techniques dépendent de la définition d'une fonction d'énergie potentielle qui caractérise le système à étudier. La dérivée de la fonction d'énergie potentielle permet de calculer les forces qui agissent sur chaque atome de la macromolécule à étudier (41). La forme la plus couramment utilisée est la suivante, qui est du même type que celle utilisée dans CHARMM (37) :

$$V_{potentielle} = \frac{1}{2} \left(\sum_{liaisons} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{impropres} K_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{dièdres} K_\Phi (1 + \cos(n\Phi - \delta)) + \sum_{paires\ non\ liées} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right) \right) \quad \text{Eq. 3.1}$$

Les oscillateurs harmoniques sont représentés par les quatre premiers termes de la fonction. Les constantes de force pour les liaisons et les angles, les angles dièdres et les angles impropres sont K_b , K_θ , K_ω et K_Φ respectivement. b_0 représente la longueur de la liaison covalente à l'équilibre et θ_0 , ω_0 et Φ_0 les angles à l'équilibre (41). n est la symétrie de torsion, et δ est l'angle de phase. Le dernier terme représente la contribution des interactions non liées dues aux forces de van der Waals et de Coulomb à la fonction de potentiel pour les angles dièdres (41). Les coefficients de Lennard-Jones entre deux atomes i et j sont représentés par A_{ij} et C_{ij} , tandis que q_i et q_j sont les charges des atomes i et j , ϵ est la constante diélectrique du milieu, et r_{ij} est la distance entre les atomes i et j (41).

3.2.2.2 Solvants explicites et implicites

Pour bien simuler le mouvement d'une molécule, il faut aussi tenir compte de l'effet de solvation. On peut se servir d'un solvant modélisé de façon explicite ou de façon implicite. Pour modéliser le solvant de façon explicite, un modèle à 3 atomes, connu sous le nom de TIP3, ou un modèle plus complexe à 5 atomes, connu sous le nom de ST2, peuvent être utilisés (37, 41). Toutefois, l'utilisation de solvants explicites augmente grandement la taille du système à étudier, et par conséquent le temps de calcul

(41). En effet, la majeure partie du temps de calcul est dévoué au solvant, qui n'est pas en général le centre d'intérêt de l'étude, puisque les molécules d'eau sont en plus grand nombre que la macromolécule elle-même. Conséquemment, différents modèles de solvant implicites ont été développés afin de réduire le temps de calcul et permettre l'étude de plus gros systèmes (42, 43). Une des catégories de modèles de solvant implicite est le modèle continu qui considère le solvant entourant la macromolécule comme une entité statique pouvant être décrite par une forte constante diélectrique (41). La macromolécule est représentée par une faible constante diélectrique et est aussi considérée comme étant une cavité dans le système (41).

Le modèle le plus simple et le plus utilisé est l'utilisation d'une constante diélectrique dépendante de la distance qui permet une simulation approximative du solvant tout en conservant un temps de calcul identique à celui du vide (44). La constante diélectrique a l'effet de faire l'écrantage des interactions électrostatiques entre les atomes de la molécule (dans Eq. 3.1, $\epsilon = 4r_{ij}$) (41). Les charges de la molécule accessibles au solvant sont aussi réduites, permettant ainsi de simuler l'effet dipolaire de l'eau, ce qui réduit le repliement des chaînes latérales (41).

Toutefois, la diversité des interactions dans un environnement diélectrique non-homogène demande un modèle plus complexe, et cette diversité peut être représentée en utilisant une solution numérique de l'équation de Poisson-Boltzmann (45-51). Le problème de cette méthode est essentiellement dû au temps de calcul très couteux et donc, récemment, un modèle basé sur l'équation généralisée de Born avec le traitement de surfaces (GB/SA) (52-54) a été développé. Le modèle GB sert d'approximation rapide au modèle de Poisson-Boltzmann et a été utilisé avec succès (55-57).

Dans le modèle GB/SA, le calcul de l'énergie de solvation est séparé en deux étapes distinctes (55) et est représentée par la fonction suivante :

$$G_{sol} = G_{cav} + G_{vDW} + G_{pol} \quad \text{Eq. 3.2}$$

La première étape consiste à calculer l'énergie libre de solvation non polaire (qui comprend les forces hydrophobe et de van der Waals) en créant une cavité dans le solvant qui a la forme du soluté. L'énergie libre de solvation non polaire est alors évaluée à l'aide de la fonction suivante (58, 59) :

Eq. 3.3

$$\Delta G_{SA} = \sum_i \delta\sigma_i A_i = G_{cav} + G_{vDW}$$

Chaque atome de la macromolécule contribue au calcul de l'énergie libre de solvation et la contribution de chaque atome est estimée par le produit de sa surface d'accessibilité au solvant (A_i) et de son paramètre atomique de solvation (σ_i) (41). La deuxième étape est le calcul de l'énergie libre de solvation due aux charges électrostatiques (55). Afin de calculer des approximations au terme de polarisation électrique de l'énergie libre de solvation (55), les rayons atomiques de Born de l'équation généralisée de Born (GB) sont déterminés. L'énergie de solvation est alors calculée en utilisant l'équation de Born généralisée (53, 55):

$$G_{pol} = -166.0 \left(1 - \frac{1}{\epsilon} \right) \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{q_i q_j}{\left(r_{ij}^2 + \alpha_{ij}^2 e^{-D_{ij}} \right)^{0.5}} \quad \text{Eq. 3.4}$$

3.2.2.3 Application de la dynamique de Langevin au PrP106-126

La dynamique de Langevin possède l'avantage de pouvoir simuler, à l'aide d'un coefficient de friction et d'une force aléatoire, l'effet hydrodynamique du solvant dans une dynamique moléculaire, ce qui permet ainsi de réguler la température du système (41). À une température de 300 K, les molécules d'eau en grand volume, connues sous le nom de « bulk water », se réorganisent entre elles et des liaisons hydrogène sont formées

sur une échelle de temps de l'ordre de la picoseconde (41). Les molécules d'eau possédant les plus grandes mobilités se retrouvent entre la « bulk water » et la première couche (60). Le déplacement des solutés est lié au mouvement des molécules d'eau. Ce mouvement est influencé par l'effet de répulsion, de collisions et d'interactions électrostatiques (41). Ces effets peuvent être traduits par un effet de friction qui limite la diffusion du soluté et peut être représenté comme suit où D est la constante de diffusion (41) :

Eq. 3.5

$$\langle r^2 \rangle^{\frac{1}{2}} = (6Dt)^{\frac{1}{2}}$$

Pour les molécules qui ont une forme sphérique, la relation d'Einstein peut être appliquée où η représente la viscosité du solvant, f représente le coefficient de friction et a le rayon du soluté (41):

$$D = \frac{kT}{f} \quad f = 6\pi\eta a \quad \text{Eq. 3.6}$$

La force de friction suivante est engendrée lorsque le soluté se déplace à une vitesse v (41):

$$F_v = -fv \quad \text{Eq. 3.7}$$

L'équation de mouvement de Langevin a la forme suivante :

Eq. 3.8

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = F(x) - f \frac{dx}{dt} + R(t)$$

où m et x représentent la masse et la position de l'atome et t le temps, F la force qui est dérivée du potentiel V (voir Eq. 2.1) et $R(t)$ une force aléatoire qui n'est pas corrélée à la position, ni à la vitesse des particules du système (41). $R(t)$ est une Gaussienne de moyenne et de variance définies décrite par l'équation suivante (41) :

$$\langle R(x) \rangle = 0 \quad \text{et} \quad \langle R(x) \cdot R(x') \rangle = 2m\gamma kT \delta(x - x') \quad \text{Eq. 3.9}$$

Dans cette fonction, k est la constante de Boltzmann, T est la température, γ est la fréquence de collision et $\delta(x-x')$ est la fonction delta de Dirac (41).

Pour étudier PrP106-126, la dynamique de Langevin a été utilisée dans le cadre du programme UHBD (50) avec le modèle GB/SA (53, 55). Un coefficient de surface de 25,1 J/(mole Å²) (61, 62) a été utilisé pour simuler l'effet des forces de solvation non polaires. Des simulations d'une nanoseconde ont été réalisées et les coordonnées des systèmes étudiés ont été sauvées toutes les 0,5 ps fournissant 2000 structures pour chaque trajectoire. La troncature des interactions non liées a été fixée à 20 Å, la température à 300 K et le coefficient f à 10 s⁻¹ pour tout les atoms du système. Les rayons effectifs des atomes permettant le calcul de l'énergie de Born (voir Eq. 2.4) ont été recalculés toutes les 10 fs. La dérivée de l'équation de Born a été estimée toutes les 5 fs permettant les calculs des forces de GB. L'énergie ainsi que les forces dûes à la composante non polaire du solvant (SA) ont été recalculées toutes les 10 fs. La liste des interactions non liées a été renouvelée toutes les 10 fs. Le pas d'intégration des équations de Langevin a été fixé à 1 fs.

3.2.2.4 Analyse des trajectoires

L'effet des mutations dans les dimères PrP106-126 tels que décrits dans le Tableau III a été mesuré en calculant la variation d'énergie libre ($\Delta\Delta G$) des peptides. Le $\Delta\Delta G$ fût calculé comme suit :

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{dimère} - \Delta G_{brin 1} - \Delta G_{brin 2} \quad \text{Eq. 3.10}$$

où le ΔG des trois termes est la somme de l'énergie potentielle et de l'énergie libre de solvation.

De plus, le rayon de giration de chaque dimère, qui permet de quantifier la taille moyenne des molécules, a été déterminé avec la fonction suivante :

$$R_{gyr} = \left[\frac{\left(\sum_{i,j=1}^N r_{ij}^2 \right)}{N^2} \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 3.11}$$

où N est le nombre d'atome du système et r_{ij} , la distance entre les atomes i et j .

