



# Agrégats protéiques et maladies neurodégénératives

**Nadine Mestre Frances**  
Pr. EPHE

U 1198 INSERM-EPHE-Université de Montpellier

# Démences Neurodégénératives

## Alzheimer's disease (AD)

Peptide  $\beta$ -amyloïde  
Protéine Tau

## Huntington's disease (HD)

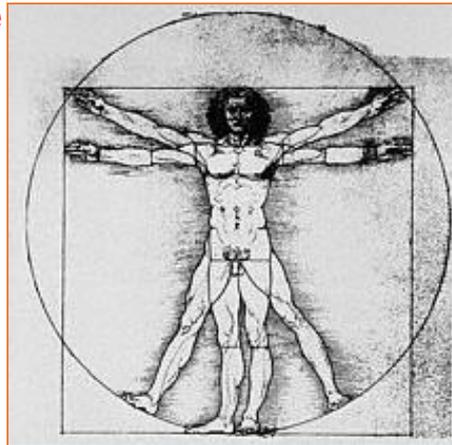
Huntingtine

## Parkinson's disease (PD)

$\alpha$ -synucléine

## Prion diseases (TSEs)

Prion



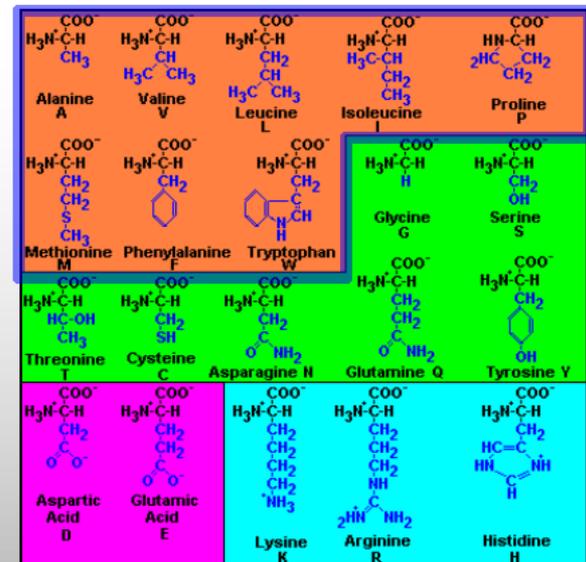
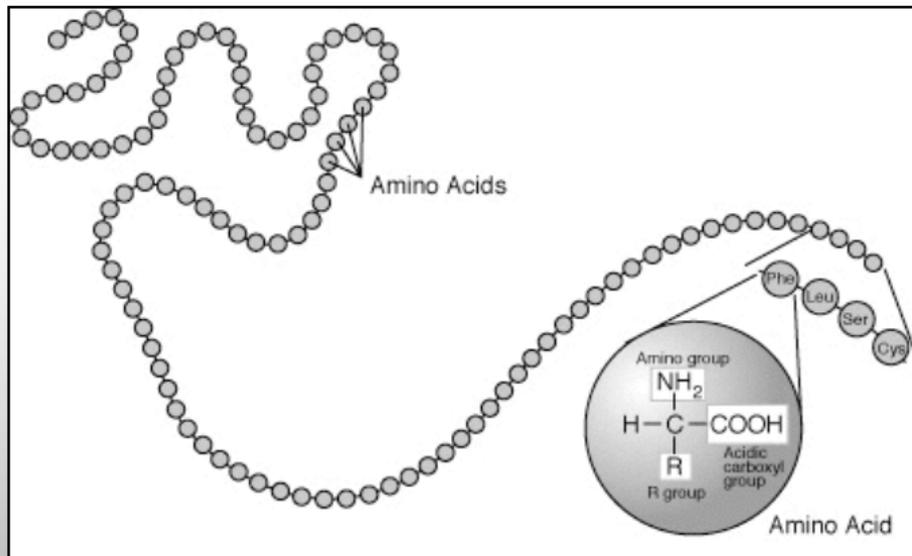
## Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

SOD

# Repliement des protéines

Processus par lequel une protéine adopte sa conformation tridimensionnelle fonctionnelle

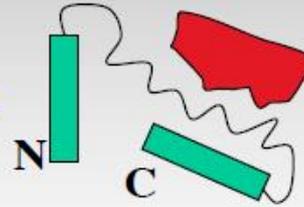
- Toutes les protéines sont constituées de chaînes linéaires d'acides aminés non branchés
- L'interaction des chaînes latérales des acides aminés va déterminer la structure tridimensionnelle qui va permettre à la protéine d'assurer sa fonction biologique



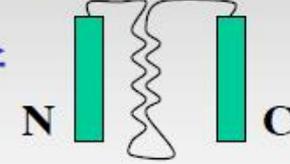
**Synthèse**



**Intermédiaire**



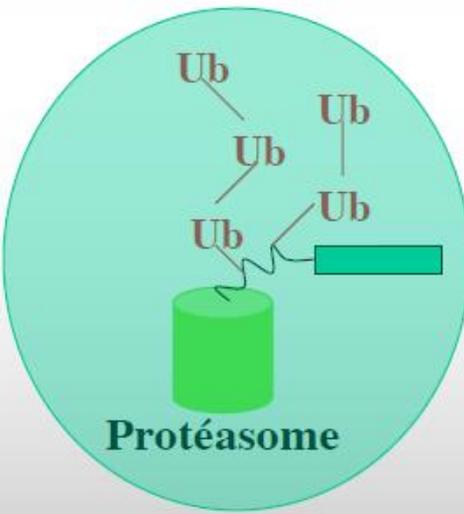
**Forme native**



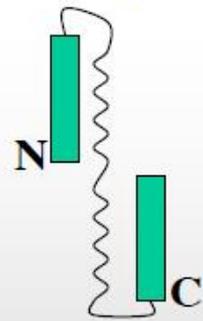
⇌

ON ⇌

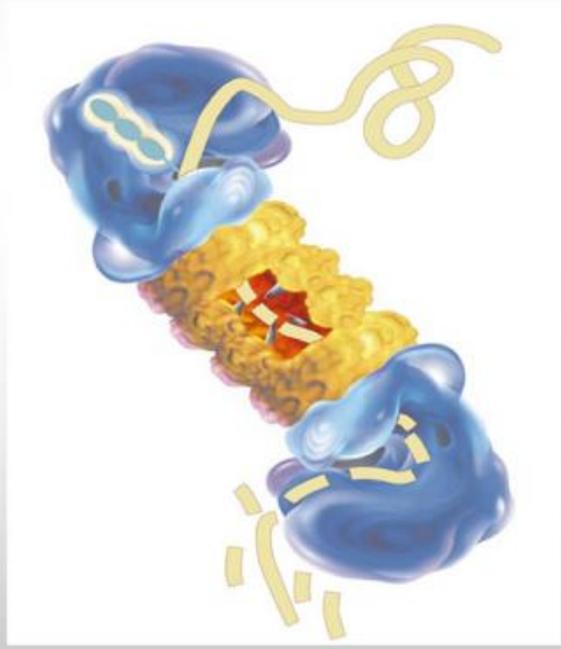
OFF ⇌



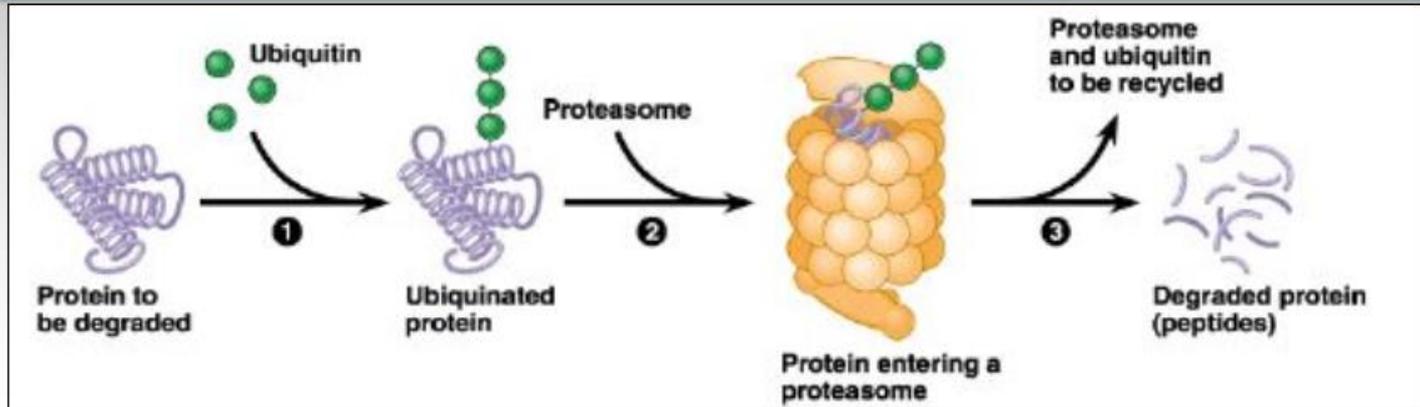
**Contrôle qualité**



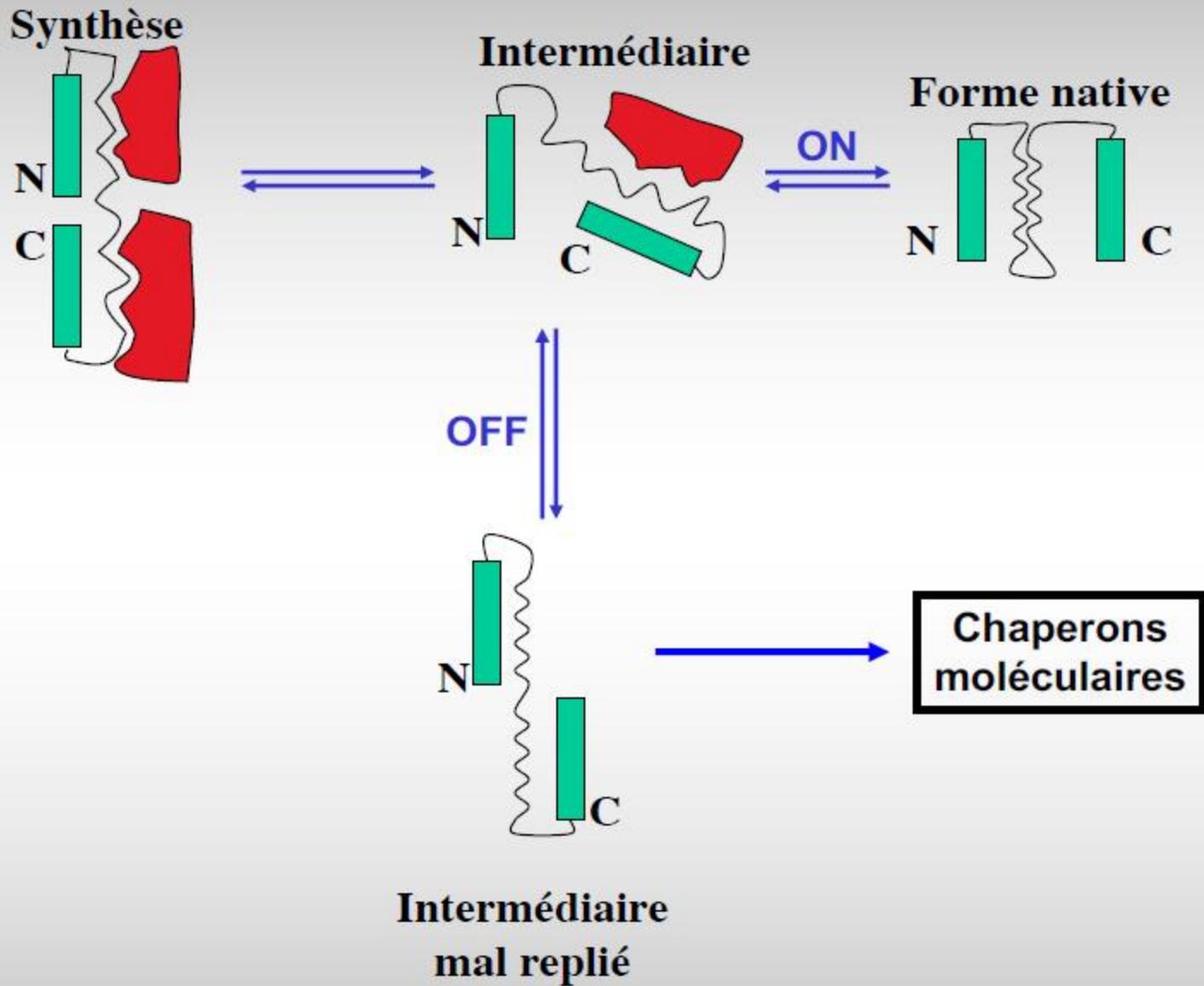
**Intermédiaire mal replié**



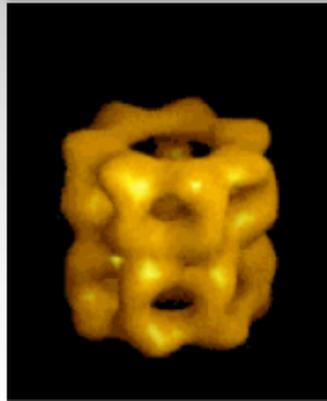
# Repliement des protéines



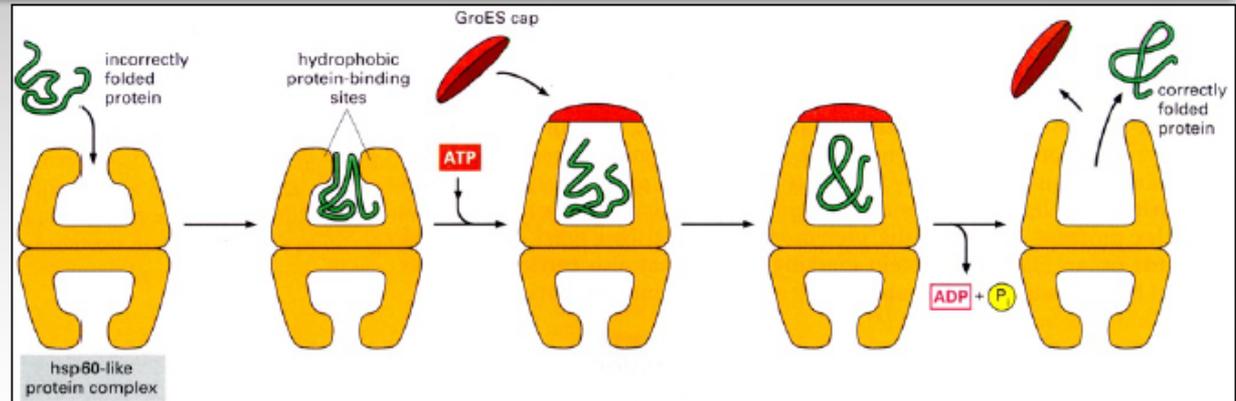
- L'ubiquitine est un polypeptide de 76 résidus, hautement conservé, et largement distribué dans les cellules eucaryotes, qui se lie de façon covalente aux protéines à dégrader
- Elle fonctionne comme un signal pour la dégradation ATP-dépendante des protéines mal reployées par le protéasome 26S
- La dégradation fonctionne en 2 étapes successives :
  - (i) Liaison covalente de multiples molécules d'ubiquitine sur la protéine substrat
  - (ii) Dégradation de la protéine poly-ubiquitinylée par le protéasome 26S, dans le cytosol, avec relargage de molécules d'ubiquitine réutilisables



