ÉPREUVE E3. UNITÉ U33

Biologie cellulaire et moléculaire et technologie d'analyse

LA PROTÉINE PRION

Calculatrice non autorisée

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles ou « maladies à prions » groupent des maladies humaines comme la maladie de Creutzfeld-Jakob et des maladies du bétail comme la tremblante du mouton ou la maladie de la vache folle (ESB pour encéphalopathie spongiforme bovine).
Ce sont des maladies neurodégénératrices causées par un type d'agent infectieux qualifié de non conventionnel. Il s'agirait d'une protéine dite « protéine prion », extrêmement résistante notée PrPsc (scrap = mouton), qui n'est qu'une forme différente d'une protéine normalement présente au niveau cellulaire, notée PrPc (c pour cellulaire).

1 - La protéine prion normale PrPc. (19 points)

1.1 - Dans sa forme normale, PrPc est une glycoprotéine membranaire d'environ 200 acides aminés issue d'un gène exprimé de manière constitutive dans la plupart des tissus avec néanmoins une expression plus importante au niveau du tissu nerveux. La protéine est ancrée à la membrane cellulaire via un résidu glycosylphosphatidylinositol (GPI).

1.1.1 - Que signifie le terme « expression constitutive » ?

1.1.2 - Le **document 1** présente la structure schématique de la protéine prion.

1.1.2.1 - Quel est le rôle de la séquence signal ?

1.1.2.2 - Décrire succinctement le mécanisme mis en jeu lors de la reconnaissance de cette séquence signal au niveau du réticulum endoplasmique.

1.1.3 - La protéine prion subit des modifications post traductionnelles.

1.1.3.1 - Quel est l'intérêt de ces modifications ?

1.1.3.2 - D'après le **document 1**, préciser les phénomènes mis en œuvre lors des modifications post-traductionnelles de PrPc.

1.1.4 - Sur quelle face de la bicouche lipidique se trouve la protéine prion ? Justifier la réponse.

1.2 - Une fois ancrée à la membrane, la protéine PrPc peut exercer son(ses) rôle(s) qui est(sont) encore débattu(s). En effet, des travaux sur des souris transgéniques dépourvues d'un gène fonctionnel codant pour la protéine prion montrent qu'elles sont viables et ne présentent apparemment pas d'anomalies. Toutefois les études basées sur des expériences menées *in vivo* et *in vitro* ont permis de proposer plusieurs pistes dont un rôle dans l'apoptose, un rôle dans la croissance axonale et la transmission synaptique.

1.2.1 - Définir l'apoptose.

1.2.2 - La présence de PrPc au niveau du compartiment présynaptique a été mise en évidence sur diverses photographies prises en immunomicroscopie électronique.
La technique immunohistochimique utilisée permet la détection des PrPc grâce à un anticorps couplé à la protéine A de *Staphylococcus aureus* sur laquelle est fixé de l'or colloïdal.

1.2.2.1 - Quel est l'intérêt d'un tel marqueur pour cette technique de détection ?

1.2.2.2 - Faire un schéma annoté du complexe moléculaire obtenu après réaction immunologique.

2 - La protéine prion anormale PrPsc. (10 points)

2.1 - La protéine prion PrPsc est une protéine prion anormalement repliée. Elle échappe ainsi au processus naturel de dégradation par les protéases.

Après sa réinternalisation par endocytose, elle s'accumule dans les lysosomes et le cytoplasme. Des agrégats se forment et donnent naissance à des plaques amyloïdes notamment au niveau des neurones.

2.1.1 - Quel est le rôle cellulaire des lysosomes ?

2.1.2 - Au début du processus d'endocytose, la membrane forme une invagination. Schématiser une invagination membranaire.

2.1.3 - En liaison avec le rôle des lysosomes, que se passe-t-il suite à cette invagination ?

2.1.4 - Proposer une explication aux troubles neurologiques consécutifs à la présence de la protéine prion anormale.

2.2 - PrPsc peut déformer par contact PrPc. Cette dernière devient alors une PrPsc supplémentaire. Ainsi la protéine prion est capable de se multiplier. C'est pourquoi on qualifie la PrPsc d'agent infectieux.

Quelle est la différence essentielle entre la protéine PrPsc, agent pathogène non conventionnel, et les autres agents pathogènes « classiques » tels une bactérie, une moisissure, un parasite ou un virus ?

3 - Dépistage de l'ESB dans les carcasses destinées à la consommation humaine.(31 points)

La détection du prion dans un tissu d'animal destiné à la consommation humaine est sans équivoque un signe de contamination. Plusieurs laboratoires ont donc mis sur le marché différents types de tests pour effectuer cette recherche.

3.1 - Le Prionics®-Check Western.

Approuvé en 1999 par l'Union Européenne, le Prionics®-Check Western est un immunoblotting particulièrement performant car capable de détecter le prion pathogène plusieurs mois avant que n'apparaissent les symptômes cliniques chez l'animal infecté.