Les fluctuations des atomes du squelette (N, C $_{\alpha}$ et C) ont été calculées comme suit:

$$f_i = \frac{8\pi^2}{3} \langle \Delta r_i^2 \rangle \quad \text{Eq. 3.12}$$

où Δr_i représente la déviation de l'atome i de sa position moyenne au cours de la simulation. Le facteur $8\pi^2$ rend les résultats comparables aux facteurs cristallographiques Debye-Waller (62).

Les corrélations entre les déplacements des atomes ont été calculées en utilisant la formule suivante:

$$C_{ij} = \langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle / \left(\langle \Delta r_i^2 \rangle \langle \Delta r_j^2 \rangle \right)^{1/2} \quad \text{Eq. 3.13}$$

où C_{ij} représente la corrélation entre les atomes i et j et $\langle \cdot \rangle$ représente la moyenne par rapport au temps.

3.3 Résultats et Discussion

Les propriétés physicochimiques et structurales de PrP106-126 semblent être très sensibles au pH. Un polymorphisme conformationnel chez PrP106-126 a déjà été rapporté lorsque le pH passe de 7 à 5 (10, 26). Malheureusement, la nature de la dépendance des propriétés physicochimiques et structurales de PrP106-126 sur le pH est

obscur. Le seul acide aminé ayant des propriétés différentes à des pH de 5 et de 7 est l'histidine à la position 111. À un pH de 5, l'histidine acquiert une charge positive additionnelle avec la protonation de l'atome NE1. Il n'est toutefois pas encore connu si la protonation de l'His-111 est la seule cause de l'adoption d'une conformation de feuillet bêta à un pH de 5.

Ce polymorphisme conformationnel devient encore plus intéressant lorsque PrP106-126 adopte une forme dimérique, qui pourrait être impliqué dans la formation de canaux transmembranaires perméables au calcium (20, 21). Est-ce la protonation de l'His-111 ou l'interaction entre d'autres acides aminés qui est responsable de la formation de feuillets bêta et de l'agrégation du peptide? La queue hydrophobe de PrP106-126 est aussi impliquée dans l'agrégation du peptide. Lorsque certains acides aminés hydrophobes sont remplacés par des acides aminés hydrophiles, le peptide perd sa neurotoxicité et sa capacité de s'agréger (29). Fait intéressant, la mutation familiale A117V qui cause le GSS se retrouve dans la queue hydrophobe.

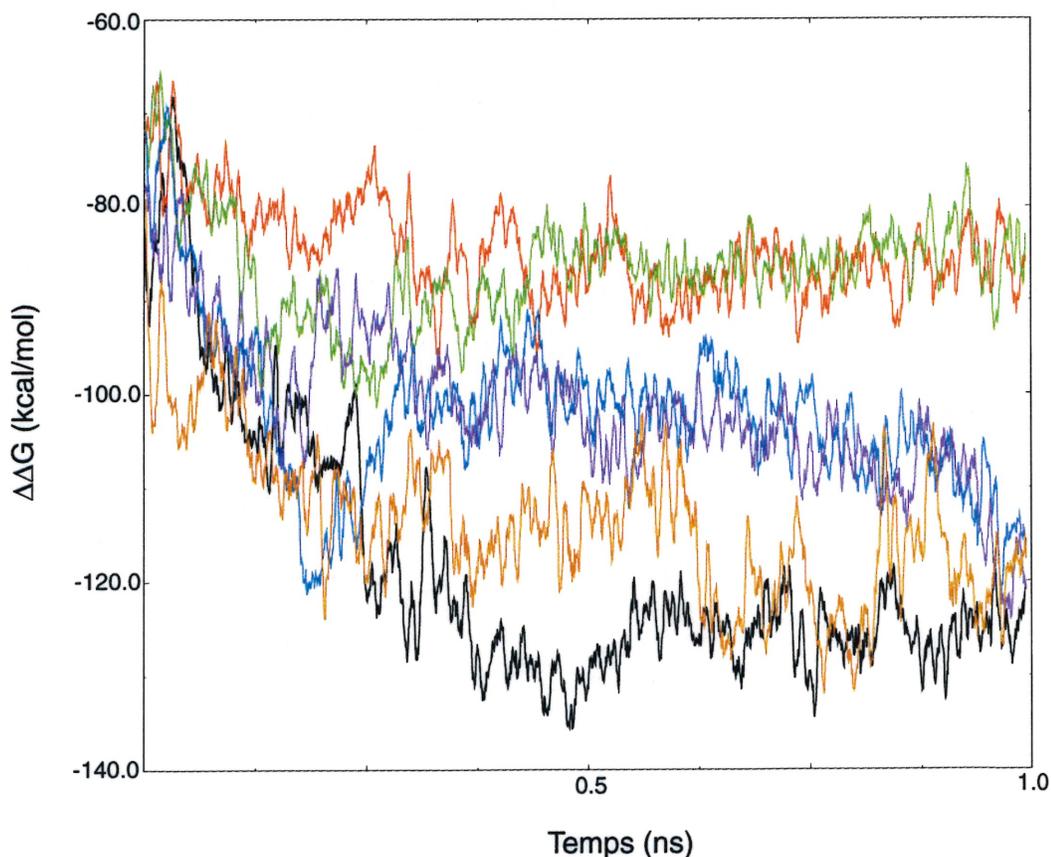
Afin de tenter de mieux comprendre les interactions moléculaires à la source du polymorphisme conformationnel, des dynamiques moléculaires d'une durée d'une nanoseconde furent effectuées sur PrP106-126 en forme dimérique. À l'aide des données obtenues, nous avons tenté de quantifier l'effet du pH sur les propriétés structurales et physicochimiques de PrP106-126. Les résultats sont présentés ci-dessous. Premièrement, une examination de l'effet du pH sur les propriétés structurales et physicochimiques de PrP106-126 est présentée, incluant une comparaison de ces effets entre la forme native du dimère et la forme comprenant la mutation familiale A117V. Deuxièmement, l'importance de la queue hydrophobe de PrP106-126 est étudiée à l'aide

de deux mutants avec des substitutions hydrophiles, tels que décrits dans le Tableau III. Ces dynamiques ont été effectuées à pH 7 seulement afin d'étudier l'effet des substitutions hydrophiles et d'éviter de combiner l'effet de ces substitutions à l'effet de la protonation de l'His-111 à pH 5.

3.3.1 Effet du pH sur les interactions inter-monomères dans la forme dimérique de PrP106-126

Une diminution du pH semble grandement affecter les interactions inter-monomères dans la forme dimérique de PrP106-126. Tel qu'illustré dans la Figure 2, l'énergie libre d'interaction (voir Eq. 3.10) entre les deux brins du dimère est beaucoup plus grande lorsque le dimère est placé dans un environnement où le pH est 5.

Figure 2: Variations des énergies libres des différents dimères PrP106-126. Les dimères suivants y sont représentés: PrP106-126 (pH 5) en noir, PrP106-126 (pH 7) en rouge, PrP106-126 A117V (pH 5) en bleu, PrP106-126 A117V (pH 7) en vert, PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S (pH 7) en mauve, et PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S (pH 7) en orange.



En effet, une différence d'approximativement 35 kcal/mol est observée pour PrP106-126 et PrP106-126 A117V lorsque le pH passe de 7 à 5. Ainsi, la protonation de l'His-111 semble contribuer grandement à la stabilité du dimère.

Afin de déterminer si cet accroissement dans l'énergie libre d'interaction est accompagné de modifications structurales, les structures des fragments obtenues à toutes les 100 ps ont été superposées et sont représentées dans la Figure 3. En comparant Fig. 3A avec 3B, et 3C avec 3D, on remarque clairement que la protonation de l'His-111 est accompagnée d'une rigidification de la structure du dimère. On note clairement que les dimères PrP106-126 et PrP106-126 A117V perdent leur forme de « V » à pH 5. Cette rigidification est également apparentée avec la taille du rayon de giration des dimères, tel qu'illustré dans la Figure 4. À un pH de 5, le rayon de giration de ces dimère est approximativement 2 à 3 Å plus long qu'à un pH de 7. Ainsi, ces dimères semblent adopter une conformation qui s'approche de l'allure d'une tige à un pH de 5, ce qui pourrait faciliter l'agrégation. Également, le pourcentage d'acides aminés ayant des angles phi-psi appartenant à une conformation de feuillet bêta augmente lorsque le pH passe de 7 à 5 pour le dimère sauvage (voir le Tableau IV). Étrangement, le pourcentage d'acides aminés ayant des angles phi-psi en conformation de feuillet bêta semble diminuer légèrement dans la structure moyenne du dimère PrP106-126 A117V. Toutefois, ces données sont peut-être dues au fait que la structure moyenne seulement fût sélectionnée pour ce calcul et que ce dimère a de grandes fluctuations atomiques à pH 7 qui seront discutées ci-bas. Néanmoins, en regardant la superposition des structures à

toutes les 100 ps (comparer Figs. 3C et 3D), il est clair que la structure s'est grandement rigidifiée et réorganisée à cause de la protonation de l'His-111.