# Chaperons moléculaires

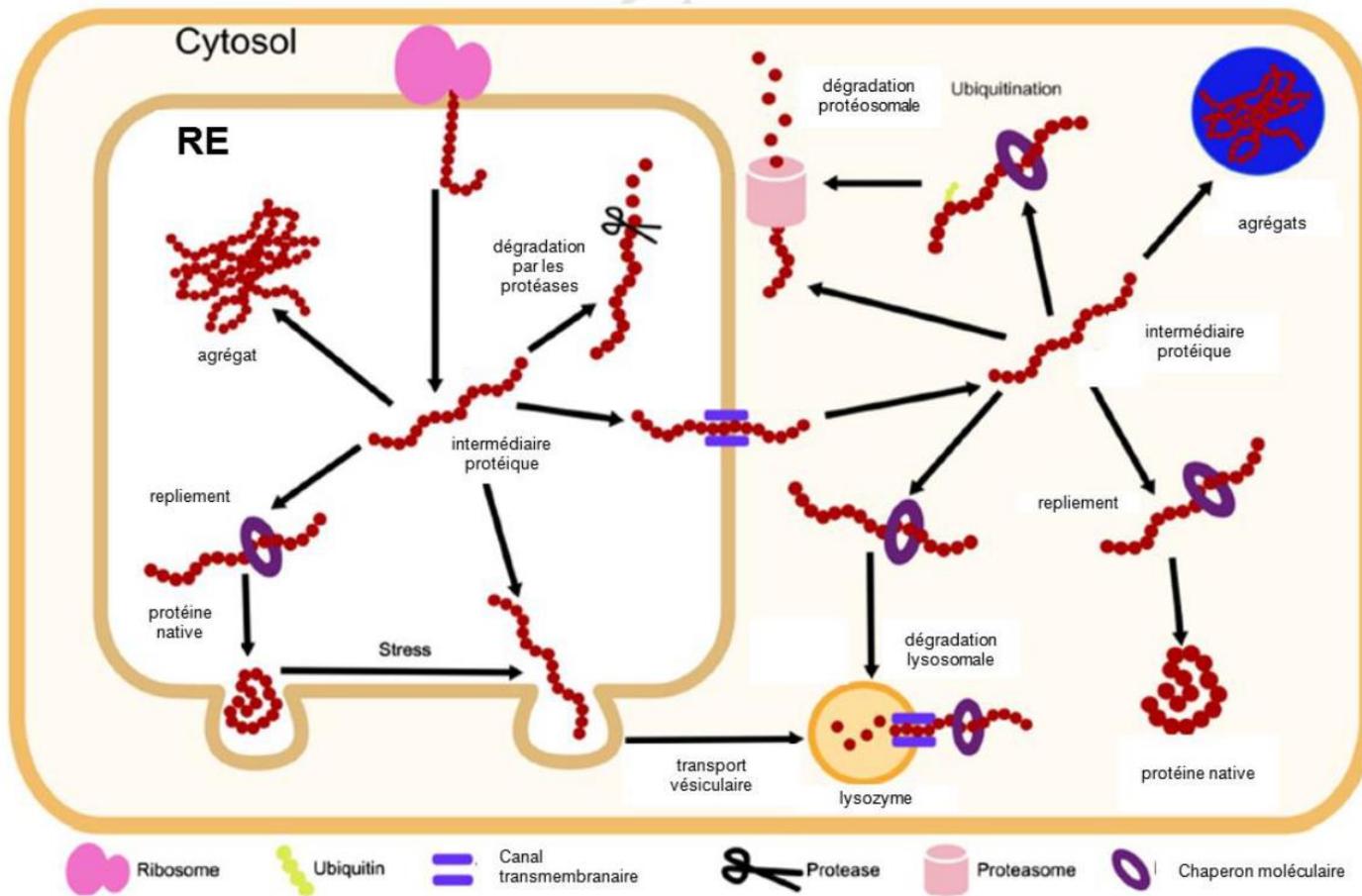


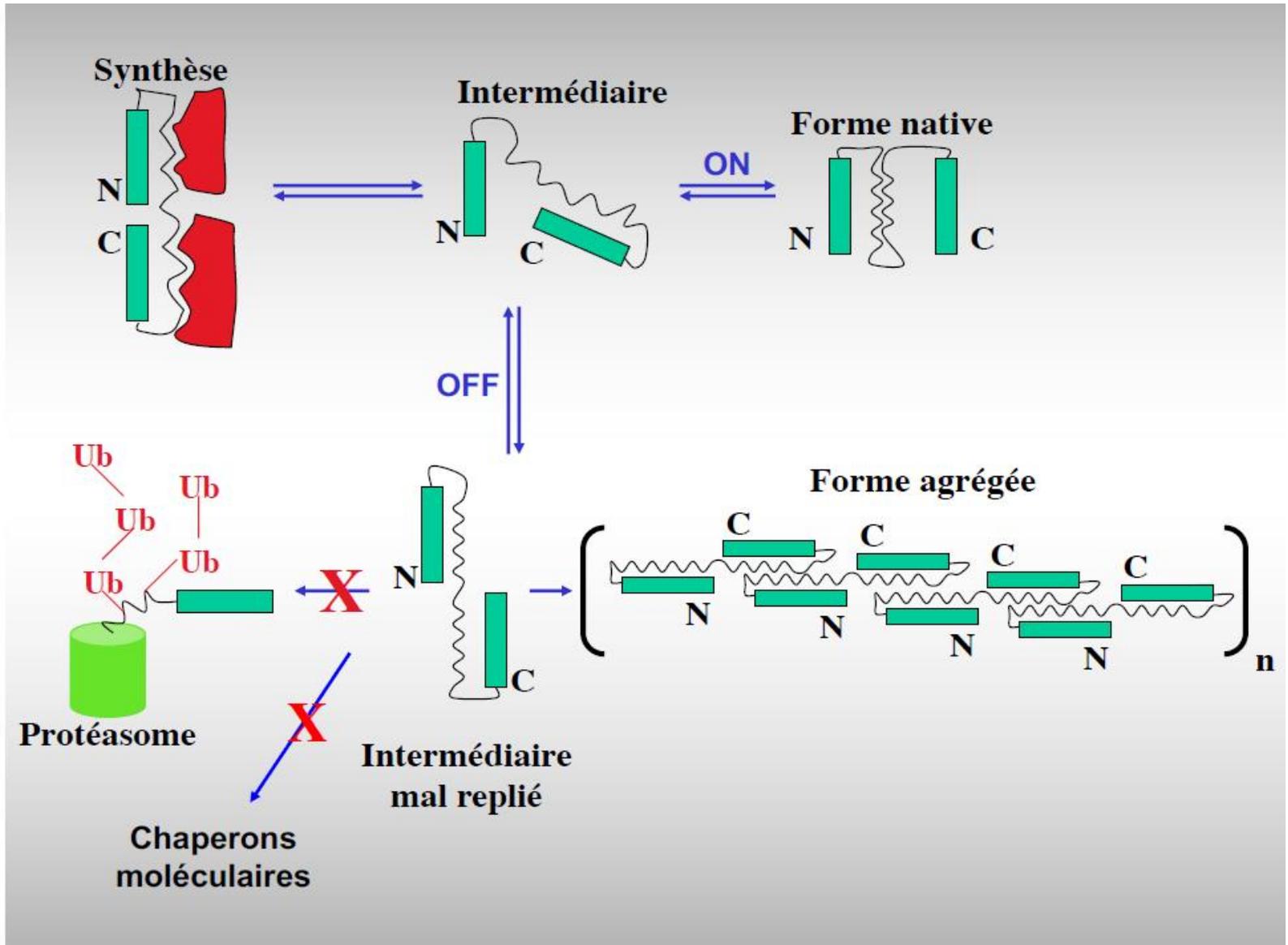
GroEL

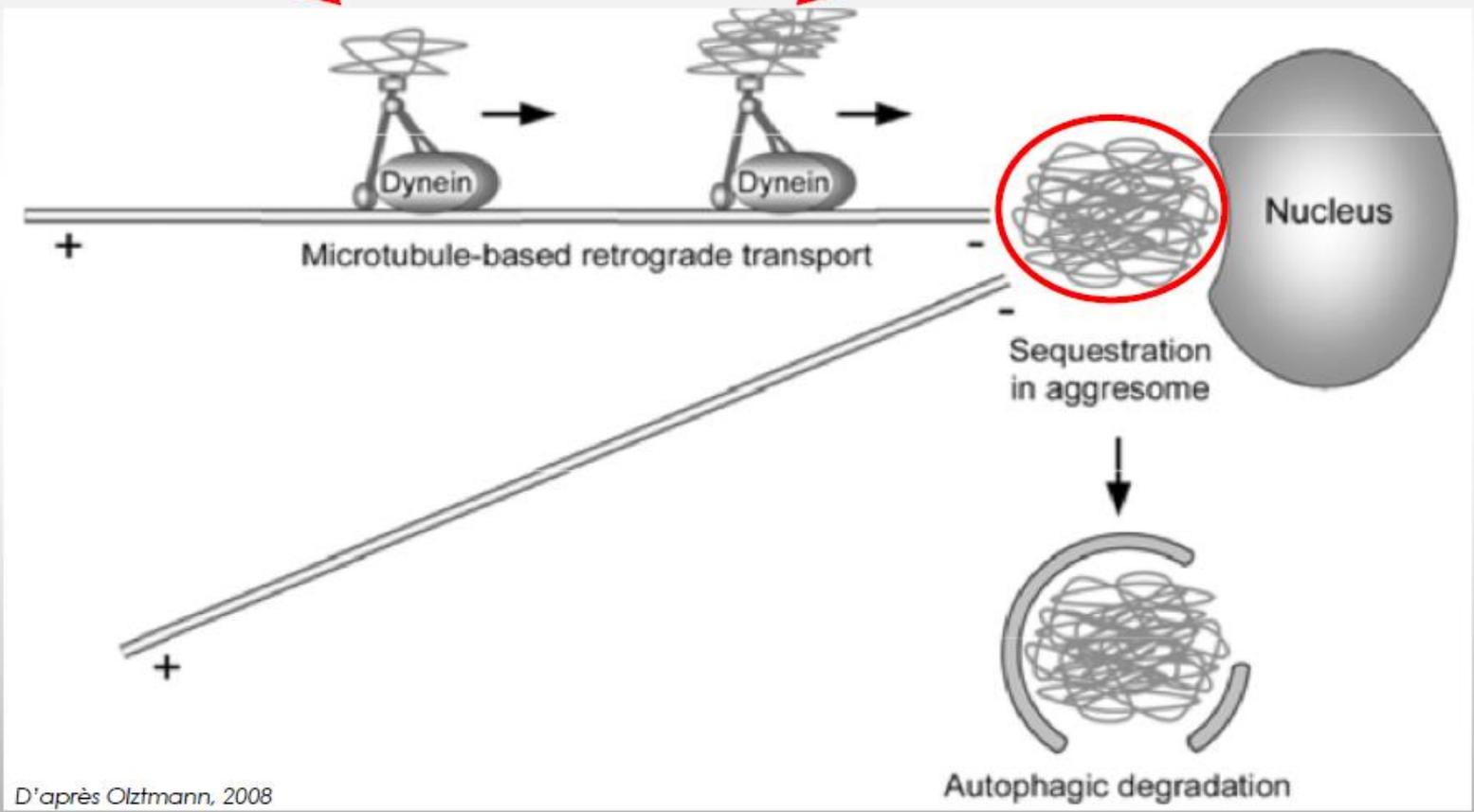
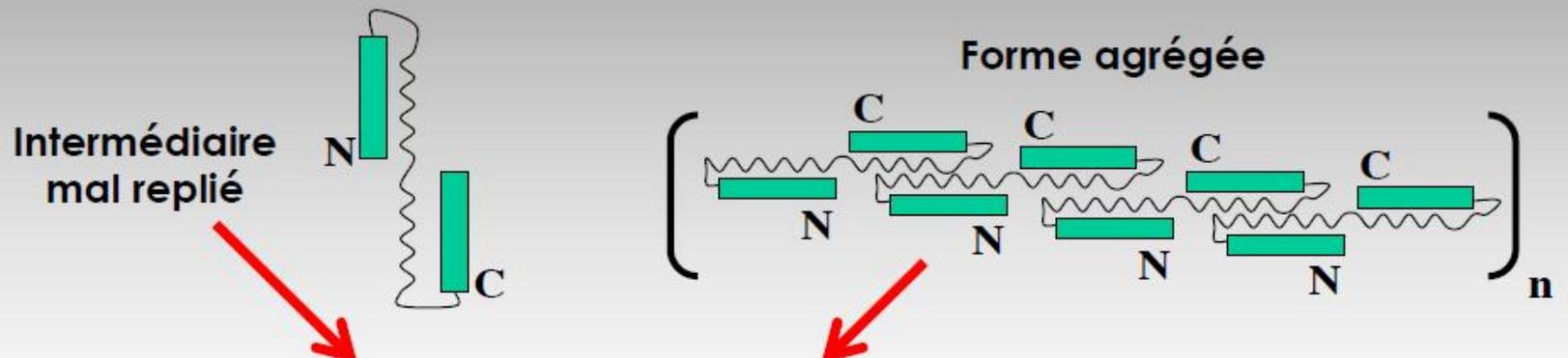


hsp60

- Une protéine mal repliée est capturée grâce à des interactions hydrophobiques par un bord du tonneau (barrel rim)
- La liaison d'une molécule d'ATP + d'une protéine cap (GroES) augmente le diamètre du tonneau qui déplie la protéine transitoirement. La protéine a alors l'opportunité de se replier correctement dans un environnement confiné
- Après 15 sec, l'hydrolyse de l'ATP provoque l'éjection de la protéine
- Ce type de chaperons moléculaire est appelé chaperonine : hsp60 dans les mitochondries, TCP-1 dans le cytosol des vertébrés ou encore GroEL chez les bactéries. Comme indiqué seulement la moitié du tonneau symétrique opère une protéine client à la fois



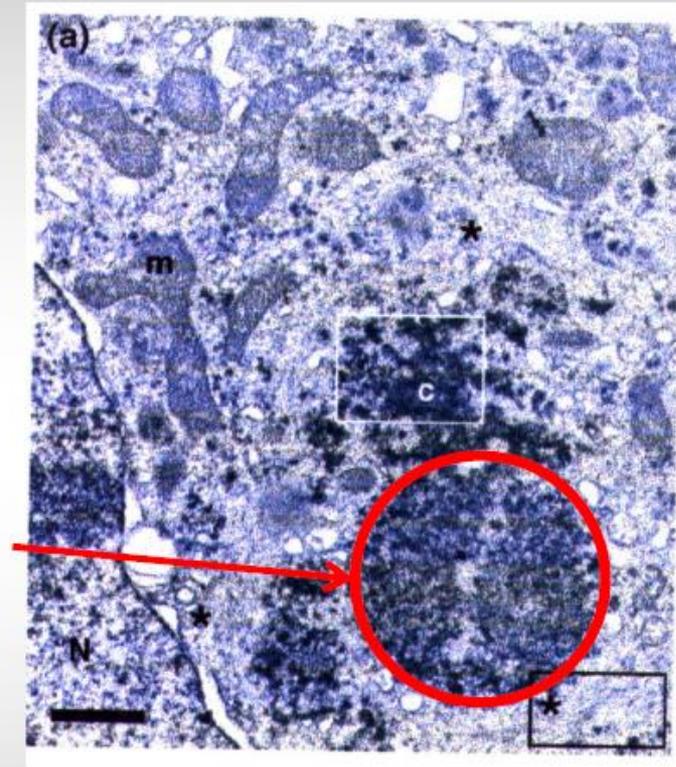




D'après Olzmann, 2008

# Les agrésomes

- Les agrégats protéiques sont acheminés vers le centre organisateur des microtubules (MTOC ou centrosome, C) par un transport rétrograde dépendant de la dynéine le long des microtubules
- Lorsque la capacité de dégradation par le protéasome n'est plus suffisante pour les détruire, ces agrégats s'accumulent sous forme d'agrésomes, près du noyau, dans lesquels les protéines mal repliées, ubiquitylées sont sequestrées



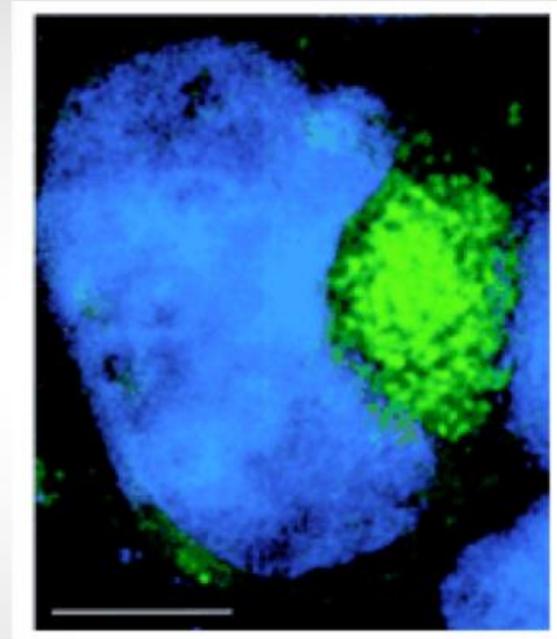
**Maladies à polyQ  
(Huntington, SCA2)**

## Exemple : Accumulation de CFTR dans les agrésomes

- Cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR)
- Canal Cl<sup>-</sup>
- $\Delta F508$  : mutation empêchant le routage vers la membrane plasmique



Formation d'agrégats intra-cellulaires  
ou agrésomes



GFP-CFTR $\Delta F508$  et ADN

## Conclusion

- Transport actif dépendant des microtubules pour acheminer les agrégats protéiques éparpillés dans la cellule vers une structure unique, l'agrésome
- La formation d'un agrésome pourrait être le moyen pour la cellule de réduire la toxicité des micro-agrégats protéiques épars en facilitant leur prise en charge par d'autres mécanismes de défense cellulaire (Boyault et Khochbin, 2008)



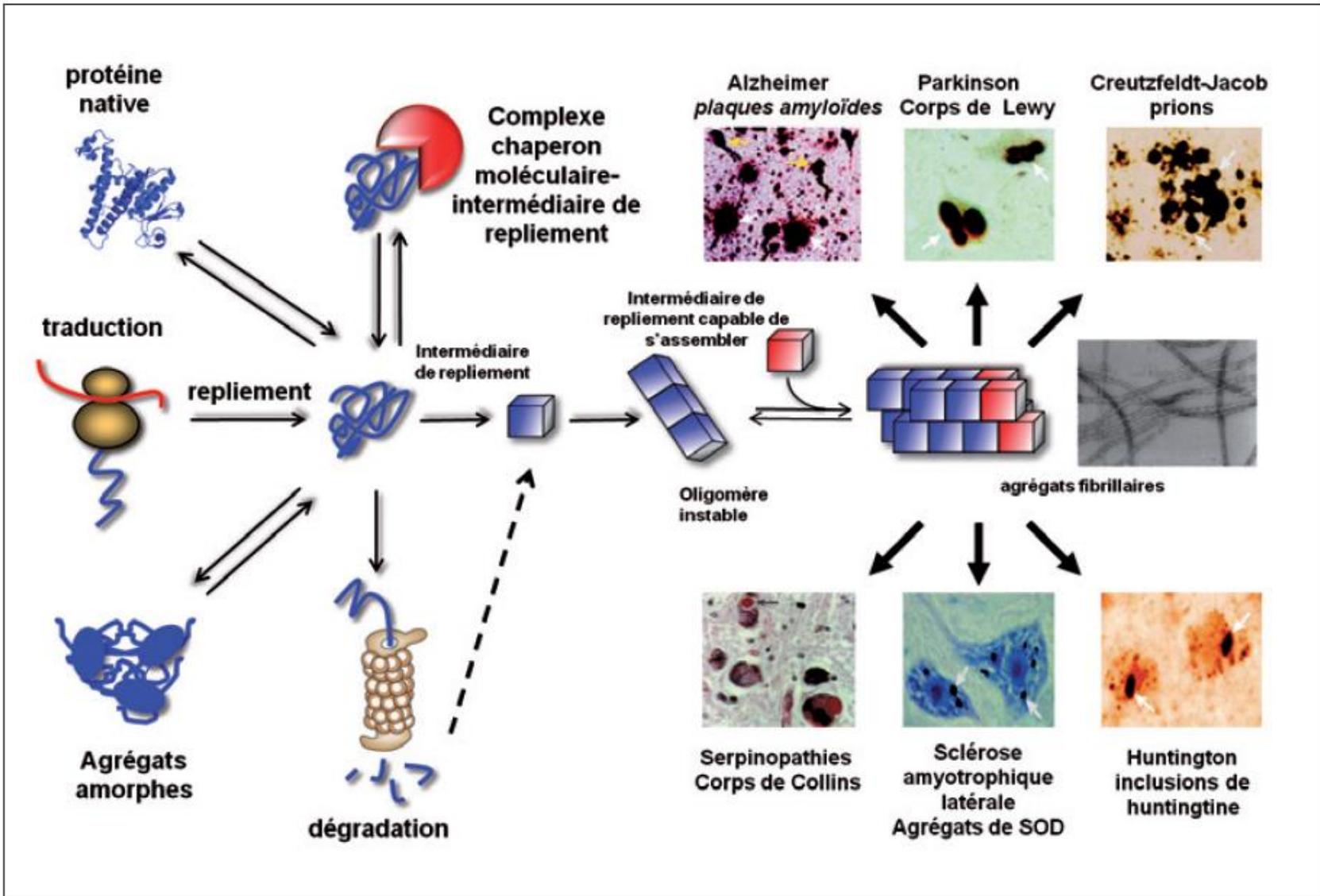
Ce phénomène pourrait constituer un mécanisme de cyto-protection de manière à faciliter leur élimination par **autophagie** ou **catabolisme lysosomique** :