La première phase des travaux a consisté à produire un anticorps monoclonal, le 6H4 qui a été breveté. Cet anticorps est capable de reconnaître aussi bien une protéine normale que la protéine anormale. Cela nécessite donc un test en 2 parties. Le protocole est donné au **document 2a**.

3.1.1 - Définir anticorps monoclonal.

3.1.2 - Donner les caractéristiques des cellules – en les nommant – impliquées dans la production des anticorps monoclonaux.

3.1.3 - Justifier l'étape de digestion enzymatique.

3.1.4 - Quel est le paramètre influençant la séparation électrophorétique ?

3.1.5 - Expliquer l'intérêt du transfert sur membrane de nitrocellulose.

3.1.6 - Définir ce qu'est un conjugué.

3.1.7 - Le **document 2b** schématise les résultats obtenus suite à l'analyse de 2 échantillons E1 et E2. Interpréter ces résultats.

3.2 - Le Prionics®-Check Priostrip.

Il s'agit d'un test immunochromatographique rapide présenté sous forme de peigne qu'il suffit de plonger dans les échantillons de prélèvements de cerveau homogénéisé et digérés (même préparation que pour le test précédent).

Le protocole est fourni **document 3**.

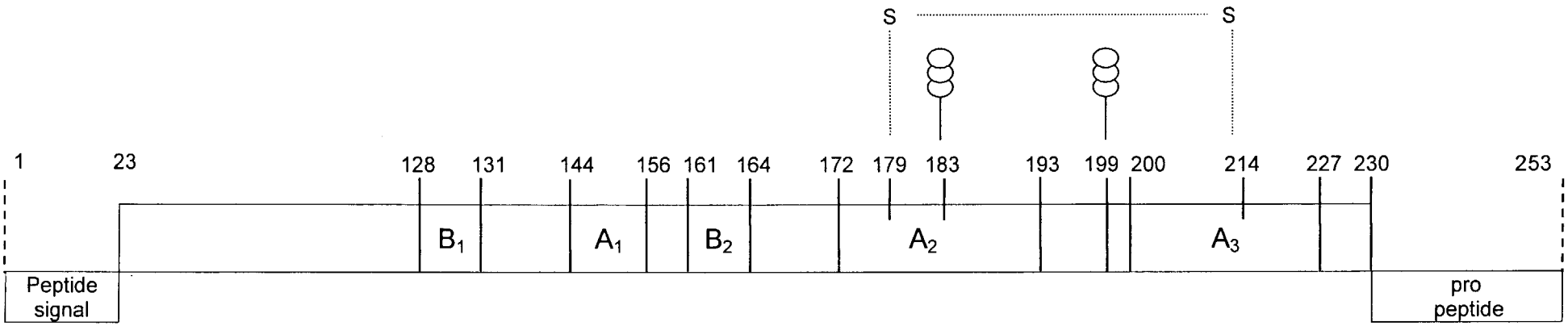
3.2.1 - Présenter succinctement les étapes de ce test.

3.2.2 - Quel est le rôle des billes de latex ?

3.2.3 - Interpréter les résultats des différentes bandelettes (de A à H) en précisant le rôle de la ligne supérieure.

3.2.4 - A quel type de technique immunologique connue s'apparente l'édifice moléculaire obtenu au niveau de la ligne inférieure ? Justifier la réponse par un schéma.

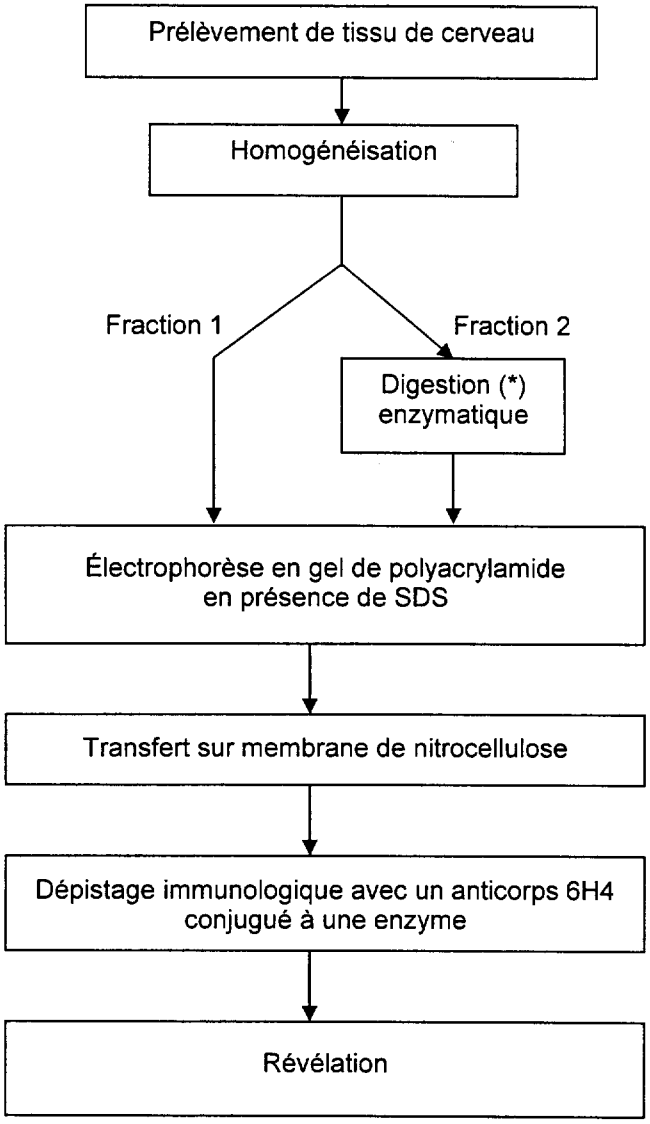
DOCUMENT 1 :
STRUCTURE SCHÉMATIQUE DE LA PROTÉINE PRION