Figure 3 : Superposition des structures obtenues à toutes les 100 ps des simulations. (A) PrP106-126 (pH 7); (B) PrP106-126 (pH 5); (C) PrP106-126 A117V (pH 7); (D) PrP106-126 (pH 7); (E) PrP106-126 (pH 5); (F) PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S (pH 7); (F) PrP106-126

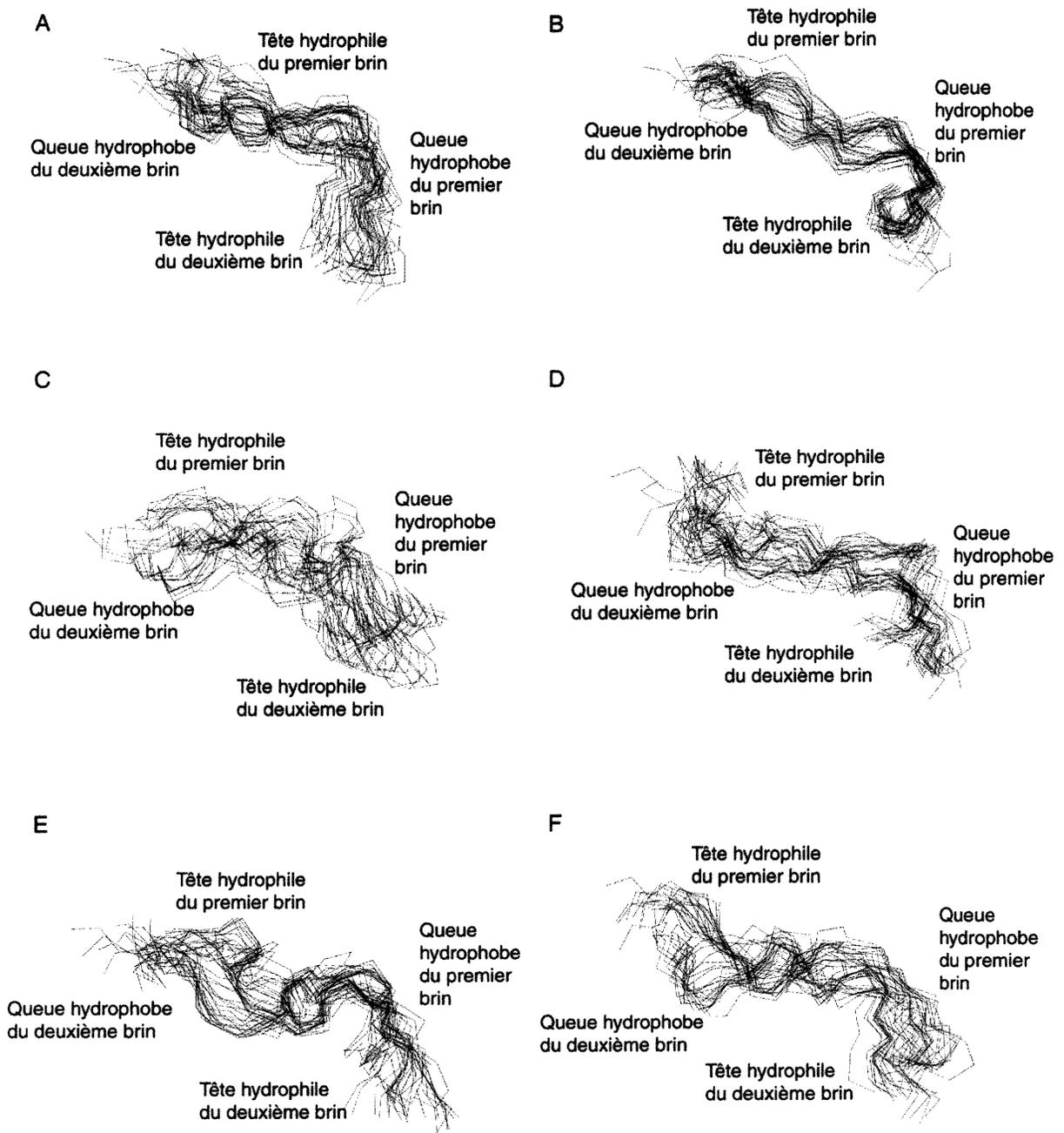


Figure 4 : Rayon de giration en angstrom pour chaque dimère au cours des simulations. Les dimères suivants y sont représentés : PrP106-126 (pH 7) en noir, PrP106-126 (pH 5) en bleu, PrP106-126 A117V (pH 7) en rouge, PrP106-126 A117V (pH 5) en mauve, PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S (pH 7) en orange, et PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S (pH 7) en vert.

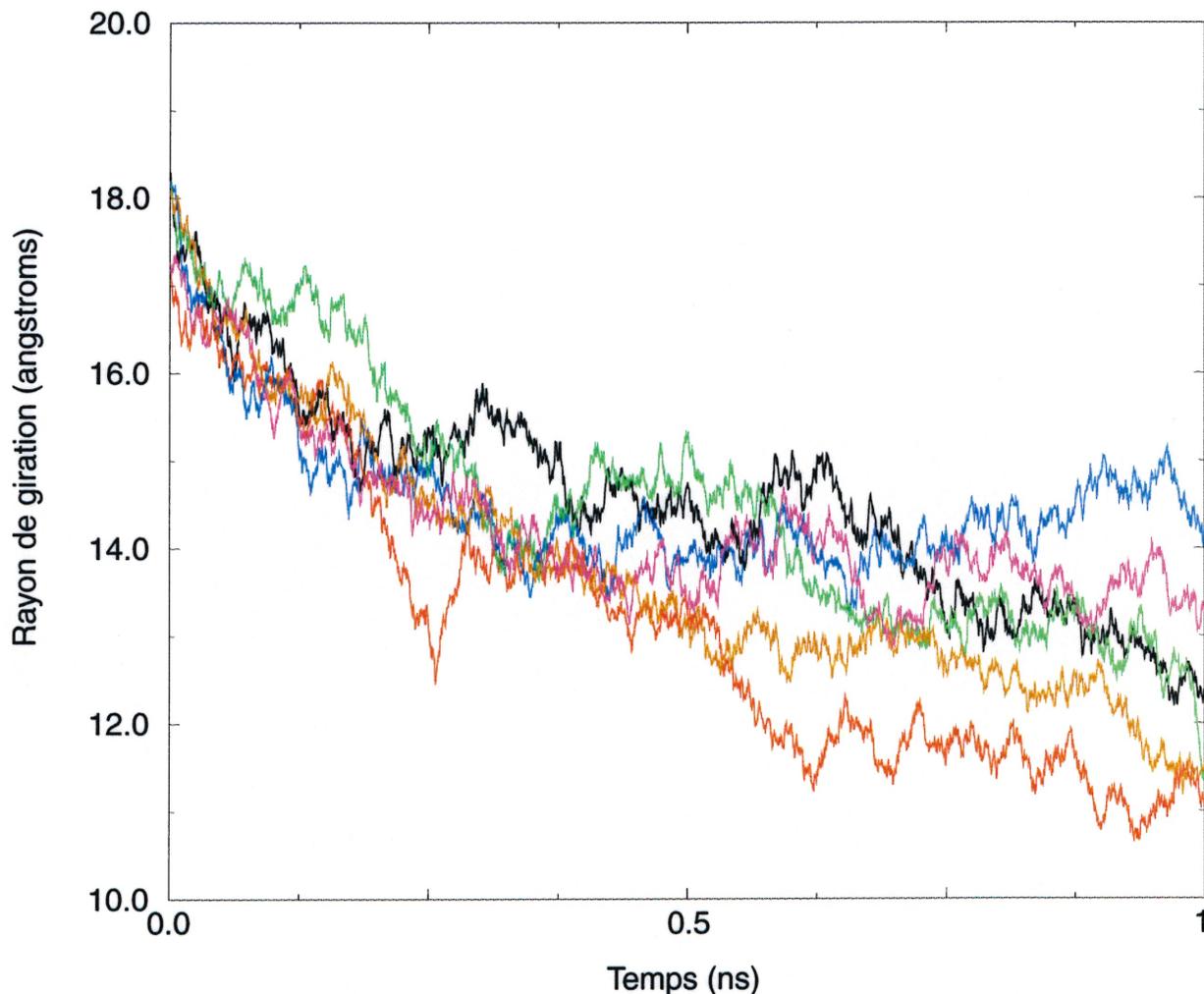


Tableau IV : Pourcentage des acides aminés dans la structure moyenne des dimères PrP106-126 et PrP106-126 A117V ayant des angles phi-psi appartenant à la conformation de feuillet bêta

Dimère	Pourcentage des acides aminés ayant des angles phi-psi en conformation feuillet bêta		Pourcentage des acides aminés ayant des angles phi-psi sans conformation définie (« random coil »)	
	PH 7	pH 5	pH 7	pH 5
PrP106-126	39.5 %	55.3 %	60.5 %	44.7 %
PrP106-126 A117V	42.1 %	36.9 %	57.9 %	63.1 %

La rigidification des dimères est bien illustrée par les données de fluctuations atomiques, mesurées pour les atomes du squelette N, C α et C au cours des dynamiques. Lorsque les Figures 5A et 5B, et 5C et 5D sont comparées, il est évident que beaucoup moins de fluctuations atomiques sont mesurées à un pH de 5. Ce changement dans les fluctuations atomiques est particulièrement apparent pour le dimère PrP106-126 A117V. À un pH de 7, les fluctuations atomiques des atomes du squelette de ce dimère sont beaucoup plus grandes que pour le dimère sauvage, surtout dans la queue hydrophobe des monomères (comparer les Figs. 5A et 5C). Il est possible que cet accroissement dans les fluctuations atomiques soit causé par la plus grande hydrophobicité de la valine qui remplace l'alanine à la position 117. Puisque la majorité des chaînes latérales pointent vers le solvant qui est polaire, un accroissement dans l'hydrophobicité du dimère pourrait résulter en l'augmentation des fluctuations atomiques. À un pH de 5, la protonation de l'His-111 semble contrer cet effet et on obtient un dimère où les fluctuations atomiques sont similaires à celle obtenues pour le dimère sauvage (comparer les Figs. 5B et 5D). Ainsi, la diminution du pH semble entraîner une optimisation des interactions inter-monomères, ce qui a pour effet de rigidifier la structure du dimère.

Certaines de ces interactions sont facilement observables en analysant les données de corrélation entre les déplacements des atomes (voir Eq. 3.13), tel qu'illustrées dans la Figure 6. L'étude des Figures 6A et 6C révèle la présence de mouvement de corps rigides. Malheureusement, le mouvement de ces corps rigides agit comme bruit de fond et obscurcit plusieurs des corrélations positives. Néanmoins, il est tout de même possible de décerner des corrélations positives entre le déplacement des atomes de la queue hydrophobe d'un monomère avec la tête hydrophile de l'autre monomère chez le dimère

Figure 5 : Fluctuations atomiques calculées à l'aide de la structure moyenne de chaque dimère obtenue au cours de la dernière 0,5 ns. (A) PrP106-126 (pH 7); (B) PrP106-126 (pH 5); (C) PrP106-126 A117V (pH 7); (D) PrP106-126 A117V (pH 5); (E) PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S (pH 7); (F) PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S (pH 7).