## Conclusion

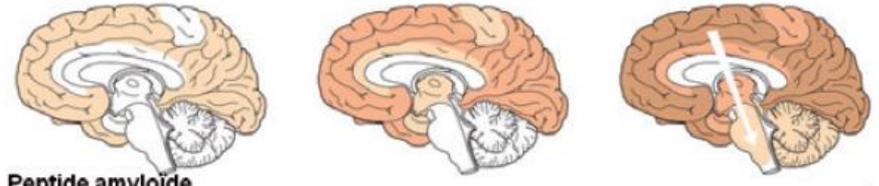


1. Formation d'un phagosome (vacuole) qui séquestre les protéines
2. Fusion avec ces compartiments endocytiques
3. Dégradation complète après fusion avec le lysosome

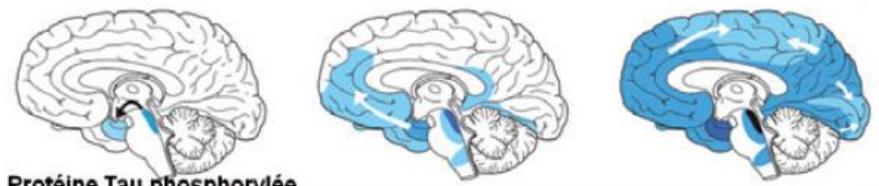
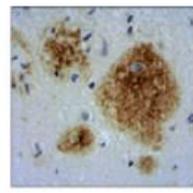
Les agrésomes sont retrouvés dans différentes maladies neurodégénératives :



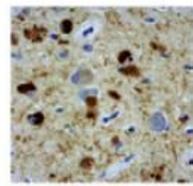
**Maladie d'Alzheimer**



Peptide amyloïde



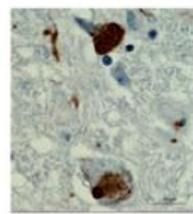
Protéine Tau phosphorylée



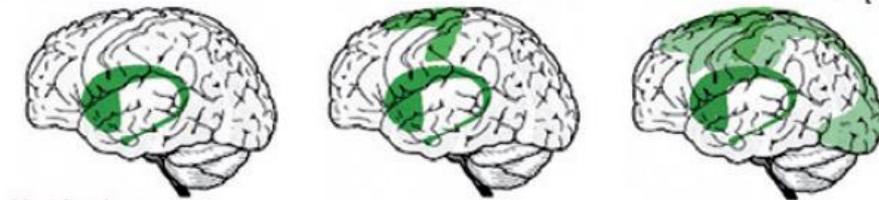
**Maladie de Parkinson**



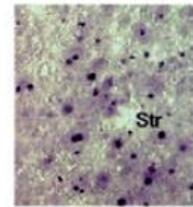
$\alpha$ -Synucléine



**Maladie de Huntington**



Huntingtine

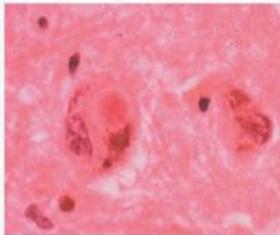


## Cas de la maladie de Parkinson

### Corps de Lewy :

inclusions intra-cytoplasmiques, éosinophiles, retrouvées essentiellement dans le péricaryon, mais aussi dans les prolongements neuritiques, contenant différentes protéines dont l' $\alpha$ -synucléine

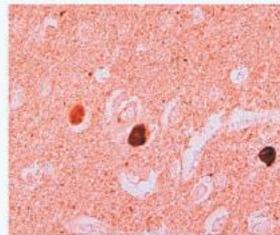
Corps de Lewy (H&E)



Corps de Lewy  
(Ubiquitine)

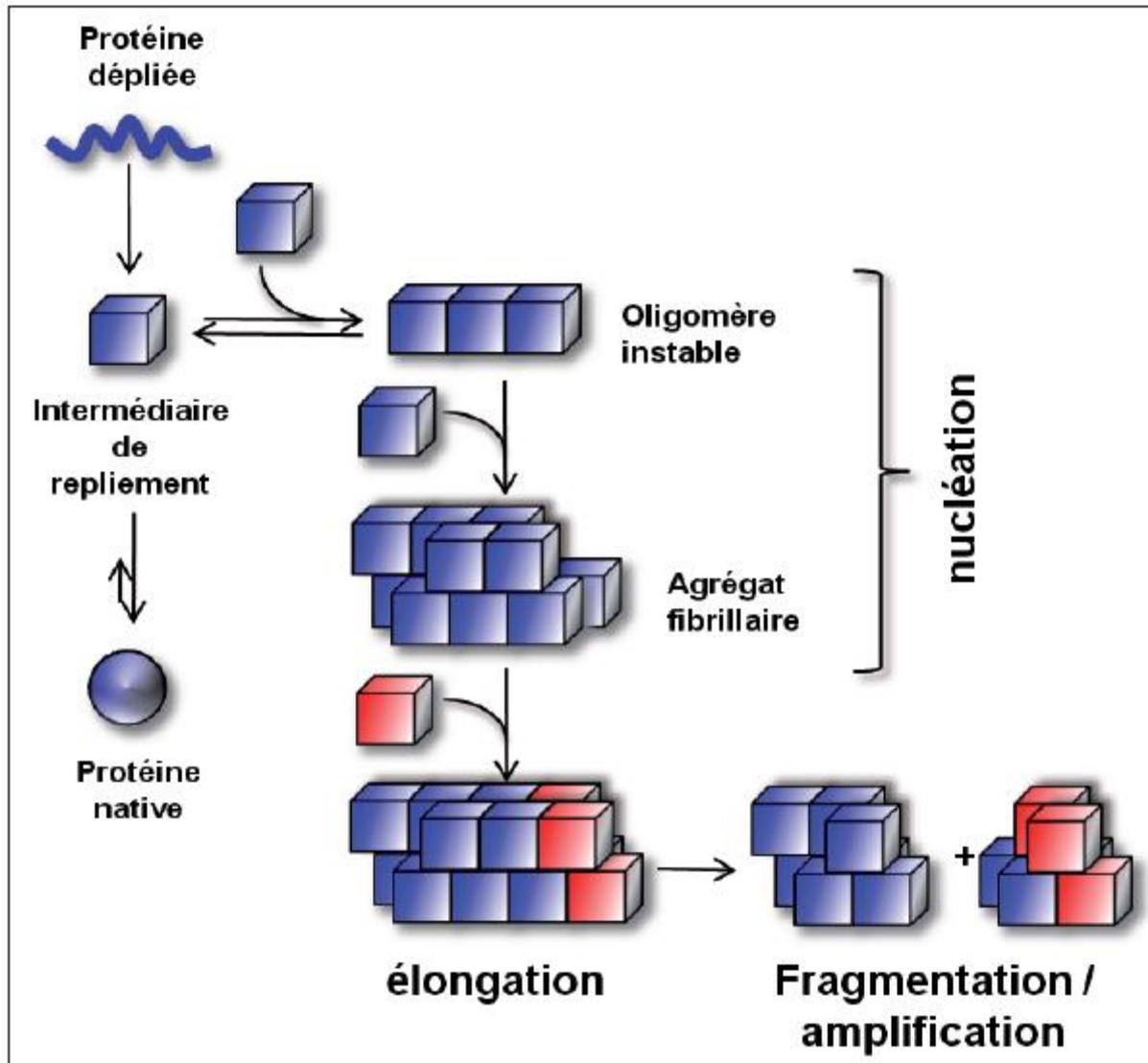


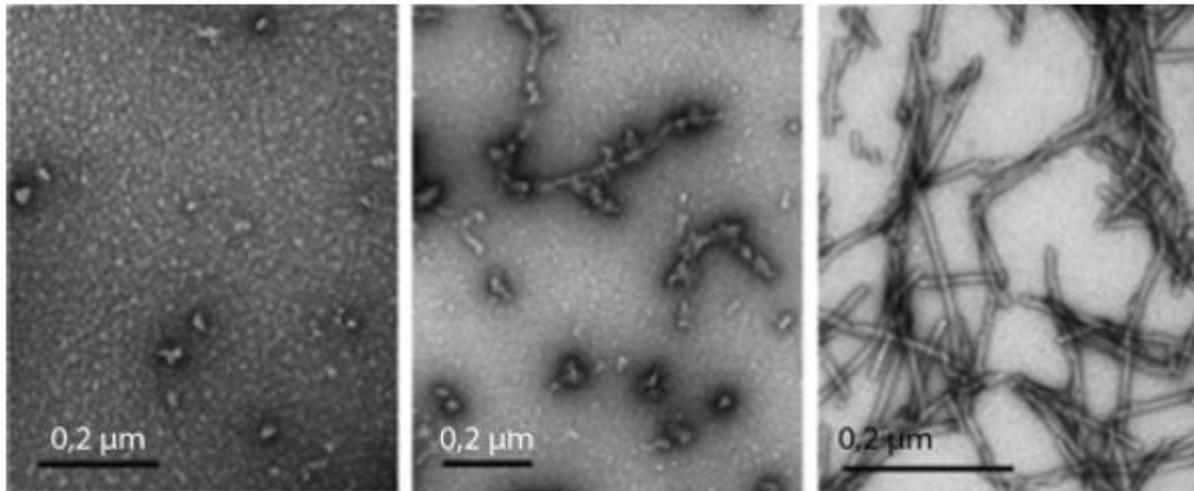
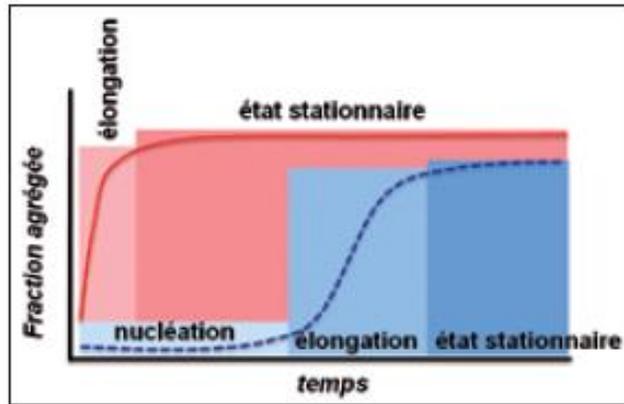
Corps de Lewy  
( $\alpha$ -Synucléine)



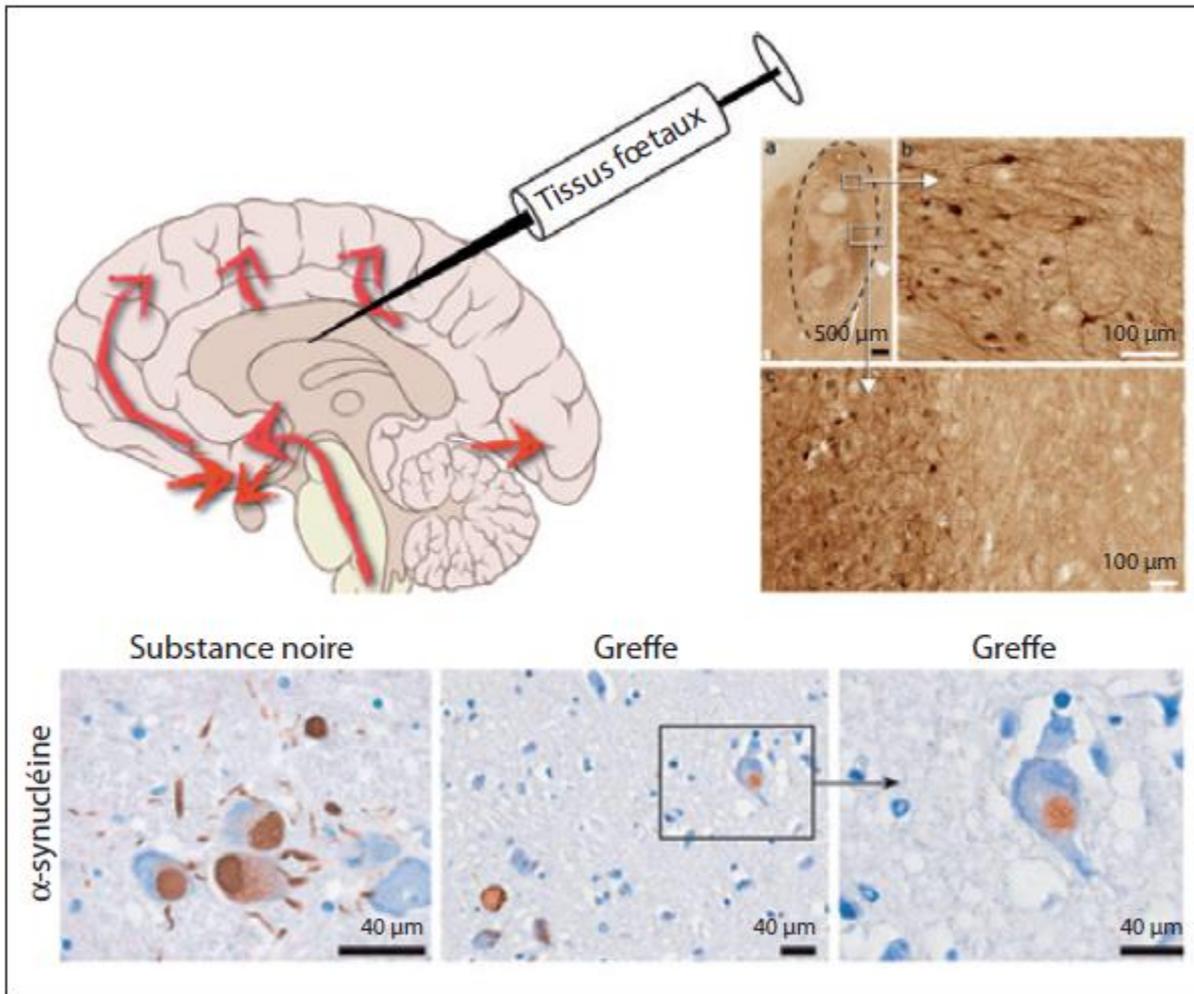
Lewy neurite  
( $\alpha$ -Synucléine)