1, 2, … , 253 : numérotation des acides aminés
A : hélice α
B : hélice β
: N glycane

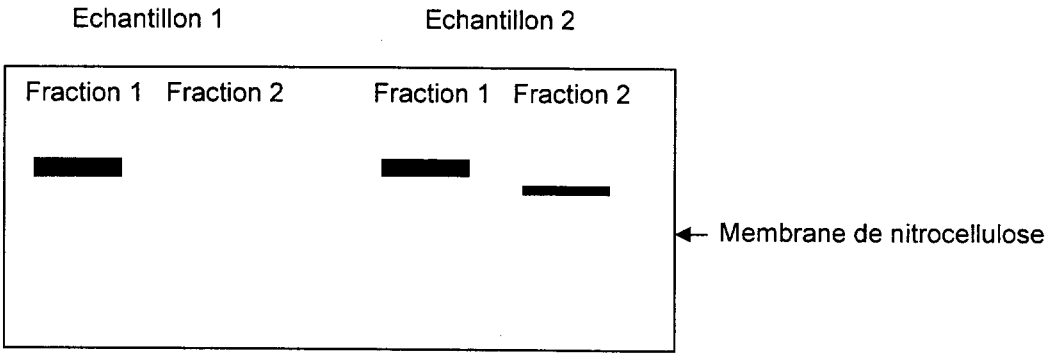
DOCUMENT 2 : PRIONICS®-CHECK WESTERN

a) Immunoblotting : protocole opératoire



(*) PrPc est totalement hydrolysée – PrPsc n'est hydrolysée que très partiellement, en bout de chaîne.

b) Résultats



DOCUMENT 3 :

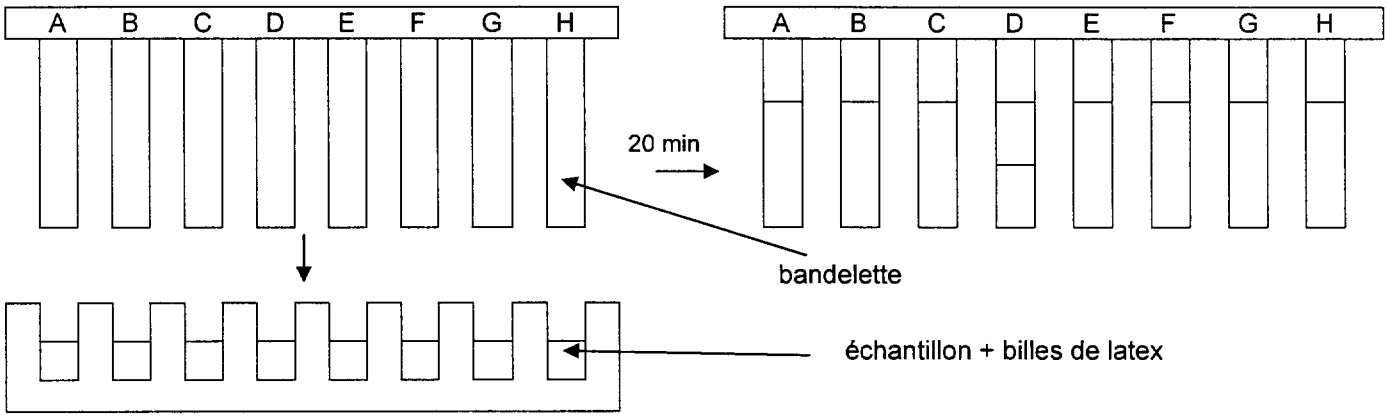
PRIONICS®-CHECK PRIOSTRIP

Les échantillons digérés sont mélangés dans un premier temps à un premier anticorps 6H4 conjugué à des billes de latex bleues, ceci dans les puits d'une plaque. Les peignes Priostip® sont plongés dans les puits pendant 20 minutes.

Sur chaque bandelette du peigne, 2 types d'anticorps sont fixés au niveau de 2 lignes distinctes :

- une ligne inférieure avec des anticorps 6H4 fixés,
- une ligne supérieure avec des anticorps anti 6H4 fixés.

Ces deux bandes sont initialement incolores.

• Peigne avec bandelettes à plonger dans les puits d'une plaque contenant les échantillons à analyser

• Résultats