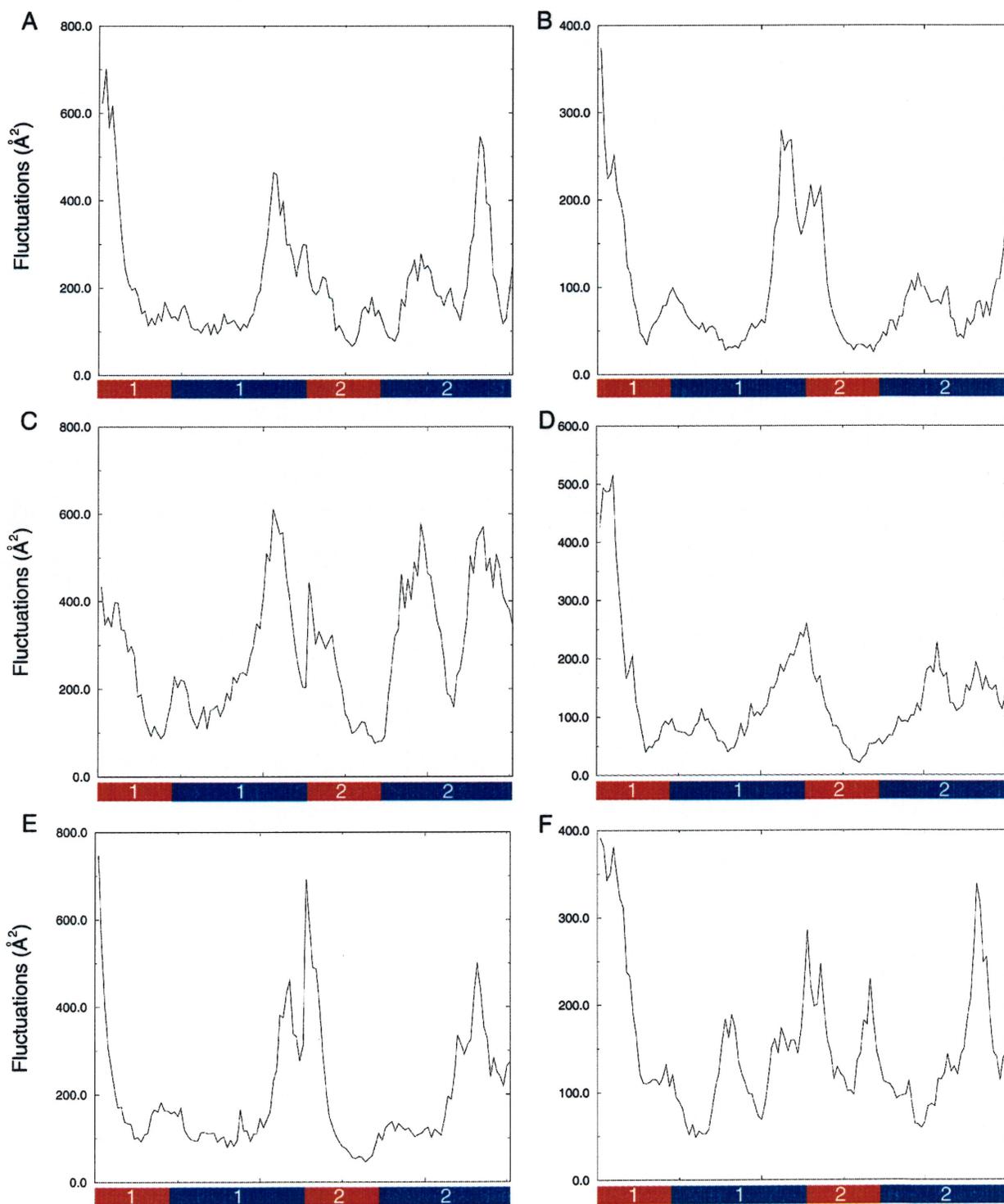
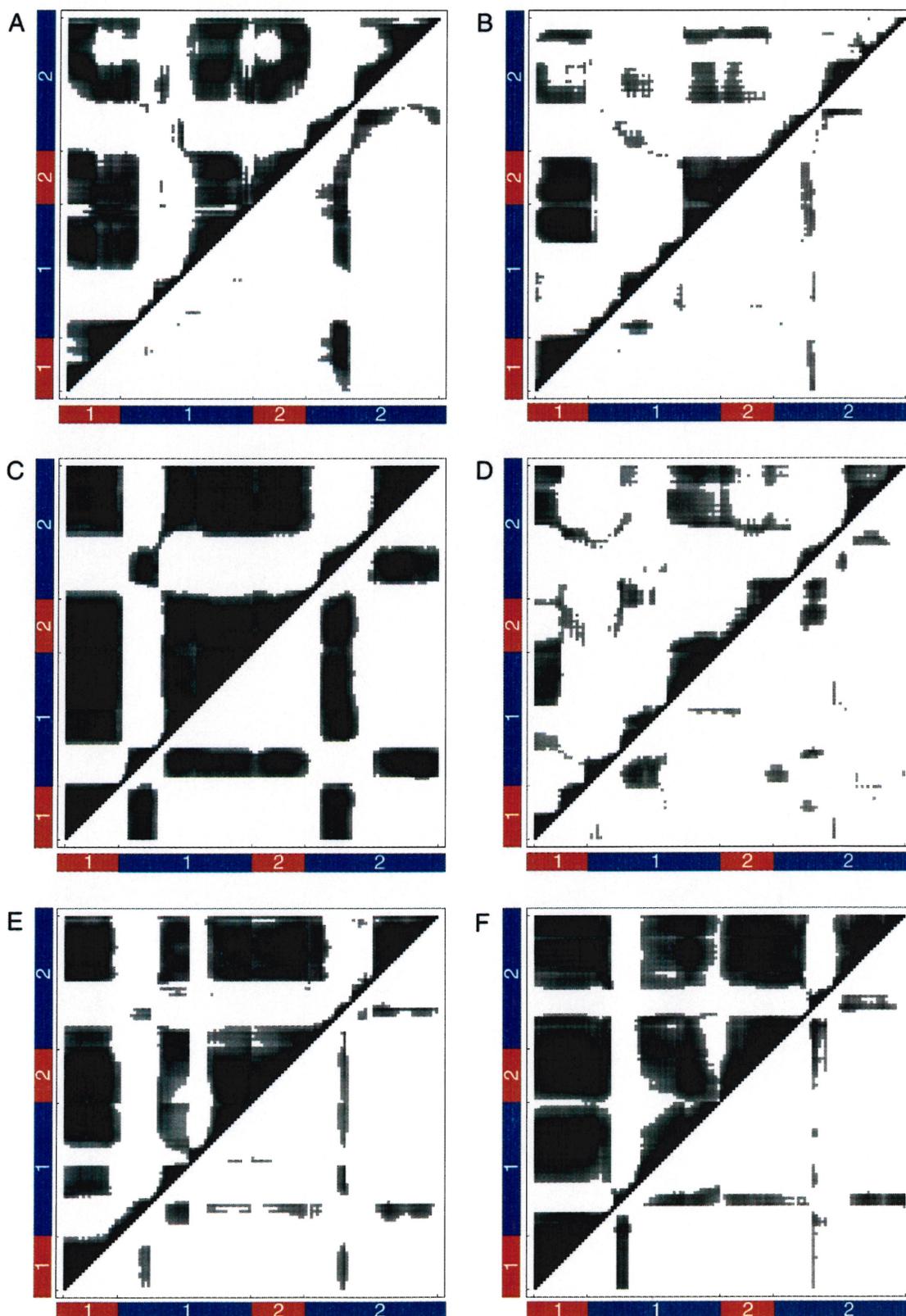


Figure 6 : Données de corrélation entre les déplacements d'atomes mesurées au cours des simulations. (A) PrP106-126 (pH 7); (B) PrP106-126 (pH 5); (C) PrP106-126 A117V (pH 7); (D) PrP106-126 A117V (pH 5); (E) PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S (pH 7); (F) PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S (pH 7).

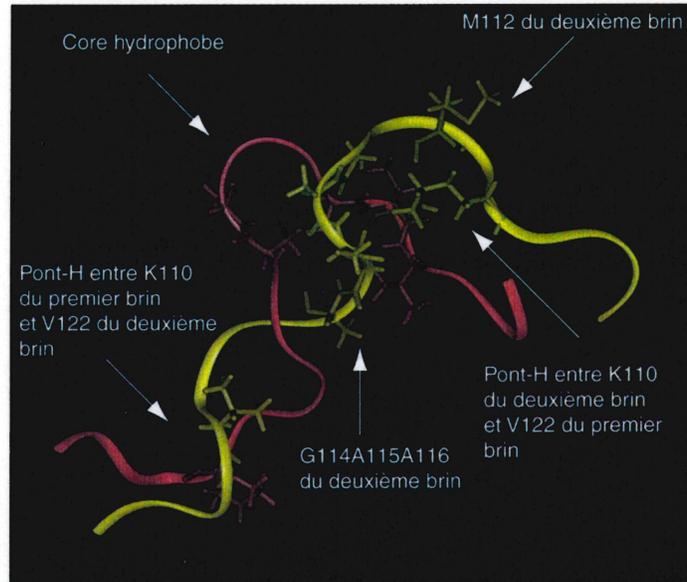


PrP106-126, tel qu'illustré dans la Figure 7. Ces interactions hydrophobes-hydrophiles sont possibles grâce à des interactions entre les chaînes latérales et le squelette du dimère. En particulier, on aperçoit des liaisons hydrogènes entre l'atome NZ de la Lys-110 du brin A et l'oxygène du carbonyle de la Val-122 du brin B, et entre l'oxygène du carbonyle de la Val-121 du brin A et l'atome NCE1 de la Lys-110 du brin B chez le dimère sauvage.