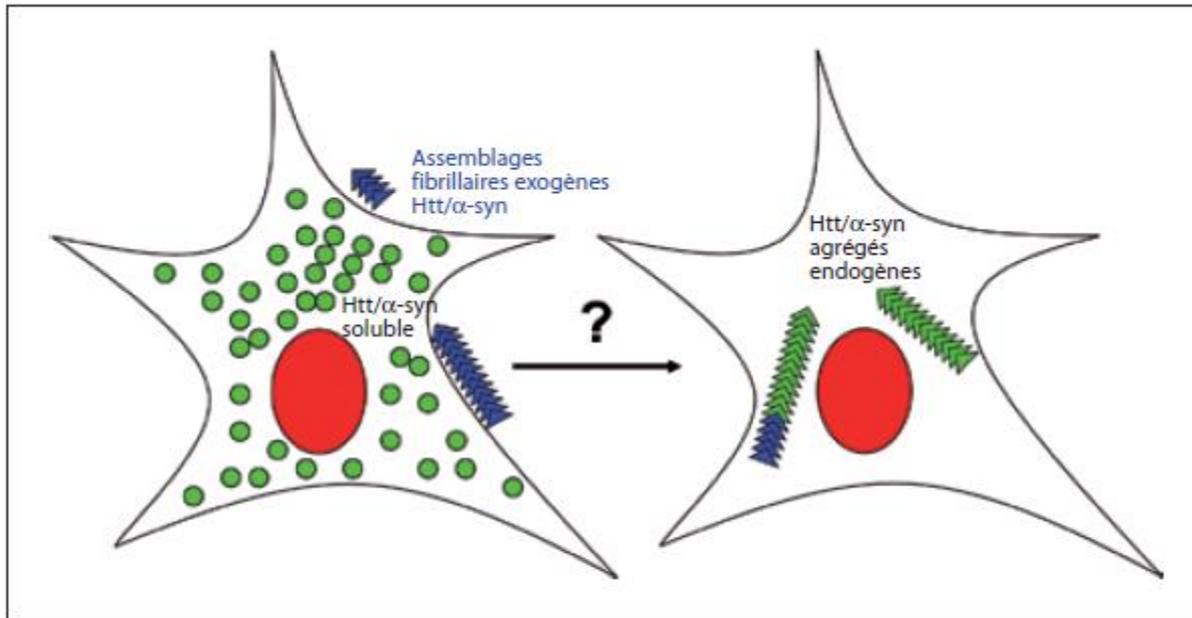






Agrégation de la protéine  $\alpha$ -synucléine en fibres



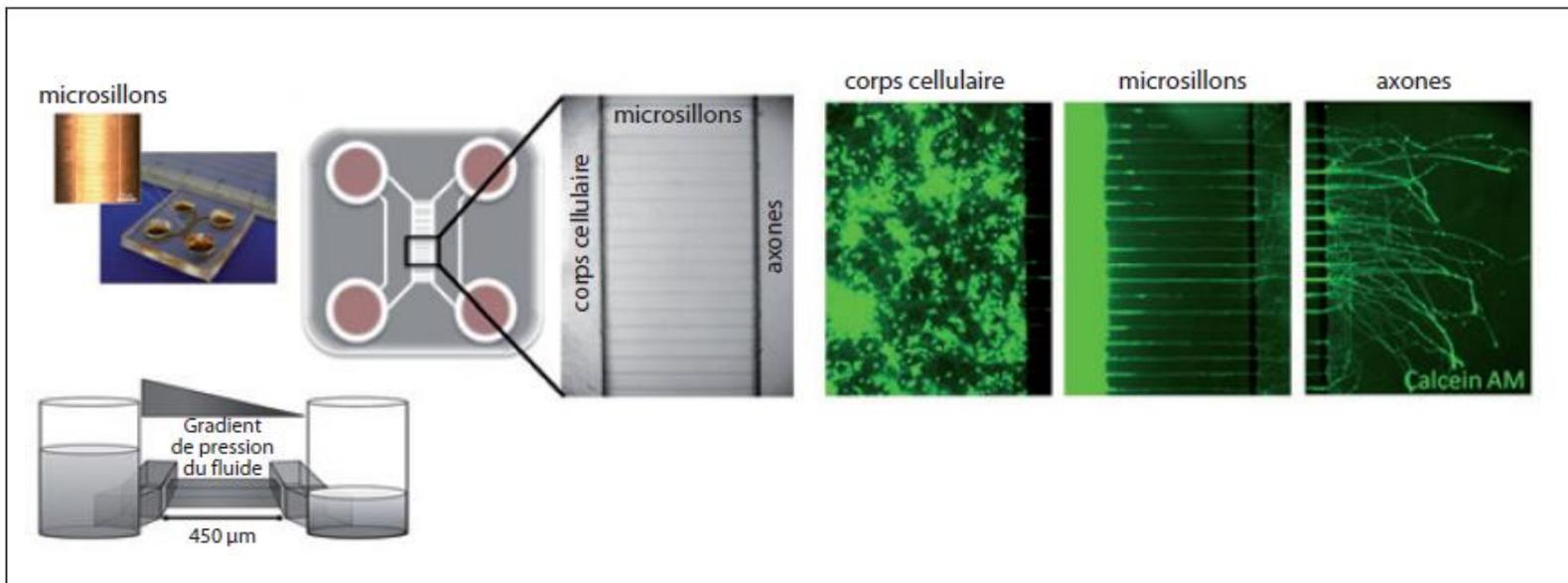


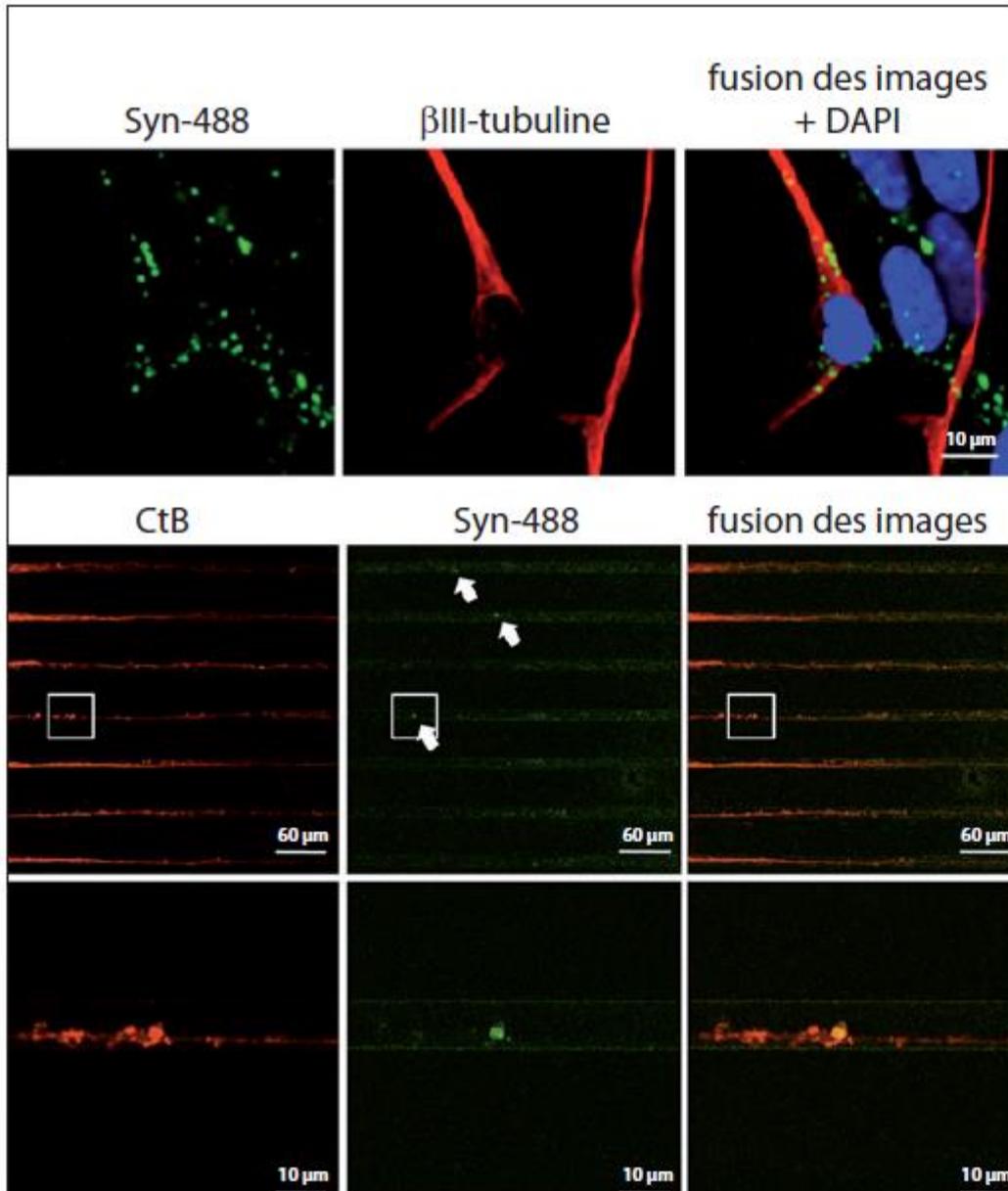
**Figure 11**

*Passage d'un neurone sain à un neurone présentant une agrégation endogène d' $\alpha$ -synucléine et de huntingtine.*

## DES TECHNIQUES D'IMAGERIE POUR VISUALISER LA MOBILITÉ DES AGRÉGATS

La **Figure 12** montre le schéma d'une chambre de culture qui permet l'observation séparée du corps cellulaire d'un côté et des axones de l'autre. La coloration des agrégats en vert est obtenue par marquage fluorescent. Cette technique de visualisation permet de suivre une particule dans l'axone (**Figure 13**).

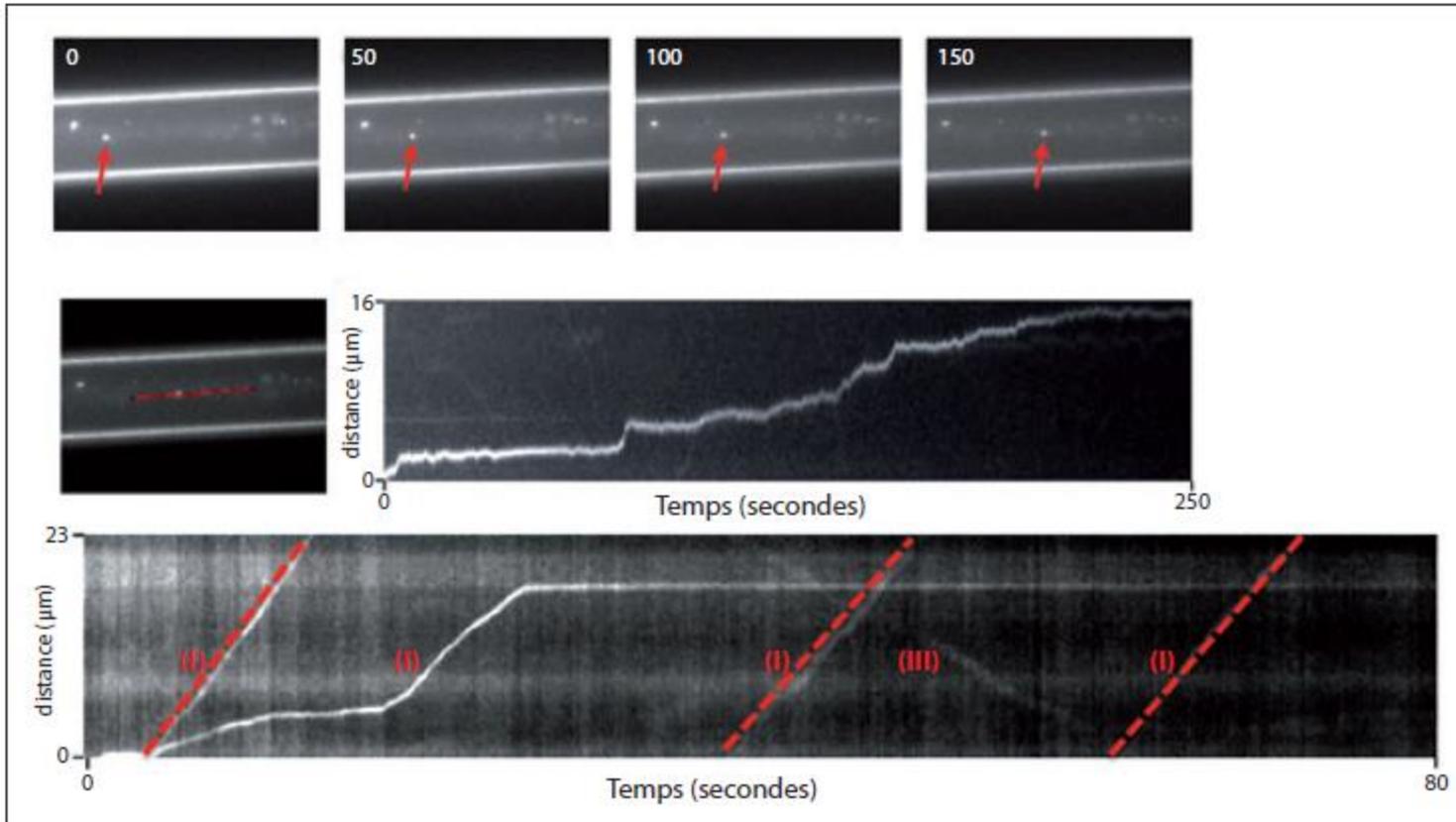




**Figure 13**

**Visualisation par fluorescence des agrégats de protéines dans les axones.**  
 La tubuline, une protéine très riche dans les axones, est colorée en rouge à l'aide d'un anticorps (images du haut) ; DAPI est un colorant des noyaux qui apparaissent ici en bleu ; la CtB (cholera toxin B) colore les membranes en rouge ; les agrégats d' $\alpha$ -synucléine sont marqués avec un fluorophore vert.

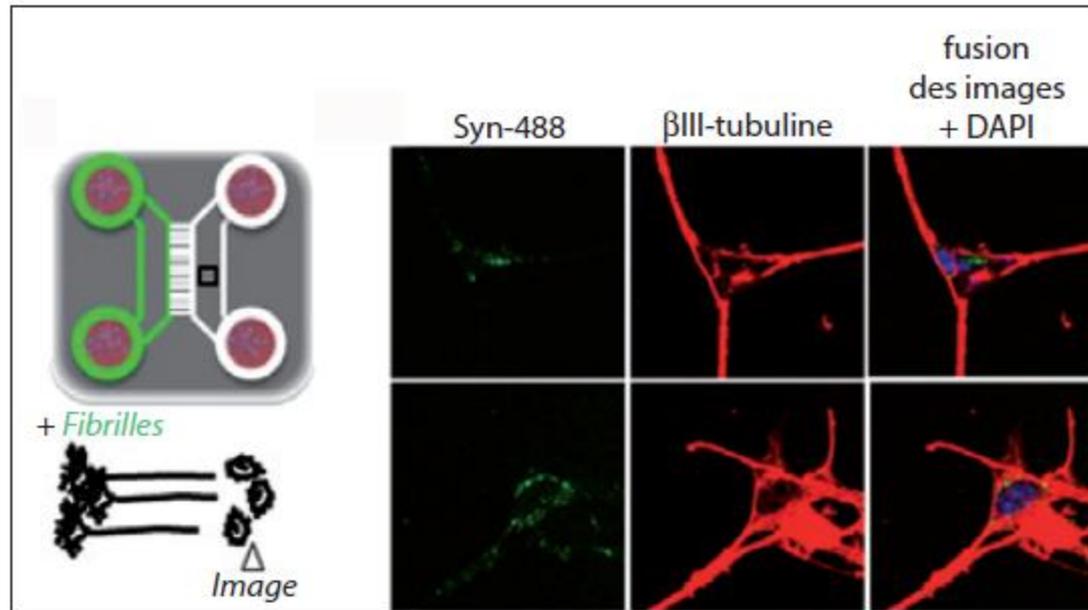
Source : Freundt et coll., (2012).  
*Annals of Neurology*, **72** : 517-524.



**Figure 14**

*Déplacement des fibres d' $\alpha$ -synucléine dans les axones de neurones primaires.*

Source : Freundt et coll. (2012). *Annals of Neurology*, **72** : 517-524.



**Figure 15**

*Transport des agrégats entre neurones en chambre de culture. À la suite de leur transport antérograde, les fibres d' $\alpha$ -syn sont exportées et internalisées par des neurones secondaires au bout de quatre jours.*

Source : Freundt et coll. (2012).  
*Annals of Neurology*, **72** : 517-524.

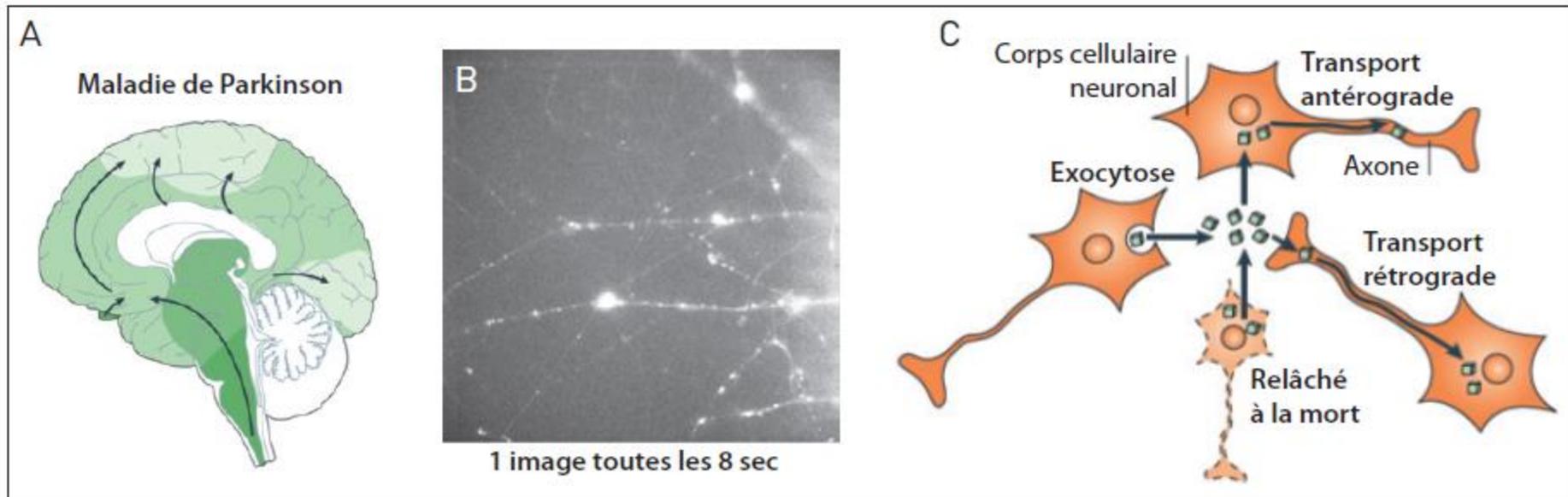


Figure 16

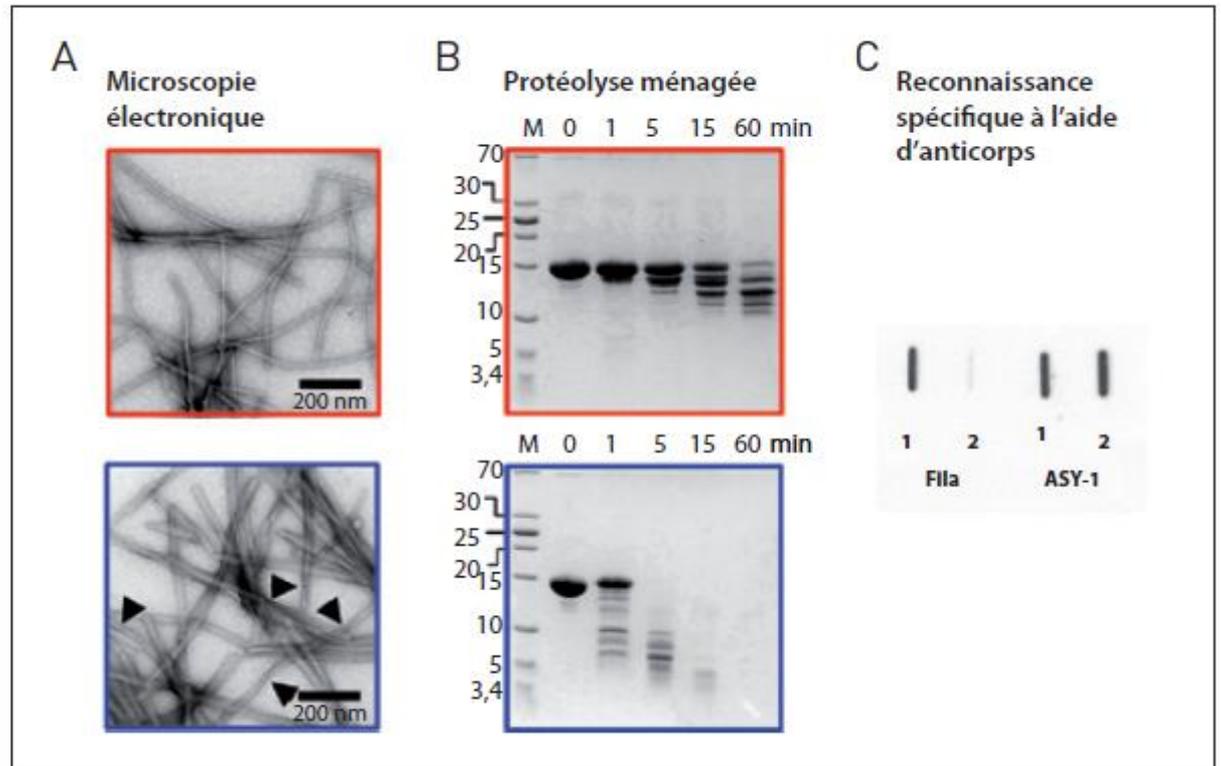
**Maladie de Parkinson et agrégats d' $\alpha$ -synucléine.** A) Développement de la maladie de Parkinson par transmission des agrégats d' $\alpha$ -synucléine (B : observation vidéo des agrégats d' $\alpha$ -synucléine) ; C) les assemblages fibrillaires de l' $\alpha$ -synucléine se lient et pénètrent dans les neurones puis y sont transportés activement. Ils se propagent par la suite à des neurones secondaires. Cela suggère que les fibres d' $\alpha$ -synucléine se propagent entre cellules dans le cerveau à la manière des prions. Cela rend compte du profil d'accumulation d' $\alpha$ -synucléine et neurodégénérescence décrits par Braak.

Source : Brundin P., Melki R., Kopito R. (2010). *Nat. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **11** : 301-307.

## Figure 18

**Une même protéine qui donne deux types d'agrégats.** A) Deux types de fibres différentes résultant de l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine vues au microscope électronique ; B) protéolyse ménagée de deux types de fibres différentes résultant de l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine ; C) reconnaissance spécifique de deux types de fibres différentes résultant de l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine.

Source : Bousset et coll. (2013).  
*Nat. Comms*, **4** : 2575.



- L'accumulation et l'agrégation de protéines mal repliées dans la cellule sont observées dans un ensemble de maladies appelées **maladies conformationnelles** ou **protéopathies**
- Les maladies neurodégénératives constituent un sous-ensemble des protéopathies
  - ✓ Peuvent être dues à des mutations, des délétions ou d'autres altérations dans la structure primaire qui empêchent un repliement correct (cf maladie de Huntington)
  - ✓ Peuvent également résulter d'un défaut de la cellule à éliminer les protéines mal repliées :

La maladie d'Alzheimer

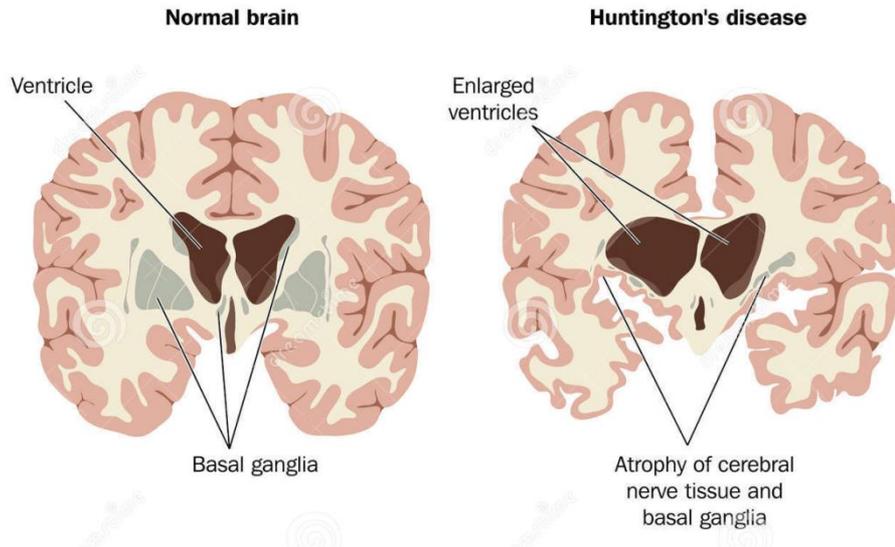
Dépôts  
intra-cellulaires  
de protéine Tau  
(famille des MAP)

Dépôts  
extra-cellulaires  
du peptide  $\beta$ -amyloïde  
(précurseur de l'APP)

Les maladies à prions

# Maladie de Huntington

Affection neurodégénérative héréditaire causée par une insertion de bases dans un gène situé sur le chromosome 4 qui entraîne l'agrégation de huntingtine



sur le plan moteur : démarche instable, agitation, impatience, tics et mouvements saccadés.

Sur le plan intellectuel : perte du sens de l'orientation, troubles de la mémoire, troubles émotionnels, lassitude, sautes d'humeur, agressivité, repli sur soi...

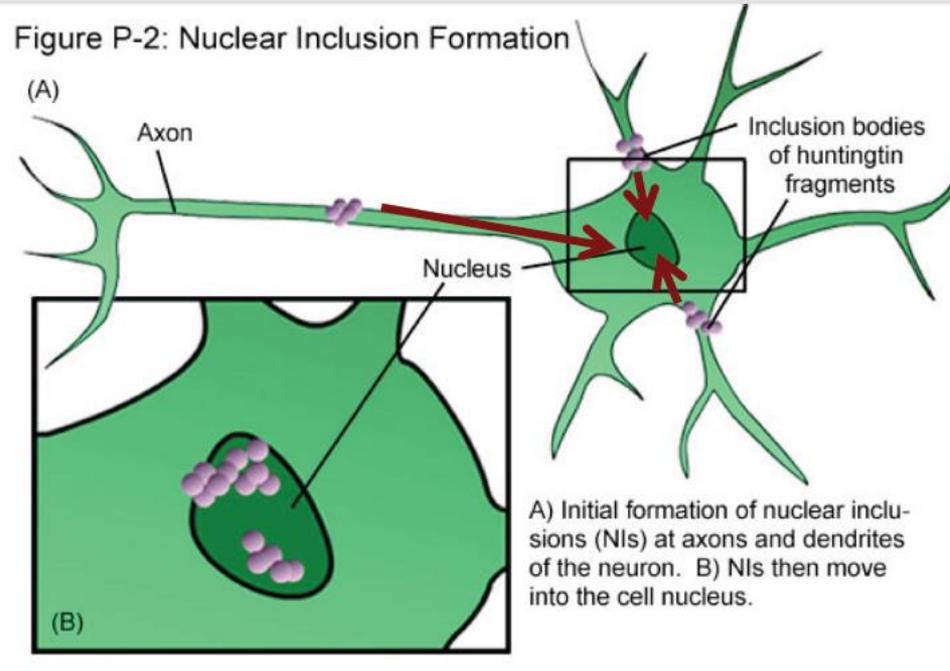
## Agrégation de la huntingtine dans la maladie de Huntington (HD)

- La chorée de Huntington ou maladie de Huntington est une maladie génétique à transmission dominante, pénétrance totale, caractérisée par une perte des neurones du striatum → ce qui va affecter les fonctions motrices et cognitives
- Elle est due à une mutation du gène de la huntingtine
- La huntingtine agirait comme un « turbo cellulaire », en accélérant le transport intracellulaire de facteurs de survie des neurones comme le BDNF via des vésicules (*Gauthier et al., Cell, 2004*)
- Dans la maladie de Huntington, on observe une répétition du codon CAG de la huntingtine, qui code pour la Gln (poly-extension de Q)

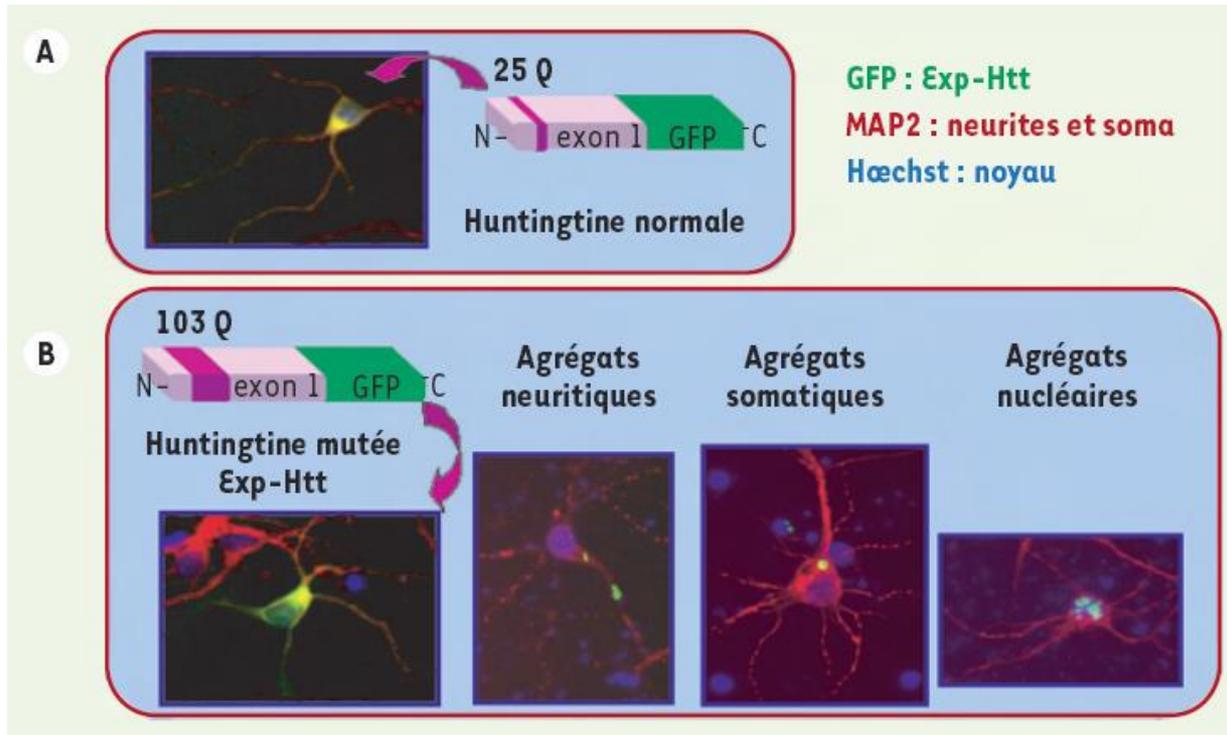
Number of copies of C-A-G	OUTCOME
10-35	Normally Functioning
36-39	???
40 or more	Huntington's Disease

Current rough estimates of the relationship between CAG copies and likely outcome with regard to HD.

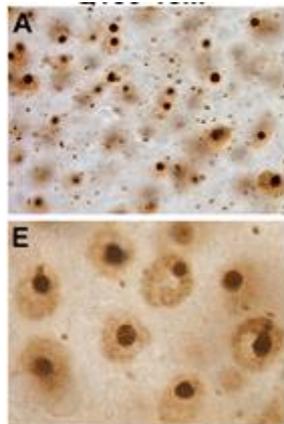
## Inclusions intra-nucléaires dans la maladie de Huntington



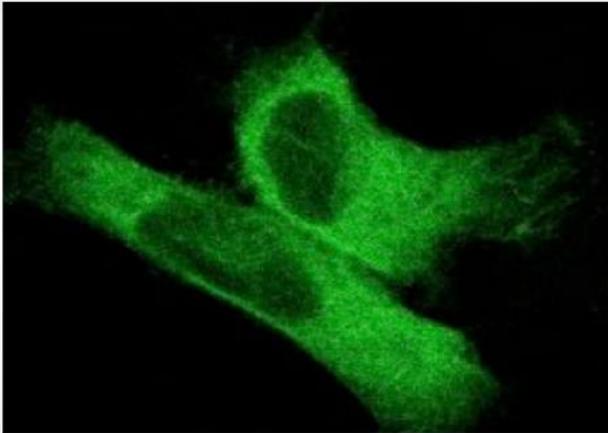
# Accumulation d'hungtintine (souris)



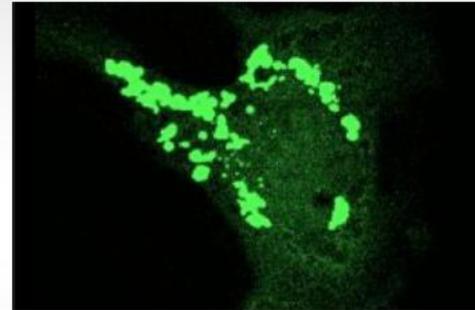
Agrégats nucléaires



## Inclusions intra-nucléaires dans la maladie de Huntington

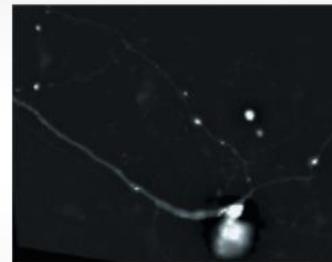
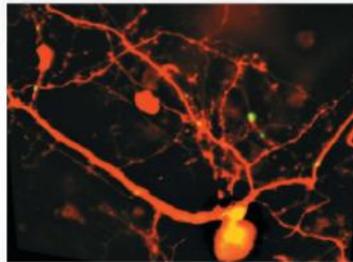


Huntingtine normale : présente dans le cytoplasme



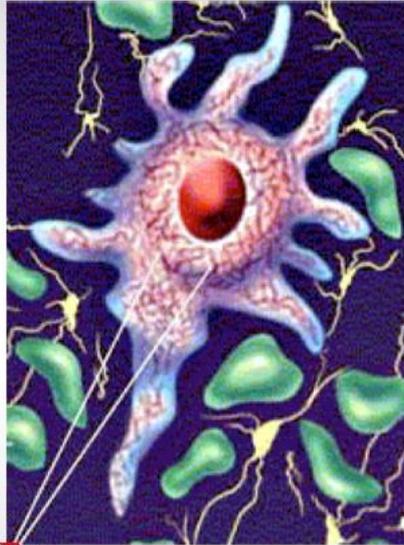
Q138 : s'accumule dans le noyau

**104Q-GFP**



Agrégats de huntingtine avec des répétitions de polyQ dans les dendrites et le noyau de cultures primaires de neurones transfectés avec un vecteur Htt-104Q-GFP

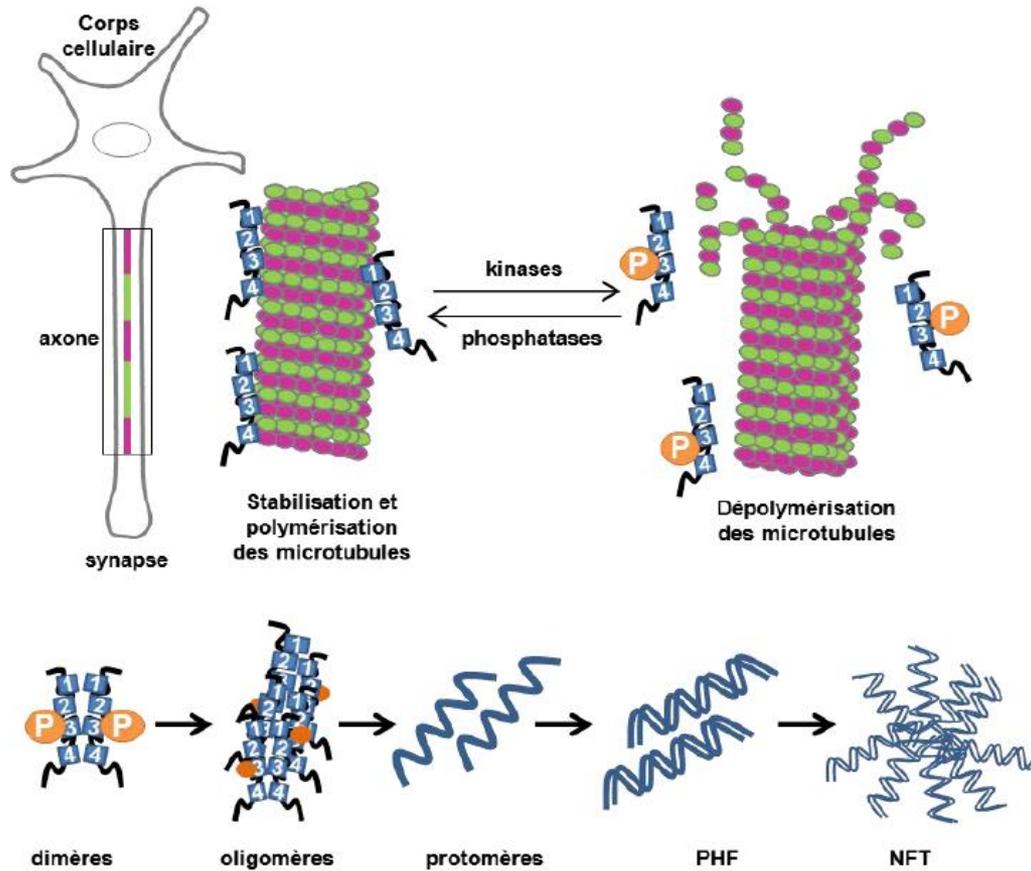
## Cas de la maladie d'Alzheimer



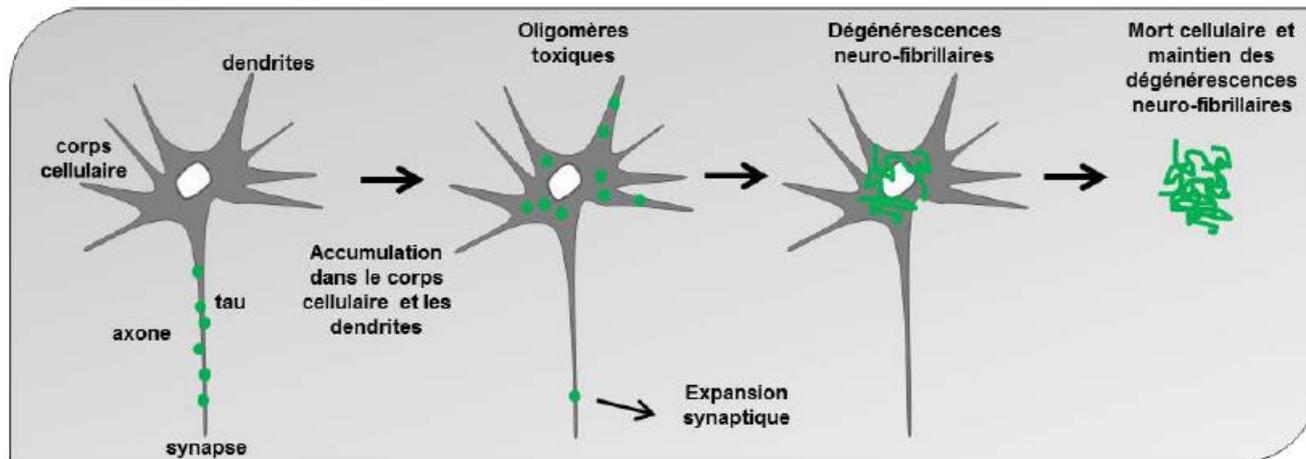
Tau

On observe des dépôts intra-cellulaires de protéine Tau qui s'accumulent dans les axones et les dendrites

# Cas de la maladie d'Alzheimer



## Progression pathologique de la protéine Tau



Tau hyperphosphorylée, se détache des microtubules et progresse vers les compartiments somatodendritiques où elle s'agrège sous forme de NFT et conduit à la mort cellulaire.