Chez la forme dimérique de PrP106-126 A117V, des liaisons hydrogènes sont aperçues entre l'oxygène du carbonyle de l'Ala-116 du brin A et l'atome NZ de la Lys-110 du brin B, entre l'atome HZ2 de la Lys-110 du brin A et l'oxygène du carbonyle de l'Ala-120 du brin B, entre l'oxygène du carbonyle de la Gly-126 du brin A et l'atome HN2 de la Lys-106 du brin B, et entre l'atome HZ1 de la Lys-106 du brin A et l'oxygène du carbonyle de la Gly-126 du brin B. Les interactions qui incluent la Lys-106, la Lys-110 et la Gly-126 avaient déjà été rapportées comme étant importantes pour la stabilisation du dimère (26). Certaines de ces interactions peuvent être aperçues dans la Figure 8. À noter que la majorité des autres chaînes latérales pointent vers le solvant dans les dimères sauvage et mutant à des pH de 5 et de 7, exposant donc une large surface hydrophobe, qui pourrait contribuer à l'agrégation des dimères. L'équipe de Salmona avait prédit que les chaînes latérales devraient pointer vers le solvant afin de maximiser les interactions avec d'autres dimères et permettre l'agrégation (33). De plus, chez PrP106-126 A117V, la chaîne latérale de la Val-117 pointent vers le solvant.

Figure 7 : Structure moyenne de PrP106-126 à (A) pH 7.0, et (B) pH 5.0. Les figures furent produites à l'aide de InsightII (36).

(A)



(B)

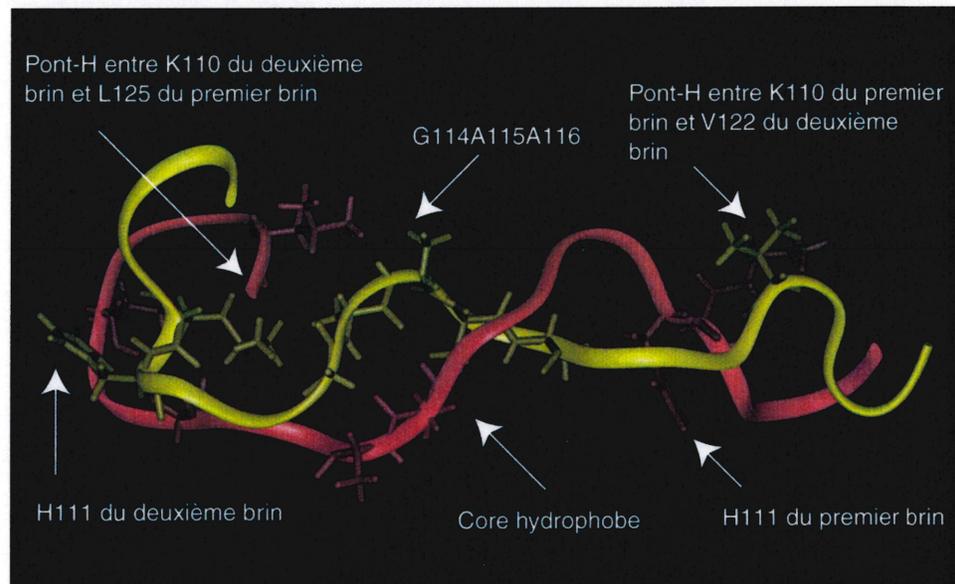
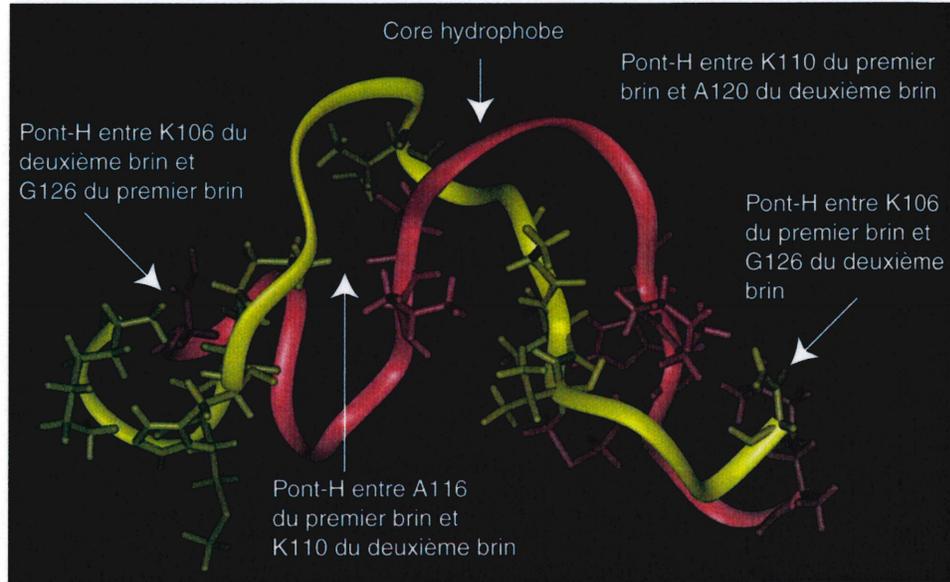
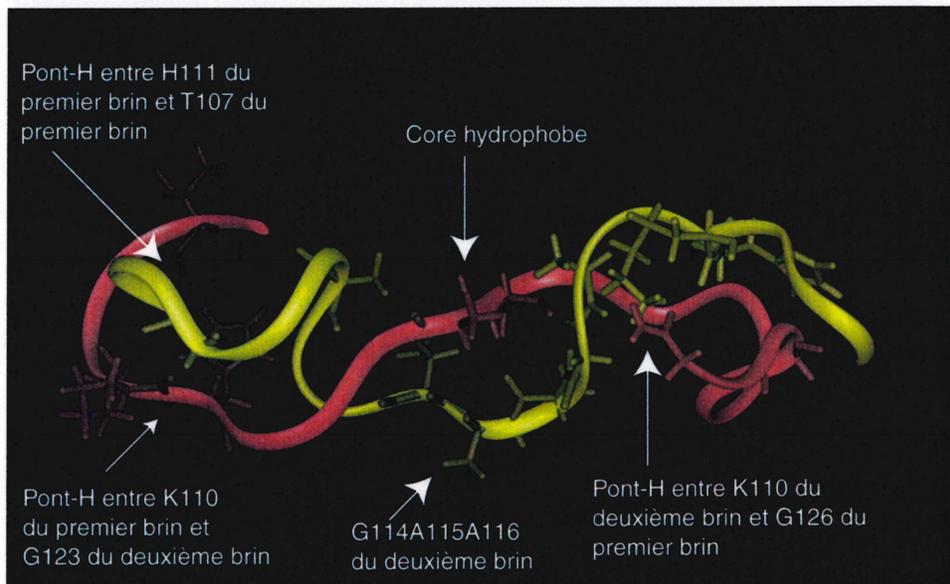


Figure 8 : Structure moyenne de PrP106-126 A117V à (A) pH 7.0, et (B) pH 5.0. Les figures furent produites à l'aide de InsightII (36).

(A)



(B)



Des anti-correlations peuvent également être aperçues dans les dimères PrP106-126 et PrP106-126 A117V à un pH de 7. En particulier, on remarque que les acides aminés Gly-114 à Ala-116 d'un brin sont anti-correlés avec la Met-112 de l'autre brin. Cette anti-correlation est présente dans les dimères PrP106-126 et 106-126 A117V à un pH de 7. Toutefois, les autres anti-correlations présentes chez PrP106-126 A117V à un pH de 7 sont masquées par les mouvements de corps rigides et les hautes fluctuations atomiques présentes dans ce dimère à ce pH. Ce grand mouvement des monomères chez PrP106-126 A117V est facilement observable dans la Fig. 3C. Très peu d'anti-correlations peuvent être discernées à un pH de 5. Néanmoins, on peut toujours apercevoir, plus faiblement, l'anti-correlation entre les acides aminés Gly-114 à Ala-116 et Met-112.

3.3.2 Effet de substitutions hydrophiles sur les interactions inter-monomères dans la forme dimérique de PrP106-126

La queue hydrophobe de PrP106-126 a déjà été impliquée dans l'aggrégation et la neurotoxicité de cette protéine (29). À l'aide de substitutions hydrophiles, l'équipe de Cappai a démontré l'importance de ces acides aminés. En effet, lorsque ces acides aminés hydrophobes sont remplacés par des acides aminés hydrophiles, aucune aggrégation ou neurotoxicité est observée. Il était donc intéressant d'étudier ces mutants par dynamique moléculaire. Deux mutants furent choisis : PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S et PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S.

Dès les premières analyses des données de dynamique moléculaire, il était clair que ces substitutions hydrophiles engendrent de gros changements chez PrP106-126. Étonnamment, l'énergie libre d'interaction (voir Eq. 2.10) entre les deux brins des dimères mutants est plus grande que l'énergie libre d'interaction du dimère sauvage à pH 7 et

approche celle du dimère sauvage à pH 5, tel qu'illustré dans la Figure 2. En effet, une différence d'approximativement 35 kcal/mol est observée entre les deux dimères mutants PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S et PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S et le dimère sauvage PrP106-126 à un pH de 7. Il était attendu que cette énergie soit moindre que celle du dimère sauvage.