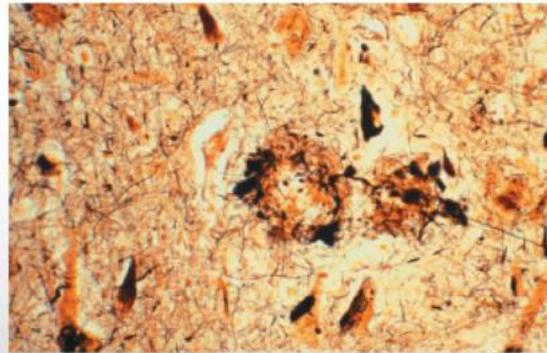
Une expansion trans-synaptique est aussi observée participant à la propagation de tau de neurones à neurones

## Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (1/3)

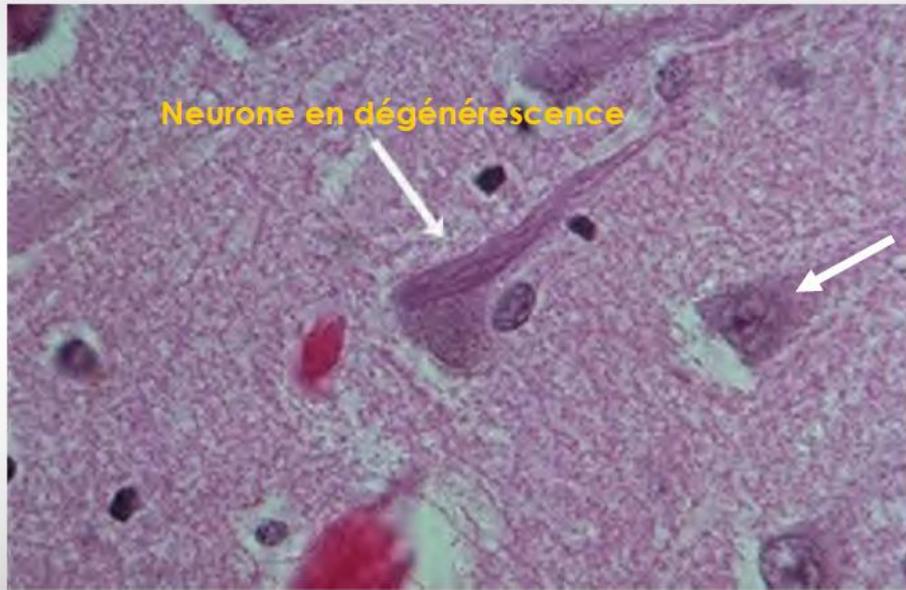
- Les PHF sont les constituants principaux des DNF
- Les DNF sont présentes dans les corps cellulaires des neurones pyramidaux
- Elles forment des torches (neurones pyramidaux) ou des boules (noyaux sous-corticaux)



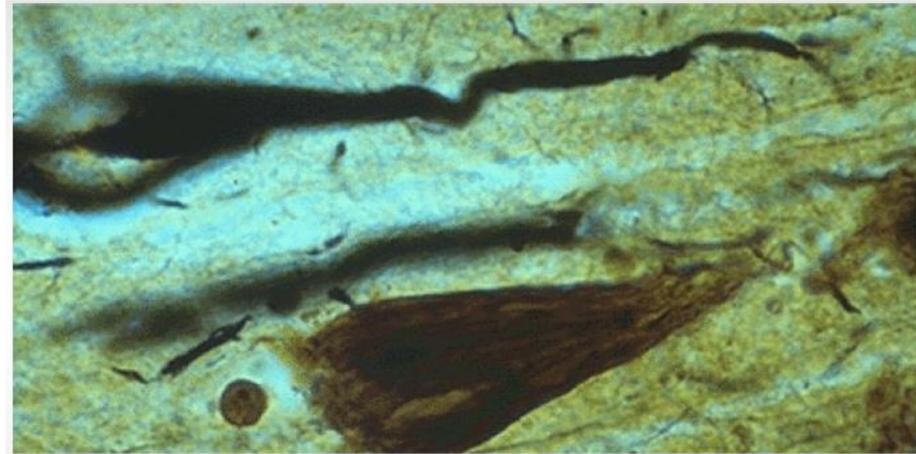
Immunofluorescence



Immuno-histochimie avec anticorps anti-DNF



Marquage à l'éosine



Marquage par imprégnation argentique

## Purification et analyse du contenu des dépôts de Tau (1/2)

Cerveau humain de patient Alzheimer

Dissection de l'amygdale, néocortex ou hippocampe

Resuspendu dans un tampon  
MES 100 mM pH 6.8/SDS 2%/  
NaCl 0.75 M/EGTA 1mM/DTT 2 mM

4°C 20 min  
(dépolymérisation des MT)

Centrifugation 11,000 g  
(surnageant)

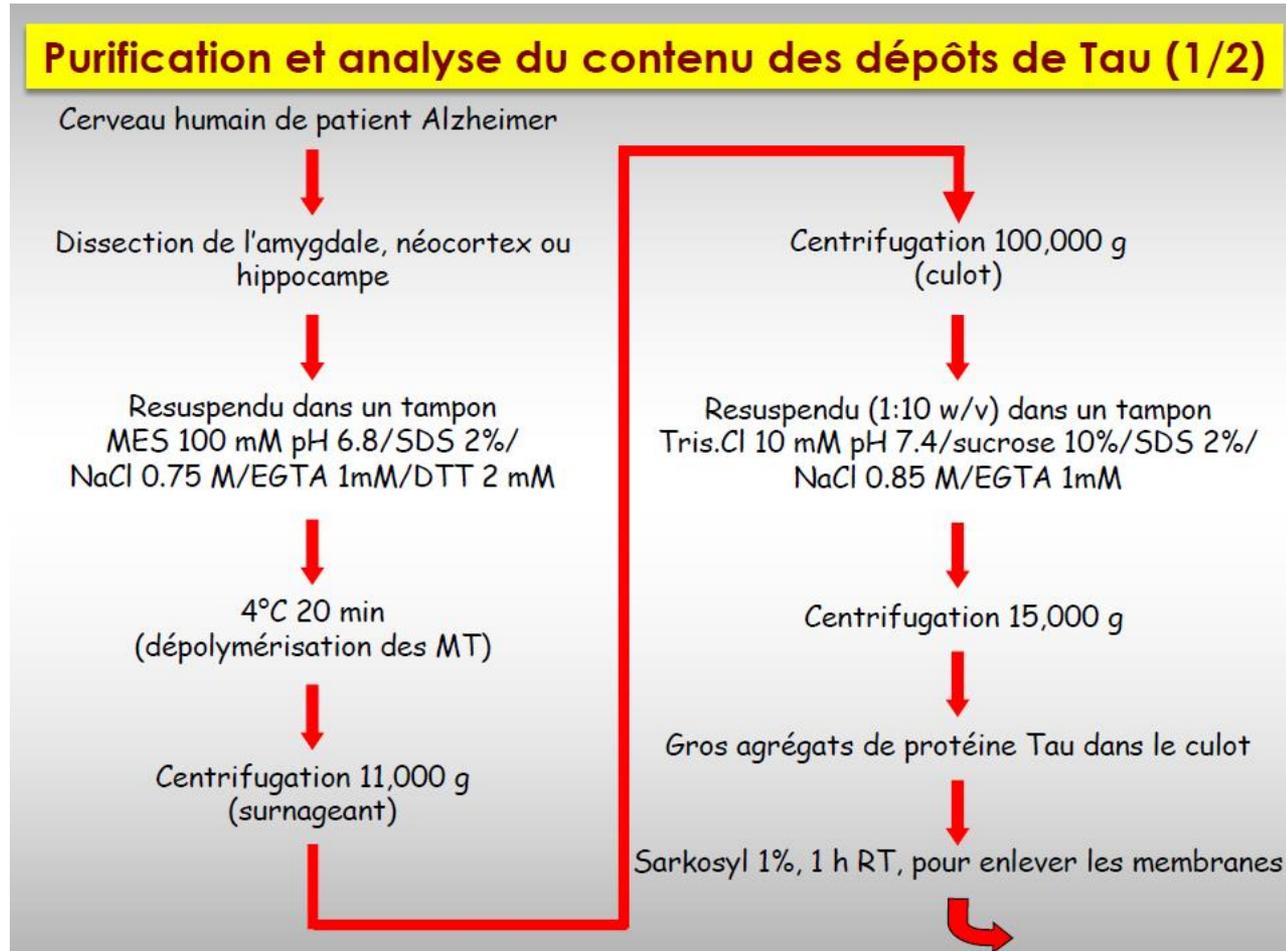
Centrifugation 100,000 g  
(culot)

Resuspendu (1:10 w/v) dans un tampon  
Tris.Cl 10 mM pH 7.4/sucrose 10%/SDS 2%/  
NaCl 0.85 M/EGTA 1mM

Centrifugation 15,000 g

Gros agrégats de protéine Tau dans le culot

Sarkosyl 1%, 1 h RT, pour enlever les membranes



## Purification et analyse du contenu des dépôts de Tau (2/2)

Centrifugation 100,000 g

Récupération de gros agrégats de Tau  
dans le culot (extrait brut)

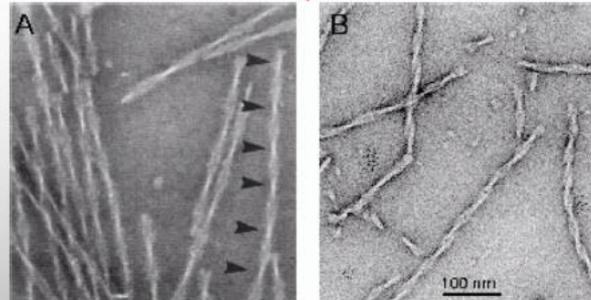
Resuspendu dans le tampon  
MES 100 mM pH 6.8/SDS 2%/  
NaCl 0.75 M/EGTA 1mM/DTT 2 mM

Gradient de sucrose : 1-2.5 M  
16h, 175,000 g

Récupération d'une bande brune  
épaisse à l'interface 2.25-2.5 M

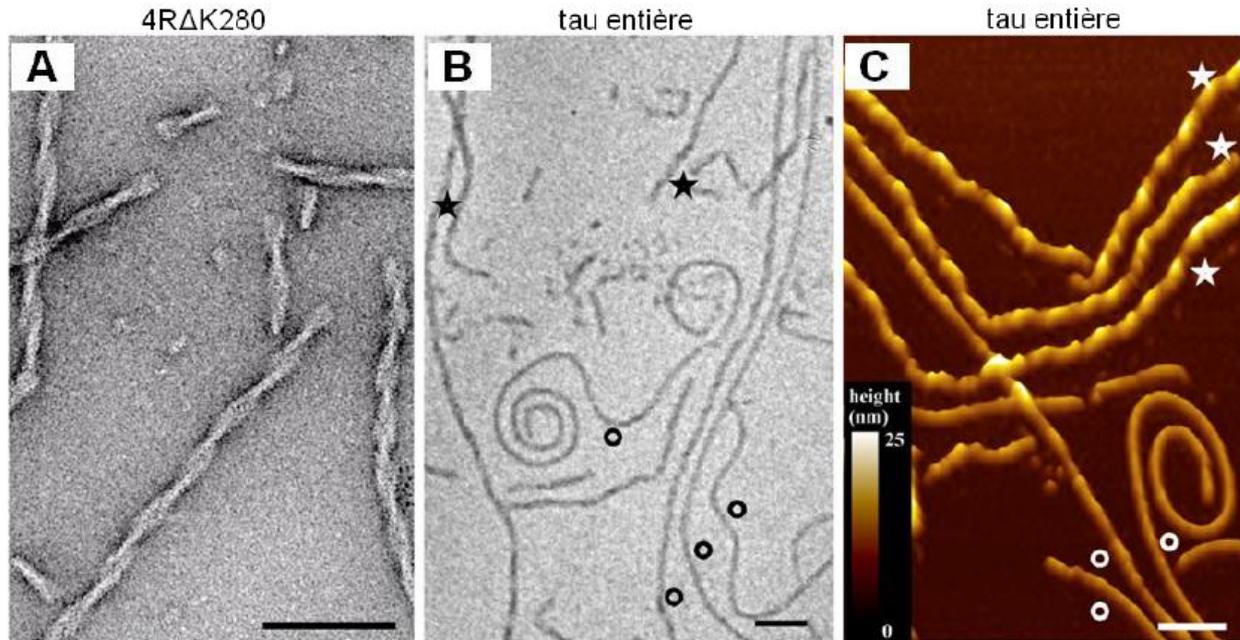
Centrifugation 50,000 g  
en 2 M guanidine (surnageant)

Contient des fractions pures d'agrégats  
de Tau



PHF-Tau : Paires Hélicoïdales de filaments

## Microscopie de force atomique (AFM) (1/3)



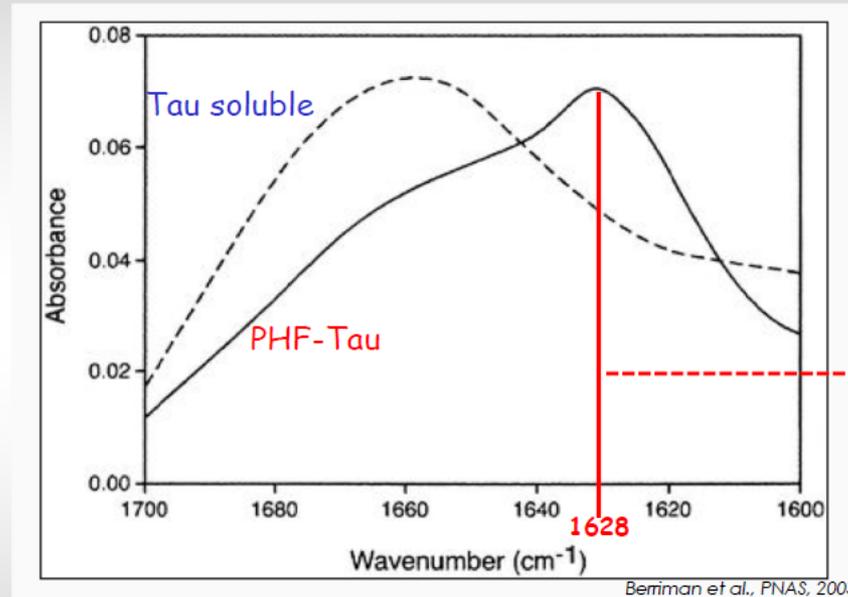
## Caractérisation des fibrilles PHF-Tau (1/12)

- Pour élucider la structure des fibrilles PHF-Tau, on utilise un ensemble de techniques biophysiques, telles que :

- ✓ Le Dichroïsme circulaire (CD)
- ✓ L'infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR)
- ✓ La RMN du solide
- ✓ Les rayons X
- ✓ La diffusion des électrons
- ✓ La résonance paramagnétique électronique
- ✓ ...

## Caractérisation des fibrilles PHF-Tau (2/12)

Expériences de FT-IR :



1700 cm<sup>-1</sup> à 1600 cm<sup>-1</sup> :  
Amide I (C=O)

Apparition de  
feuillets β

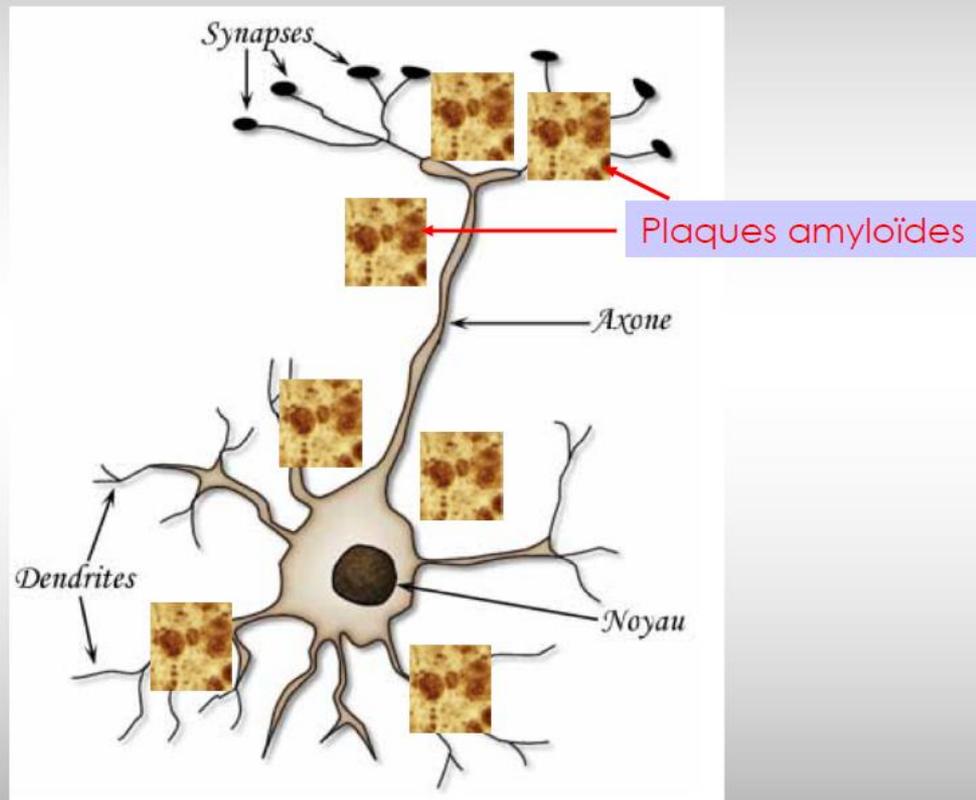
- Tau soluble : peu de structure β
- PHF-Tau : présence de structure β significative (P301S, FTDP-17) : 57±6%

## La maladie d'Alzheimer

Dépôts  
intra-cellulaires  
de protéine Tau  
(famille des MAP)

Dépôts  
extra-cellulaires  
du peptide  $\beta$ -amyloïde  
(précurseur de l'APP)

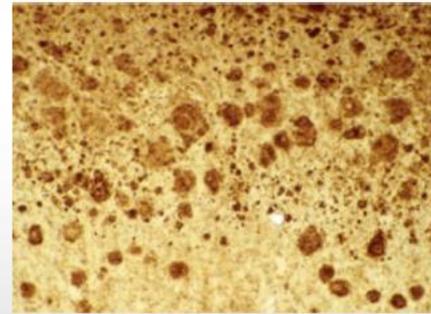
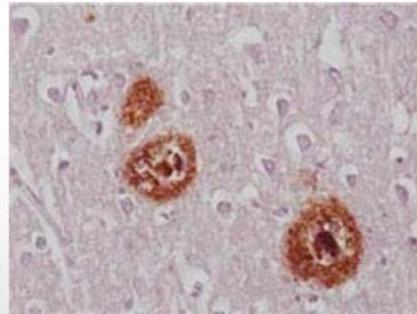
## Les dépôts extra-cellulaires de peptide $\beta$ -amyloïde



## D'où vient le terme d'amyloïde ?



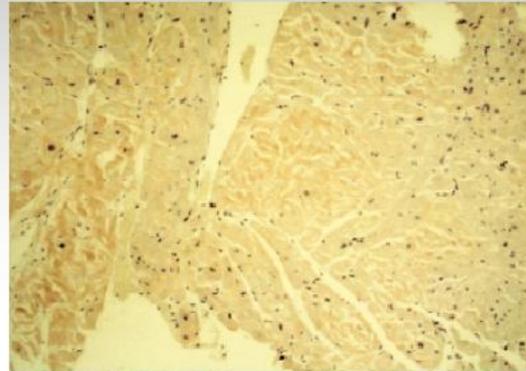
- 1855 : Virchows définit sous le terme d'amyloïde une substance qui se colore comme l'amidon en brun acajou en présence de Rouge congo (gr. *amylon* : amidon)



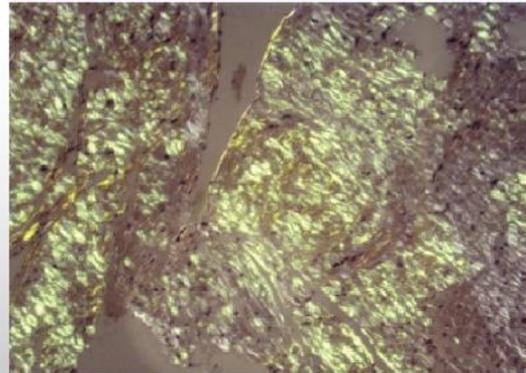
- Le terme de dépôts ou plaques amyloïdes va persister pour toutes les protéines capables de lier le rouge Congo

## Caractéristique d'une protéine amyloïde

Grande affinité pour le rouge  
Congo



Biréfringence verte sous lumière  
polarisée



Cortex humain

## Purification et analyse du contenu des plaques amyloïdes (1/4)

Cerveau humain de patient Alzheimer



Dissection du cortex et de l'hippocampe



Resuspendu dans un tampon  
Tris.Cl pH 7.4/SDS 2%/EDTA 2mM  
/β-mercaptoethanol 1%  
(plusieurs cycles successifs)



Filtration 40 μM



Centrifugation 40,000 g



Culot resuspendu dans sucrose 30% (wt/v)



Gradient de Ficoll-400



Centrifugation 1,500 g



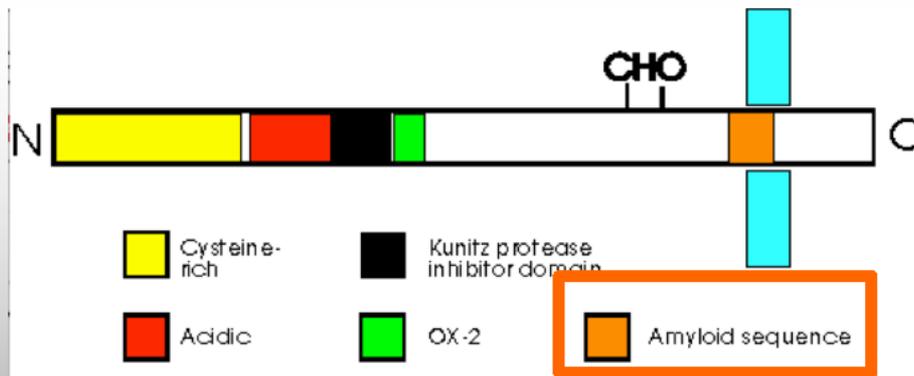
Interface 20-35% Ficoll récupérée  
lavée, centrifugée à 10,000 g



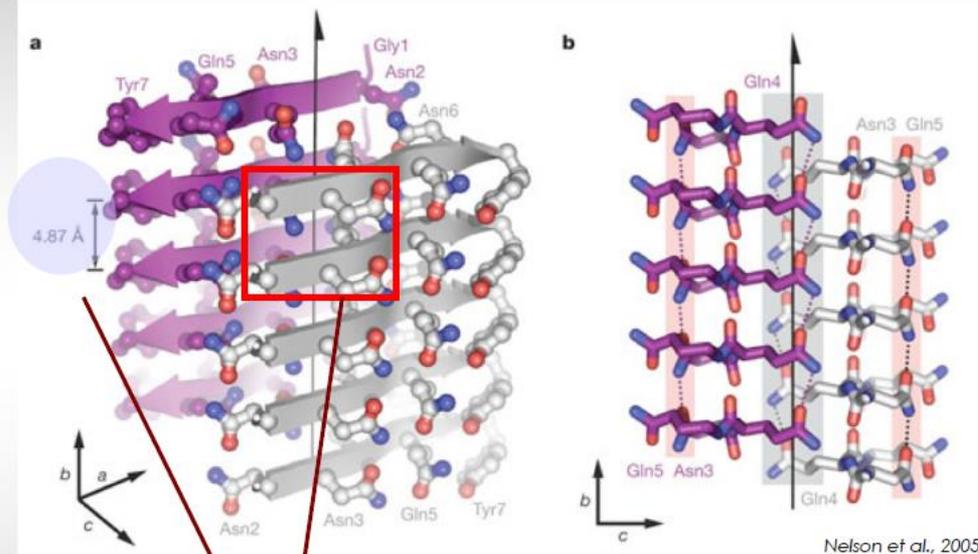
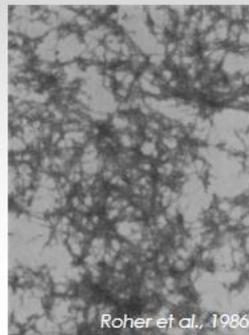
Analyse du contenu protéique

## Purification et analyse du contenu des plaques amyloïdes (2/4)

- La fraction protéique correspond à un peptide de 40 ou 42 acides aminés (peptide A $\beta$ 40 ou A $\beta$ 42) (Wong, 1984)
- Ces peptides proviennent en fait d'un précurseur transmembranaire, dont la fonction est inconnue, appelé APP (**A**myloid **P**recursor **P**rotein)



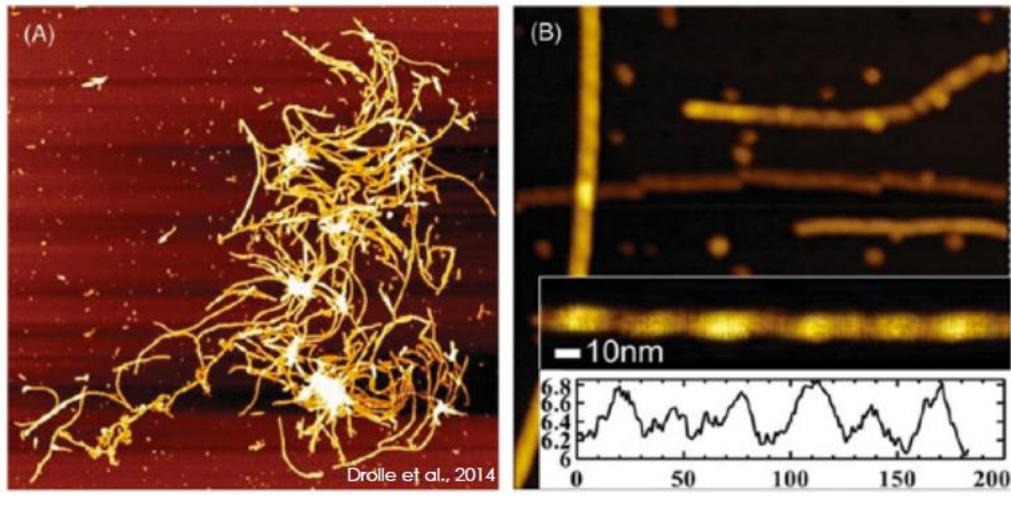
## Purification et analyse du contenu des plaques amyloïdes (3/4)



Le peptide  $\beta$ -amyloïde montre une structure  
en feuillets cross-beta séparés par une  
distance de 0.48 nm

## Le peptide A $\beta$ 1-42 en solution (AFM)

- A. Peptide A $\beta$ 1-42 incubé 24h en solution et déposé sur une plaque de mica : on aperçoit beaucoup de fibrilles sous forme de clusters à la surface du mica (de 100 nm à plusieurs  $\mu$ m)
- B. Image de haute résolution montrant des fibrilles formant des structures hélicoïdales



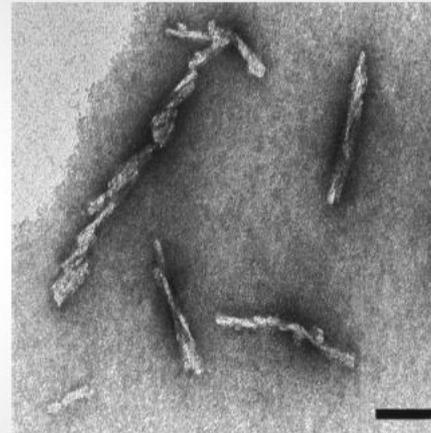
## Les maladies à prions

Mise en évidence de fibrilles  
associées à la scrapie du mouton,  
absentes du cerveau sain

*(Merz et al., 1981)*



**SAF**, Scrapie-Associated  
Filaments



## Purification et analyse du contenu de cerveaux de hamsters contaminés

Cerveau de hamsters contaminés



Centrifugations différentielles



Extractions Triton-  
Déoxycholate  
Précipitations PEG



Traitement micrococcal nucléase  
et protéinase K



Reste une espèce de 27-30 kDa



Microséquençage N-terminal



Identification de 15 résidus



Sondes oligonucléotidiques dégénérées



Criblage d'une banque d'ADNc de hamster  
infecté par la scrapie

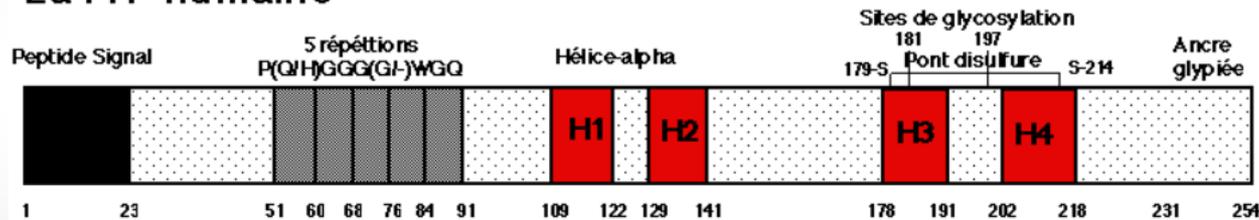


**Clonage de l'ARNm PrP**

## La protéine prion PrP

- La PrP est une protéine de 254 acides aminés codée par un gène unique (sur le chromosome 20 chez l'homme)
- Il apparaît que la PrP<sup>27-30</sup> est en fait un fragment résistant à la PK d'une protéine plus importante qui a perdu les 70 premiers acides aminés environ :

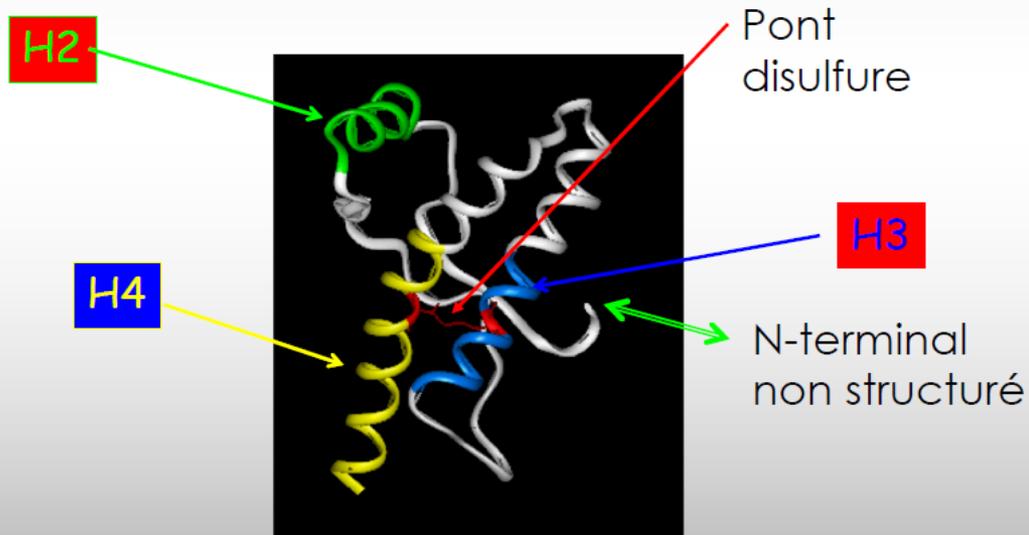
### La PrP humaine



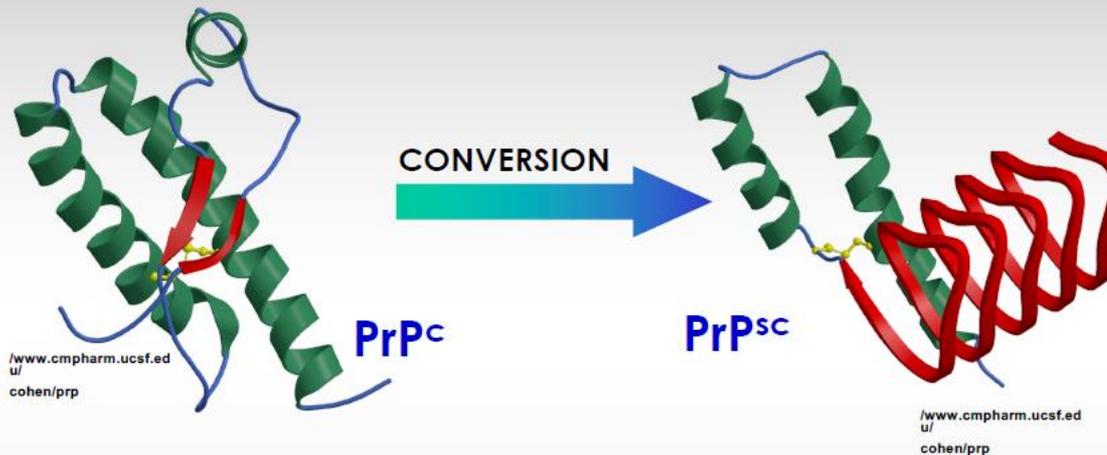
- ✓ Protéine très hydrophobe
- ✓ Répétitions : PHGGGWGQ (4-5 fois). Lie le Cu(II)
- ✓ Ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) : modification post-traductionnelle lipidique permettant l'ancrage de la protéine à la surface cellulaire

## La protéine prion PrP<sup>C</sup> et la PrP<sup>Sc</sup> (1/2)

- La PrP<sup>C</sup> est soluble, tandis que la PrP<sup>Sc</sup> forme des fibrilles retrouvées dans le cerveau d'animaux contaminés
- La PrP<sup>27-30</sup> est la forme N-terminal tronquée de la PrP<sup>Sc</sup>
- Structure 3D de la PrP humaine (RMN) :



## La protéine prion PrP<sup>c</sup> et la PrP<sup>sc</sup> (2/2)

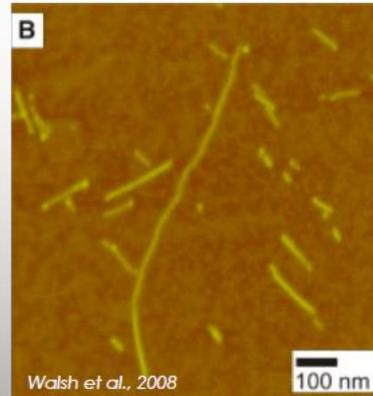
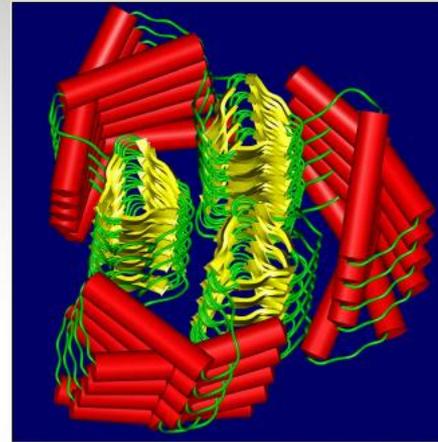
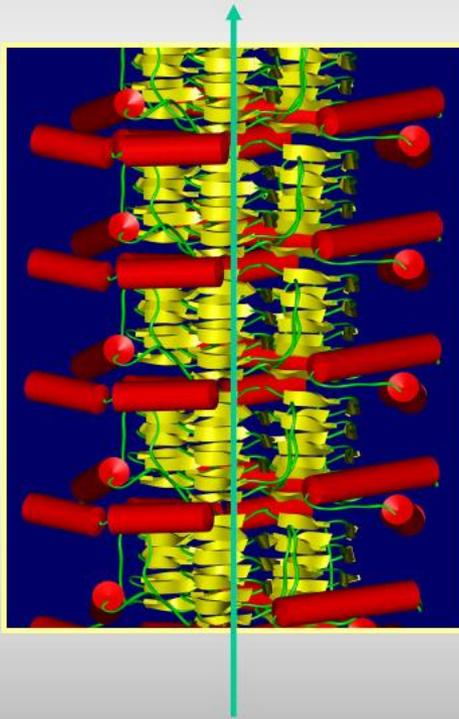