Afin de déterminer la cause de cette accroissement dans l'énergie libre d'interaction, les structures des fragments obtenues à toutes les 100 ps ont été superposées et sont représentées dans les Figs. 3E et 3F. En comparant Fig. 3A avec 3E et 3F, on remarque clairement que les substitutions hydrophiles engendrent une grosse réorganisation de la structure. On peut même apercevoir dans le mutant PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S que l'extrémité où il y a contact entre la tête hydrophile du brin A et la queue hydrophobe du brin B tend à vouloir se séparer. Ceci est également le cas, mais avec un effet de plus petite envergure, pour le mutant PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S. En général, les brins des deux mutants sont plus espacés que ceux des dimères PrP106-126 et PrP106-126 A117V. Toutefois, le rayon de giration des deux mutants est comparable à celui du dimère sauvage à pH 7, tel qu'illustré dans la Figure 4. Conséquemment, les changements observés à la suite des substitutions hydrophiles semblent être causés par une réorganisation interne, peut-être des chaînes latérales.

Les données de fluctuations atomiques, mesurées pour les atomes du squelette N, C α et C au cours des dynamiques, sont illustrées dans les Figs. 5E et 5F. Comme prévu, les fluctuations atomiques mesurées pour le dimère PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S sont beaucoup plus grandes que celles mesurées pour le

dimère sauvage (comparer Fig. 5A et 5E). Ces fluctuations représentent bien la tendance de ce dimère à se séparer à une extrémité. Les fluctuations atomiques mesurées pour PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S ressemblent à celles mesurées pour PrP106-126 à un pH de 5 (comparer Fig. 5B et 5F). Toutefois, de plus grandes fluctuations atomiques sont observées dans la partie centrale du dimère, plus précisément dans la région des substitutions hydrophiles. Néanmoins, ces fluctuations sont tout de même de moitié de celles observées pour PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S. Il est possible que ces plus petites fluctuations soient dûes au fait que les substitutions hydrophiles dans PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S ne sont pas une à la suite de l'autre. En effet, deux acides aminés hydrophobes se retrouvent aux positions 119 et 120, pouvant donc contribuer à la force hydrophobe et faciliter une interaction favorable entre les deux monomères.

Certaines des interactions inter-monomères sont facilement observables en analysant les données de corrélation entre les déplacements des atomes (voir Eq. 2.13), tel qu'illustrées dans les Figs. 6E et 6F. L'étude des Figures 6E et 6F révèle la présence de mouvement de corps rigides. Malheureusement, le mouvement de ces corps rigides agit comme bruit de fond et obscurcit plusieurs des corrélations positives. Néanmoins, il est tout de même possible de décerner des corrélations positives entre le déplacement des atomes de la queue hydrophobe d'un monomère avec la tête hydrophile de l'autre monomère des dimères, tel qu'illustré dans les Figs. 9 et 10. Ces interactions hydrophobes-hydrophiles sont possibles grâce à des interactions entre les chaînes latérales et le squelette du dimère. Plusieurs liaisons hydrogènes sont aperçues entre des chaînes latérales et le squelette, telles que décrites dans les Tableaux V et VI.

Figure 9 : Structure moyenne de PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S à pH 7.0.
La figure fût produite à l'aide de InsightII (36).

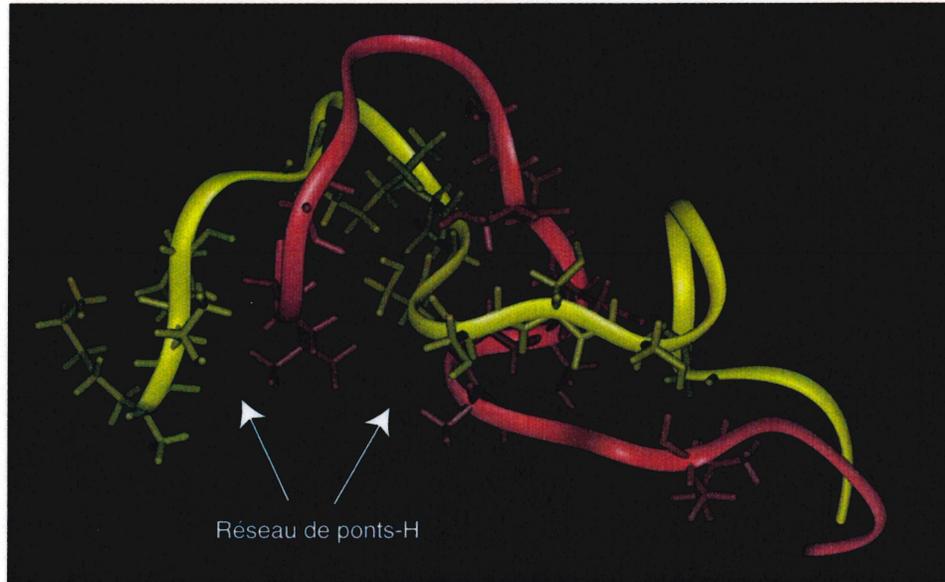
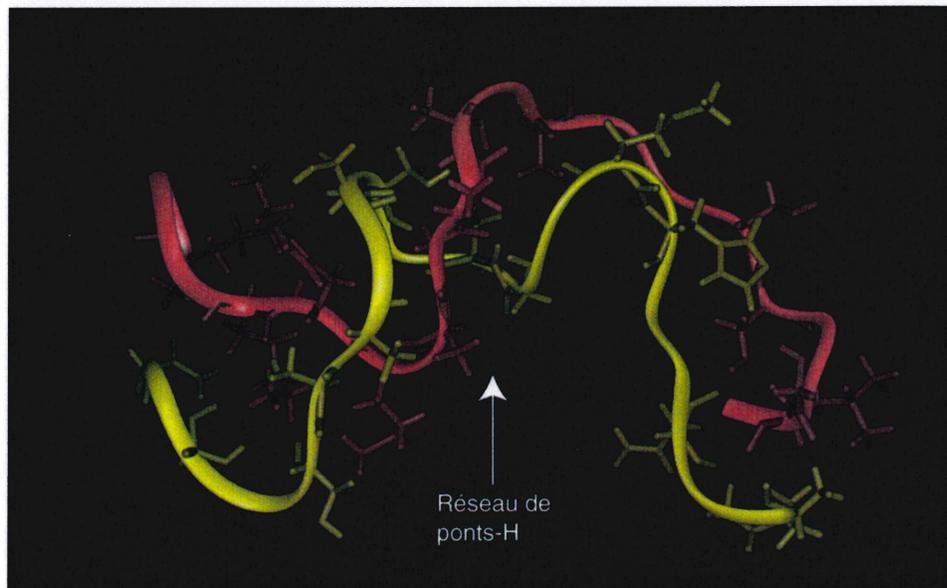


Figure 10 : Structure moyenne de PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S à pH 7.0.
La figure fût produite à l'aide de InsightII (36).



Dans ces mutants, on retrouve également des liaisons hydrogène impliquant Lys-106, Lys-110 et Gly-126, supportant un rôle pour ces résidus dans la stabilité des dimères (26).

Tableau V : Liaisons hydrogènes retrouvées dans le dimère PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S à pH 7

Brin A	Brin B
Oxygène du carbonyle de Ser-117	Atome HG de Ser-117
Oxygène du carbonyle de Ser-116	Atome HG de Ser-118
Oxygène du carbonyle de Gly-123	Atome HG de Ser-115
Atome HG de Ser-118	Atome OG de Ser-115
Atome OG de Ser-116	Atome HN de Gly-123
Atome HN de Gly-114	Oxygène du carbonyle de Gly-114
Oxygène du carbonyle de Gly-124	Atome HG de Thr-107
Atome HG de Ser-117	Oxygène du carbonyle de Ala-113
Oxygène du carbonyle de Gly-123	Atome HG de Ser-115
Atome HN de Lys-110	Oxygène du carbonyle de Gly-123
Oxygène du carbonyle de Gly-119	Atome HZ1 de Lys-110

Tableau VI : Liaisons hydrogènes retrouvées dans le dimère PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S à pH 7

Brin A	Brin B
Atome HN1 de Lys-106	Oxygène du carbonyle de Gly-126
Atome HZ2 de Lys-110	Oxygène du carbonyle de Gly-124
Atome HCE1 de Lys-110	Oxygène du carbonyle de Ser-122
Atome HG de Ser-121	Oxygène du carbonyle de Lys-110
Atome HN de Met-112	Oxygène du carbonyle de Ala-120
Oxygène du carbonyle de Ala-113	Atome HN de Ala-120
Atome HN de Ala-115	Oxygène du carbonyle de Ser-118
Oxygène du carbonyle de Gly-114	Atome HN de Gly-114
Oxygène du carbonyle de Ala-116	Atome HG de Ser-117
Atome HN de Ser-118	Oxygène du carbonyle de Met-112
Atome HG de Ser-122	Oxygène du carbonyle de Asn-108
Atome HN2 de Lys-126	Oxygène du carbonyle de Gly-124

Il est intéressant de noter que plusieurs des chaînes latérales pointent vers le solvant. Toutefois, ces dimères possèdent moins d'acides aminés hydrophobes, exposant donc une surface hydrophobe moins large et une surface hydrophile plus grande. L'exposition d'une surface hydrophile au solvant polaire pourrait expliquer pourquoi ces

dimères peuvent plus difficilement former des agrégats. Leur surface hydrophile leur permet de rester soluble dans un environnement hydrophile plus facilement.

Des anti-corrélations peuvent également être aperçues dans les dimères PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S et PrP106-126 A117S/A118S/V121S/V122S à un pH de 7. On remarque que les acides aminés Gly-114 à Ala-116 d'un brin sont anti-corrélés avec la Met-112 de l'autre brin, tel que pour les dimères PrP106-126 et PrP106-126 A117V.

3.4 Conclusion

Les changements conformationnels et physicochimiques observés chez PrP106-126 lorsque le pH passe de 7 à 5 sont extrêmement intéressants. Toutefois, la cause exacte du polymorphisme conformationnel observé chez PrP106-126 demeure obscure. Au cours des simulations effectuées dans ce travail, la sensibilité de PrP106-126 au pH est évidente. Chez la forme dimérique de PrP106-126 et PrP106-126 A117V, l'acidification du pH cause une réorganisation des interactions inter-monomères et une rigidification du dimère. De plus, l'énergie libre d'interaction est approximativement 35 kcal/mol plus élevée à un pH de 5. Il est fascinant de voir que la protonation d'un seul acide aminé, l'His-111, pourrait causer tous les changements rapportés.

Toutefois, la queue hydrophobe du peptide a également été impliquée dans l'agrégation et la neurotoxicité de PrP106-126 (29). Il a été suggéré que les interactions hydrophobes pourraient faciliter la formation de liaisons hydrogènes en tenant les monomères à la distance appropriée (29). Expérimentalement, l'équipe de Cappai avait démontré que des substitutions hydrophiles dans la queue hydrophobe compromettaient l'agrégation et la neurotoxicité de PrP106-126 (29). Au cours des simulations d'une

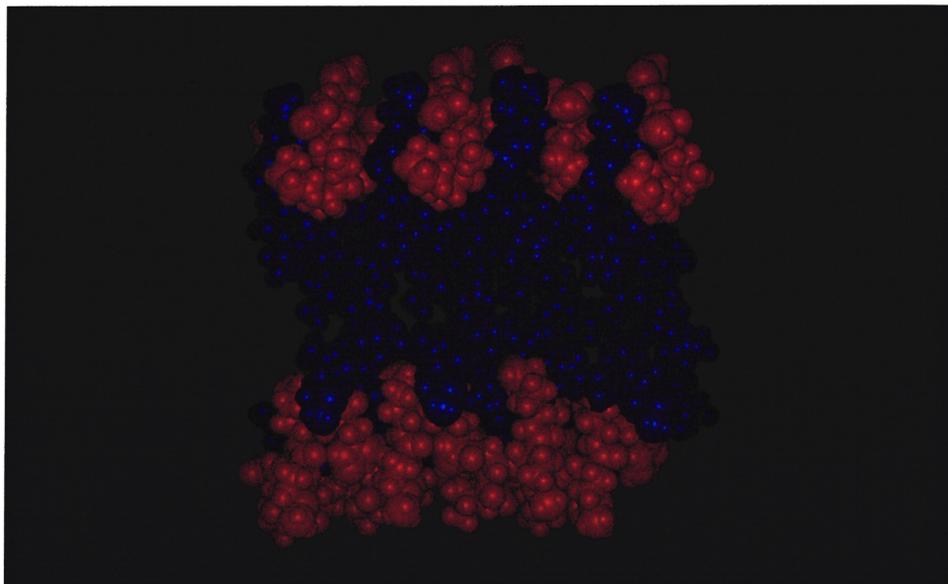
nanoseconde effectuées sur PrP106-126 A115S/A116S/A117S/A118S et PrP106-126 A117S/A118SV121S/V122S, une importante réorganisation est notée. Au lieu de voir les monomères se séparer, les dimères se réorganisent, des liaisons hydrogènes sont formées et les chaînes latérales de plusieurs des acides aminés hydrophiles substitués se tournent vers le solvant. Cette réorganisation pourrait expliquer la perte de neurotoxicité observé *in vitro* ainsi que la perte d'agrégation. Comme il a été suggéré ailleurs (33), l'agrégation dépendrait de l'interaction entre les chaînes latérales hydrophobes de PrP106-126 qui pointent vers le solvant. Ainsi, lorsqu'il y a diminution de la surface hydrophobe, l'agrégation se fait plus ardue. Les structures obtenues des simulations effectuées sur PrP106-126 et PrP106-126 A117V démontrent bien que la majorité des chaînes latérales hydrophobes pointent vers le solvant, ainsi créant une large surface hydrophobe pouvant servir de lieu de « docking » pour d'autres molécule de PrP106-126 et catalyser l'agrégation. Ces mêmes observations ont été faites pour l'Alzheimer (30-32).

Cette organisation de PrP106-126 en deux parties, une tête hydrophile et une queue hydrophobe, est intrigante. Cette division laisse présager que ce peptide pourrait peut-être former des complexes dans les membranes. Il a été indépendamment démontré que la formation de canaux transmembrannaires perméables au calcium pourrait expliquer la neurotoxicité de PrP106-126 (20, 21). Quoique récemment contesté (69), les équipes qui ont démontré leur présence l'ont fait indépendamment avec des sources différentes de PrP106-126. De plus, la formation de ce type de canaux a également été impliqué dans des maladies telles que l'Alzheimer et le diabète mellitus de type 2 (21-24). Il serait extrêmement intéressant de répéter ces simulations sur la protéine A β de

l'Alzheimer ainsi que sur l'amyline humaine des îlots impliquée dans le diabète afin d'étudier leur comportement.

Chez PrP016-126, l'adoption d'une conformation plus organisée, plus spécifiquement en feuillet bêta, pourrait peut-être faciliter l'intégration du dimère aux membranes. Les interactions entre les chaînes latérales hydrophobes de différentes molécules de PrP106-126 ainsi qu'avec les lipides des membranes feraient sûrement de ce complexe un canal assez stable. Une organisation possible de ce canal est illustré dans la Figure 11.

Figure 11 : Organisation possible d'un canal transmembranaire PrP106-126 perméable au calcium. Les résidus colorés en rouge représentent la tête hydrophile tandis que les résidus colorés en bleu représentent la queue hydrophobe. La figure a été construite avec InsightII (36).



De plus amples études sur PrP106-126 vont certainement révéler d'intéressantes facettes des maladies à prion. La possibilité de ne travailler qu'avec un petit fragment de la protéine prion simplifie grandement la tâche. La présence de la mutation A117V impliquée dans le GSS fait de ce peptide un objet de recherche des plus intéressants. Une

meilleure compréhension des interactions responsables de l'agrégation de ce peptide amènera sûrement des composés capables de prévenir l'agrégation et la neurotoxicité associée à PrP106-126.

3.5 Références

1. De Gioia, L., Selvaggini, C., Ghibaudi, E., Diomede, L., Bugiani, O., Forloni, G., Tagliavini, F., et Salmona, M. (1994) Conformational polymorphisms of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein, *J. Biol. Chem.* **269**, 7859-7862
2. Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G., Salmona, M., Bugiani, O., et Frangione, B. (1993) Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9678-9682
3. Doh-ura, K., Tateishi, J., Sasaki, H., Kitamoto, T., et Sakaki, Y. (1989) Pro→Leu change at position 102 of prion protein is the most common but not sole mutation related to Gerstmann-Straüssler syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 974-979
4. Hsiao, K.K., Cass, C., Schellenberg, G.D., Bird, T., Devine-Gage, E., Wisniewski, H., et Prusiner, S.B. (1991) A prion protein variant in a family with the telencephalic form of Gerstmann-Straüssler-Scheinker syndrome, *Neurology* **41**, 681-684
5. Mastrianni, J.A., Curtis, M.T., Oberholtzer, J.C., Da Costa, M.M., DeArmond, S., Prusiner, S.B., et Garbern, J.Y. (1995) Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia, *Neurology* **45**, 2042-2050
6. Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F.E., et Prusiner, S.B. (1996) Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15457-15462
7. Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., et Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* **362**, 543-546
8. Forloni, G., Del Bo, R., Angeretti, N., Chiesa, R., Smioldo, S., Doni, R., Ghibaudi, E., Salmona, M., Porro, M., Verga, L., *et al.* (1994) A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy, *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1415-1422
9. Brown, D.R., Schmidt, B., et Kretzschmar, H.A. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* **380**, 345-347

10. Selvaggini, C., De Gioia, L., Cantù, L., Ghibaudi, E., Diomede, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., et Salmona, M. (1993) Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 1380-1386
11. Brown, D.R., Herms, J., et Kretzschmar, H.A. (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment, *Neuroreport* **5**, 2057-2060
12. Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., et Aguzzi, A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity, *Nature* **379**, 339-343
13. Hope, J., Shearman, M.S., Baxter, H.C., Chong, A., Kelly, S.M., et Price, N.C. (1996) Cytotoxicity of prion protein peptide (PrP106-126) differs in mechanism from the cytotoxic activity of the Alzheimer's disease amyloid peptide, A beta 25-35, *Neurodegeneration* **5**, 1-11
14. Diomede, L., Soggani, S., Luini, W., Algeri, M., De Gioia, L., Chiesa, R., Lievens, P.M.J., Buziani, O., Forloni, G., Tagliavini, F., et Salmona, M. (1996) Activation effects of a prion protein fragment [PrP-(106-126)] on human leucocytes, *Biochem. J.* **329**, 563-570
15. Brown, D.R., Herms, J.W., Schmidt, B., et Kretzschmar, H.A. (1997) Different requirements for the neurotoxicity of fragments of PrP and β -amyloid, *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1162-1169
16. Brown, D.R., Schmidt, B., et Kretzschmar, H.A. (1998) Prion protein fragment interacts with PrP-deficient cells, *J. Neurosci. Res.* **52**, 260-267
17. Brown, D.R., Pitschke, M., Riesner, D., et Kretzschmar, H.A. (1998) Cellular effects of a neurotoxic prion protein peptide are related to its β -sheet content, *Neurosci. Res. Commun.* **23**, 119-128
18. Salmona, M., Forloni, G., Diomede, L., Algeri, M., De Gioia, L., Angeretti, N., Giaccone, G., Tagliavini, F., et Bugiani, O. (1997) A neurotoxic and gliotrophic fragment of the prion protein increases plasma membrane microviscosity, *Neurobiol. Dis.* **4**, 47-57

19. Brown, D.R. (2000) Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the Ala¹¹⁷→Val mutation, *Biochem. J.* **346**, 785-791
20. Lin, M.-C., Mirzabekov, T., et Kagan, B.L. (1997) Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment, *J. Biol. Chem.* **272**, 44-47
21. Kawahara, M., Kuroda, Y., Arispe, N., Rojas, E. (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism, *J. Biol. Chem.* **275**, 14077-14083
22. Arispe, N., Rojas, E., et Pollard, M. (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 567-571
23. Mirzabekov, T., Lin, M.-C., Yuan, W.L., Marshall, P., Carman, M., Tomaselli, K., Lieberburg, I., et Kagan, B.L. (1994) Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1142-1148
24. Mirzabekov, T., Lin, M.-C., et Kagan, B.L. (1996) Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin, *J. Biol. Chem.* **271**, 1988-1992
25. Florio, T., Thellung, S., Amico, C., Robello, M., Salmona, M., Bugiani, O., Tagliavini, F., Forloni, G., et Schettini, G. (1998) Prion protein fragment 106-126 induces apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in the GH3 cell line, *J. Neurosci. Res.* **54**, 341-352
26. Salmona, M., Malesani, P., De Gioia, L., Gorla, S., Bruschi, M., Molinari, A., Della Vedova, F., Pedrotti, B., Marrani, M.A., Awan, T., Bugiani, O., Forloni, G., et Tagliavini, F. (1999) Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106-126, *Biochem. J.* **342**, 207-214
27. Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P., et Autilio-Gambetti, L. (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases, *J. Biol. Chem.* **270**, 19173-19180
28. Hedge, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., et Lingappa, V.R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease, *Science* **279**, 827-834

29. Jobling, M.F., Stewart, L.R., White, A.R., McLean, C., Friedhuber, A., Maher, F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Barrow, C.J., Collins, S.J., et Cappai, R. (1999) The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106-126, *J. Neurochem.* **73**, 1557-1565
30. Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L., et Beyreuther, K. (1992) Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease β A4 peptide, *J. Mol. Biol.* **228**, 460-473
31. Pike, C.J., Burdick, D., Walencervicz, A.J., Glabe, C.G., et Cotman, C.W. (1993) Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides *in vitro*: the role of peptide assembly state, *J. Neurosci.* **13**, 1676-1687
32. Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., et Cotman, C.W. (1995) Structure-analyses of β -amyloid peptides: contributions of the β 25-35 region to aggregation and neurotoxicity, *J. Neurochem.* **13**, 1676-1687
33. Ragg, E., Tagliavini, F., Malesani, P., Montialli, L., Bugiani, O., Forloni, G., et Salmona, M. (1999) Determination of solution conformations of PrP106-126, a neurotoxic fragment of prion protein, by ^1H NMR and restrained molecular dynamics, *Eur. J. Biochem.* **266**, 1192-1201
34. Kazmirski, S.L., Alonso, D.O.V., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., et Daggett, V. (1995) Theoretical studies of sequence effects on the conformational properties of a fragment of the prion protein: implications for scrapie formation, *Chem. Biol.* **2**, 305-315
35. Huang, Z., Gabriel, J.-M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., et Cohen, F.E. (1994) Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7139-7143
36. InsightII, BioSym Technologies, Inc.
37. Brooks, B.R., Brucoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., et Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem.* **4**, 187-217
38. MacKerell, A.D. Jr., Bashford, D., Bellott, M., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnier, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., et Karplus, M. (1998)

All-atom potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins, *J. Phys. Chem. B.* **102**, 3586-3616-> 37

39. Daggett, V., et Levine, M. (1993) Realistic simulations of native-protein dynamics in solution and beyond, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 353-380
40. Brooks, C., et Case, D. (1993) Simulations of peptide conformational dynamics and thermodynamics, *Chem. Rev.* **93**, 2487-2502
41. David, L. Modélisation des interactions électrostatiques des biomolécules en solution. Thèse au laboratoire de dynamique moléculaire de l'Institut de biologie structurale de Grenoble, 18 oct 1996
42. Harvey, S.C. (1989) Treatment of electrostatic effects in macromolecular modeling, *Proteins* **5**, 78-92
43. Sharp, K.A., et Honig, B. (1990) Electrostatic interactions in macromolecules : theory and applications, *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 301-332
44. Guenot, J., et Kollman, P.A. (1992) Molecular dynamics studies of a DNA-binding protein : 2. An evaluation of implicit and explicit solvent models for the molecular dynamics simulation of the Escherichia coli trp repressor, *Protein Sci.* **1**, 1185-1205
45. Gilson, M.K., Rashin, A., Fine, R., Honig, B. (1985) On the calculation of electrostatic interactions in proteins, *J. Mol. Biol.* **184**, 503-516
46. Warwicker, J., et Watson, H.C. (1982) Calculation of the electric potential in the active site cleft due to alpha-helix dipoles, *J. Mol. Biol.* **157**, 671-679
47. Gilson, M.K., et Honig, B. (1988) Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system : solvation energies, binding energies, and conformational analysis, *Proteins* **4**, 7-18
48. Zauhar, R.J., et Morgan, R.S. (1985) A new method for computing the macromolecular electric potential, *J. Mol. Biol.* **186**, 815-820
49. Yoon, B.J., et Lenhoff, A.M. (1990) *J. Comput. Chem.* **11**, 1080

50. Davis, M.E., Madura, J.D., Luty, B.A., et McCammon, J.A. (1991) *Comput. Phys. Commun.* **62**, 187
51. You, T.J., et Harvey, S.C. (1993) *J. Comput. Chem.* **14**, 484
52. Still, W.C., Tempczyk, A., Hawley, R.C., et Hendrickson, T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127
53. Clark Still, W., Tempczyk, A., Hawley, R.C., et Hendrickson, T.J. (1990) Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127-6129
54. Honig, B., et Nicholl, A., (1995) Classical electrostatic in biology and chemistry, *Science* **268**, 1144-1149
55. Qiu, D., Shenkin, P.S., Hollinger, F.P., et Clark Still, W. (1997) The GB/SA continuum model for solvation. A fast analytical method for the calculation of approximate Born radii, *J. Phys. Chem. A* **101**, 3005-3014
56. David, L., Luo, R., et Gilson, M.K. (2000) Comparison of generalized Born and Poisson models: energetics and dynamics of HIV protease, *J. Comp. Chem.* **21**, 295-309
57. David, L., Luo, R., Head, M.S., et Gilson, M.K. () Computational study of KNI-272, a potent inhibitor of HIV-1 protease: on the mechanism of preorganization, *J. Phys. Chem. B*
58. Eisenberg, D., et McLachlan, A.D. (1986) Solvation energy in protein folding and binding, *Nature* **319**, 199-203
59. Ooi, T., Oobatake, M., Nemethy, G., et Scheraga, H.A. (1987) Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3086-3090
60. McCammon, J.A., et Harvey, S.C. (1987) *Harvey Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press
61. Sitkoff, D., Sharp, K.A., et Honig, B. (1994) *J. Phys. Chem.* **98**, 1978

62. Mohamadi, F., Richards, N.G.J., Guida, W.C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T., et Clark Still, W. (1990) *J. Comput. Chem.* **11**, 440

63. Manunta, M., Kunz, B., Sandmeier, E., Christen, P., et Schindler, H. (2000) Reported channel formation by prion protein fragment 106-126 in planar lipid bilayers cannot be reproduced, *FEBS Lett.* **474**, 255-256

Chapitre 4:

Conclusion

Les maladies à prion sont des phénomènes spectaculaires du point de vue des recherches sur le repliement de protéine. La preuve qu'une protéine peut facilement exister en deux conformations quasi aussi stables l'une que l'autre force une réévaluation de la vue qu'une séquence d'acides aminés ne peut adopter qu'une seule conformation. Le problème du repliement des protéines est difficile et des maladies telles que les ESTs révèlent des facettes intéressantes de ce problème. La trouvaille intéressante de ce type de phénomène dans les levures augmente encore plus le besoin de mieux comprendre ce genre d'évènement.

Toutefois, vu la complexité du problème, les ESTs demeurent des maladies obscures. Un prion infectieux n'a toujours pas été généré en laboratoire. Heureusement, récemment, l'équipe de Fred Cohen publiait la découverte de Cp-60, un composé capable d'inhiber *in vitro* la conversion du prion en sa forme pathogénique. Ces recherches vont sûrement résulter dans la découverte de thérapeutiques efficaces pour combattre ces maladies fatales. Les ESTs peuvent être vaincus de deux manières : l'inhibition des interactions inter-protéines et l'inhibition de l'expression de la protéine prion. Déjà, Cp-60 a été ciblé pour empêcher les interactions entre la protéine X et le prion et inhiber la conversion. Dans ce mémoire, je présente une étude par simulations dynamiques sur les interactions importantes dans l'agrégation de la région hydrophobe du prion qui comprend les résidus 106-126. Ce fragment est très conservé et lorsque éliminé inhibe la conversion du prion en sa forme pathogénique. L'inhibition de l'agrégation de ce fragment serait peut-être une bonne cible thérapeutique. Ce genre d'étude devrait

certainement être répété sur la protéine amyloïde β de l'Alzheimer afin de voir si le même genre d'interactions est présent dans ces agrégats.

L'autre cible thérapeutique possible consiste en l'inhibition de l'expression du prion. Dans le deuxième chapitre de ce mémoire, la présence d'un pseudonoeud a été décrit dans la région des répétitions de l'ARNm du prion. Possiblement, des antisens ciblés vers ce fragment d'ARNm pourraient être produits. Ceci empêcherait peut-être l'expression de la protéine et la progression de la maladie. Il serait intéressant de répéter l'étude sur la protéine Doppel même si cette protéine ne contient pas le domaine amino-terminal afin de voir si l'ARNm de cette protéine contient des motifs ayant des fonctions biologiques. Puisqu'on ne sait pas si Dpl joue un rôle dans le changement conformationnel du prion, les résultats de ce genre d'études combinés à des données biologiques pourraient aider à déterminer la fonction de Dpl. D'autres protéines à considérer seraient également la protéine amyloïde β de l'Alzheimer.

Les prochaines années dans ce domaine de recherche seront certainement palpitantes. Une meilleure compréhension des ESTs donnera sûrement fruit à des connaissances approfondies sur le repliement de protéines, et sera peut-être applicable à d'autres maladies telles que l'Alzheimer.