- Protéine normale de la surface neuronale
- Structure en hélice alpha
- Fonction inconnue
- Sensible aux protéases
- Soluble dans les détergents

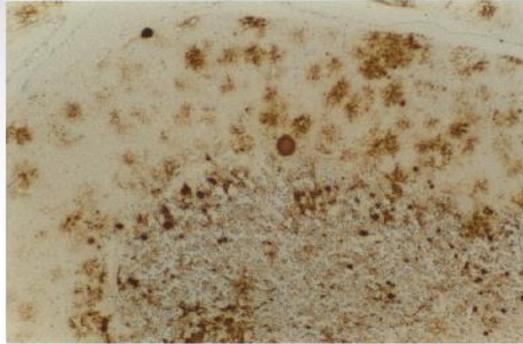
- Présente uniquement dans les cerveaux atteints
- Structure en feuillet  $\beta$
- Composante principale des prions
- Résistante aux protéases
- Insoluble dans les détergents

## La PrP<sup>Sc</sup> (1/2)

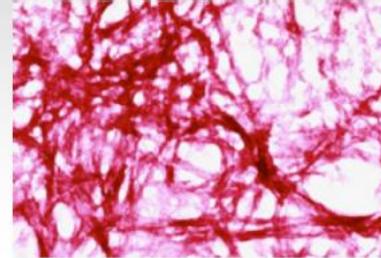
Modèle d'agrégation de  
la PrP<sup>Sc</sup> en  $\beta$ -hélice



## La PrP<sup>sc</sup> (2/2)



Plaques amyloïdes de PrP  
dans le cerebellum



Coloration au Rouge Congo  
associée à une biréfringence

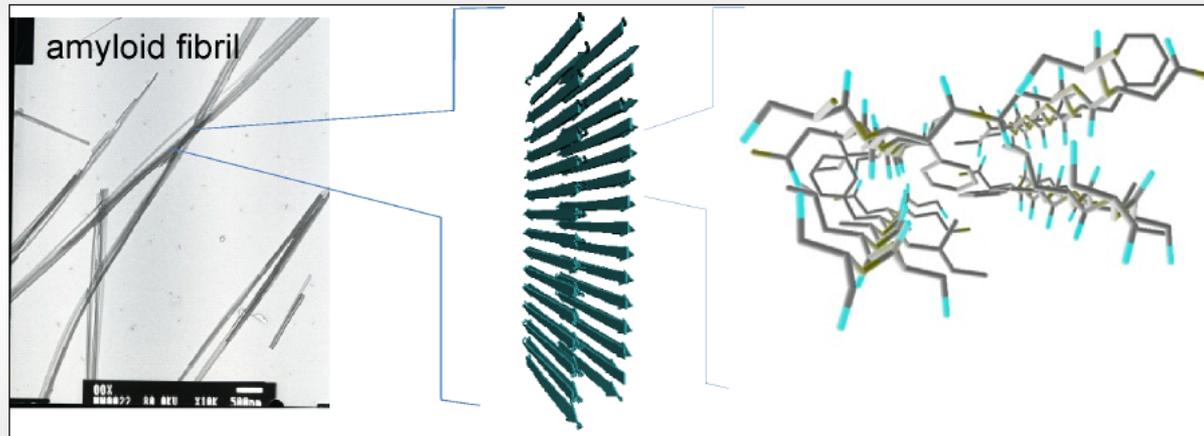
## Conclusion

Une protéine amyloïde est une protéine extra-cellulaire, qui infiltre les organes, et qui présente les caractéristiques suivantes :

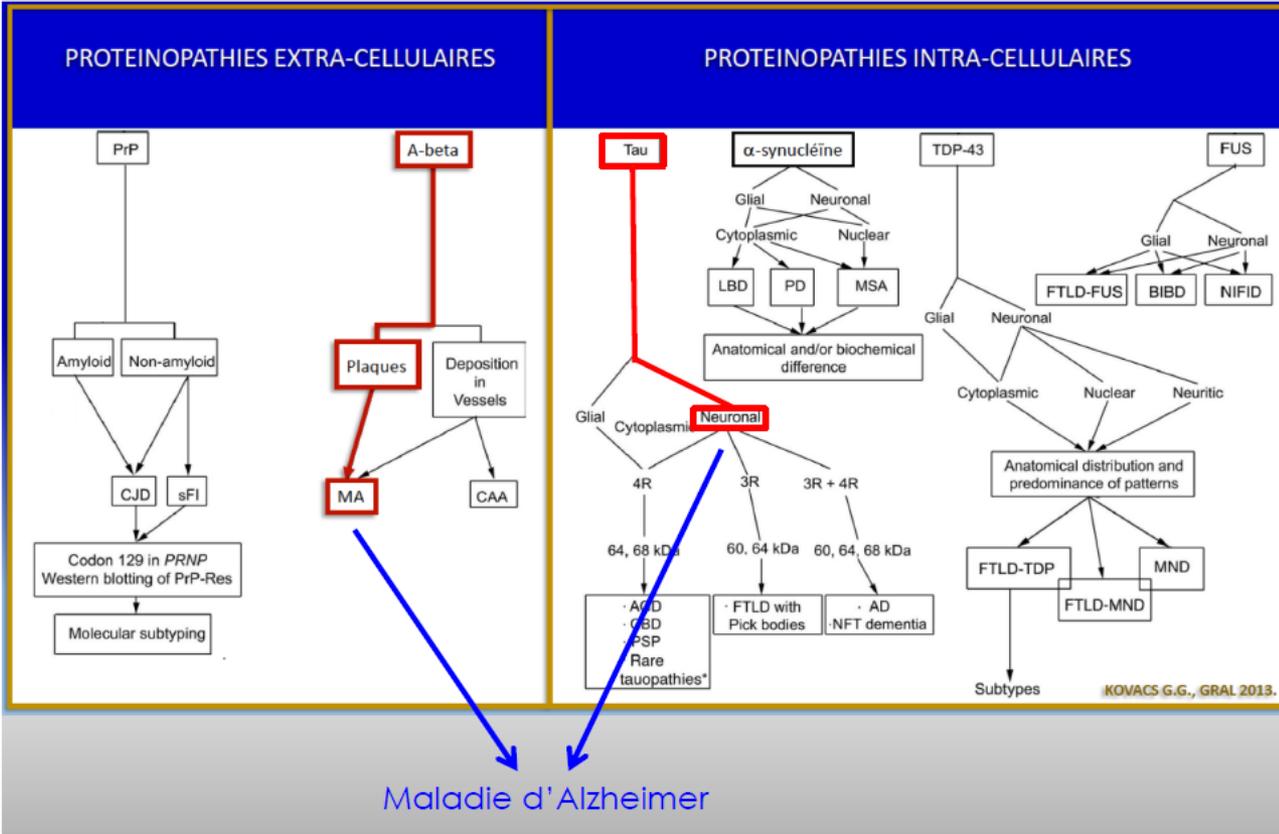
- Une protéine amyloïde, sous sa forme agrégée, est très **résistante aux enzymes protéolytiques**
- Elle montre une affinité pour le **rouge Congo**, une **biréfringence** en lumière **polarisée**, des propriétés métachromatiques (liaison à d'autres colorants comme la thioflavine, le violet de Paris, etc...)
- Elle présente un aspect **fibrillaire** en microscopie électronique

## Conclusion

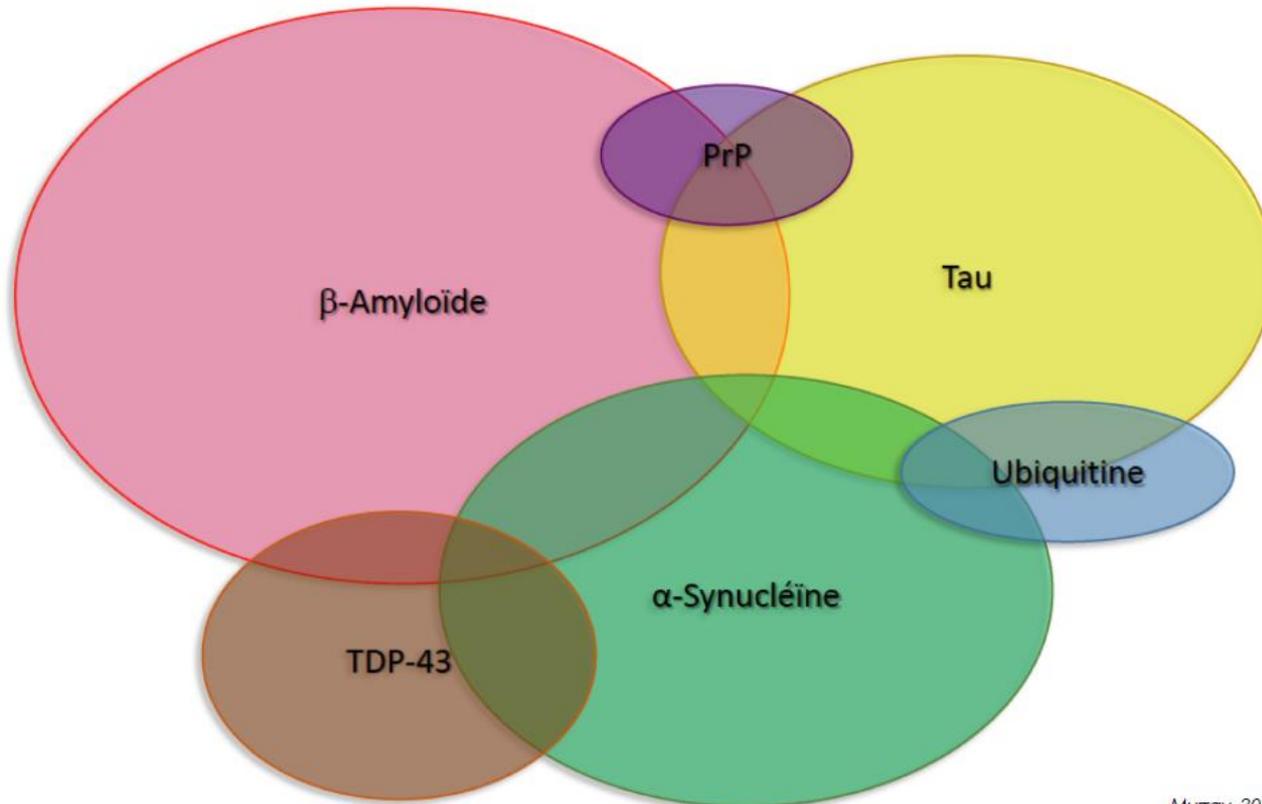
- Et une structure moléculaire en feuillets plissés de type  $\beta$ , orientés perpendiculairement à l'axe de l'hélice ou de la fibre :



# Conclusion



## Conclusion



## Les causes des processus agrégatifs (1/3)



Quels sont les facteurs à l'origine des processus agrégatifs conduisant aux maladies neurodégénératives ?

- Événements stochastiques :
  - ✓ Risques constants au cours de la vie d'un individu

## Les causes des processus agrégatifs (2/3)

- Événements déterministes :
  - ✓ Altération du dosage génétique entraînant une augmentation de la concentration protéique
    - ❖ Maladie de parkinson familiale : triplication du locus  $\alpha$ -synucléine
    - ❖ Dépôts précoces de plaques amyloïdes dans le syndrome de Down ou trisomie 21 : copie supplémentaire du locus APP (chromosome 21)
  - ✓ Apparition de mutations :
    - ❖ Altération de la structure primaire : la protéine plus apte à agréger. C'est le cas des protéines à expansion du stretch de polyglutamines qui favorise l'agrégation
    - ❖ Mutations dans la séquence : lysozyme (F57I → amyloïdose rénale)
  - ✓ Environnement local :
    - ❖ Une modification du pH, de la concentration en sels,...

## Les causes des processus agrégatifs (3/3)

- Événements déterministes :

- ✓ Modifications covalentes de protéines :

- ❖ Oxydation

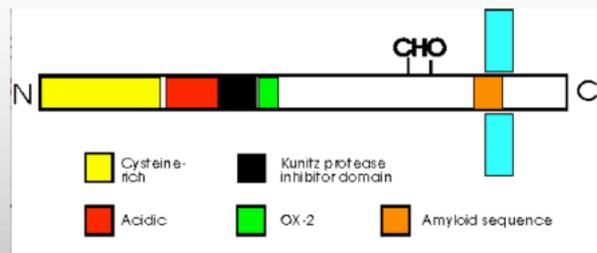
- ❖ Phosphorylations :

- **Maladie de Parkinson sporadique** : Présence d'  $\alpha$ -synucléine phosphorylée sur la Ser129

- **Maladie d'Alzheimer** : Hyperphosphorylation de Tau sur la Thr231

- ✓ Clivages protéolytiques (maladie d'Alzheimer) :

- ❖ Coupure amyloïdogène de l'APP par les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases qui conduisent à la production de peptide A $\beta$  40 & 42 qui s'agrègent



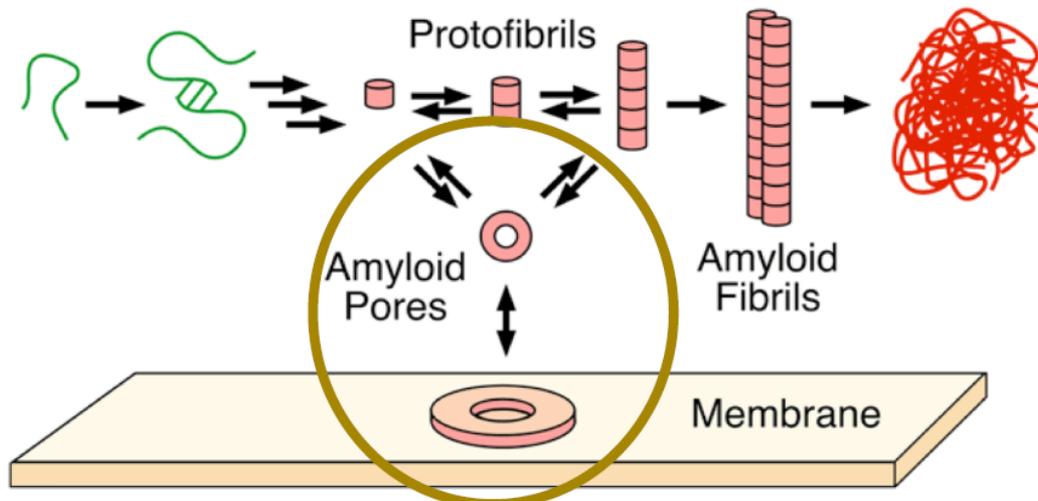
Quelles sont les conséquences de ces mauvais repliements et de la formation de ces fibrilles ?

# Les conséquences

## 1. Accumulation

Les agrégats fibrillaires de protéine peuvent ne pas être toxiques par eux-mêmes, mais en tout cas leur accumulation provoque un dommage aux tissus (amyloïdoses)

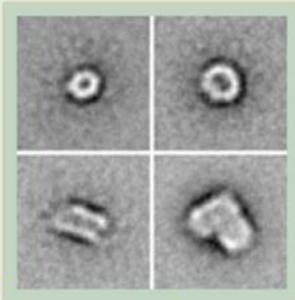
### Formation de pores



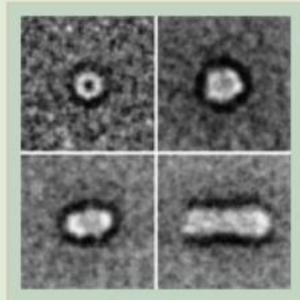
**Hypothèse** : les pores tueraient les neurones à cause d'une perméabilisation non contrôlée

# Les conséquences : la formation de pores

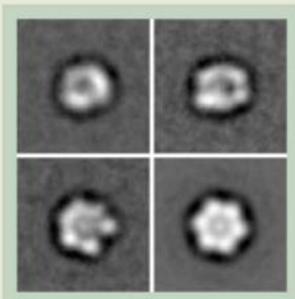
in vitro



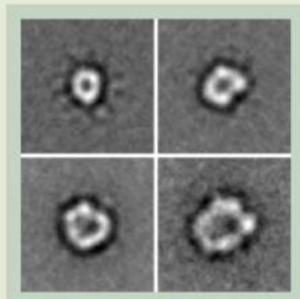
$\alpha$ -Synuclein



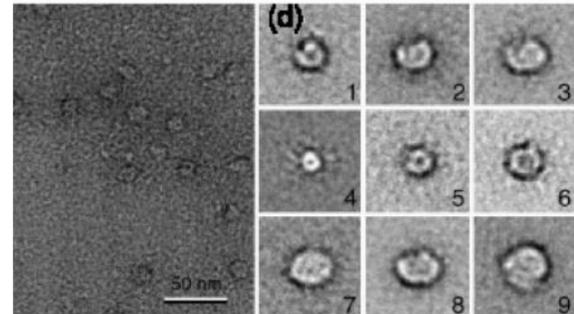
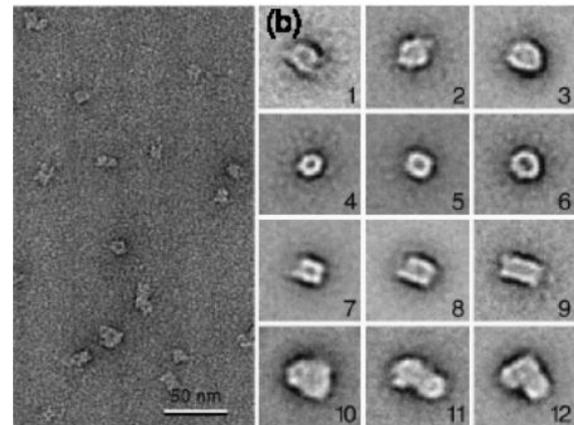
$\beta$ -Amyloid



Serum Amyloid A

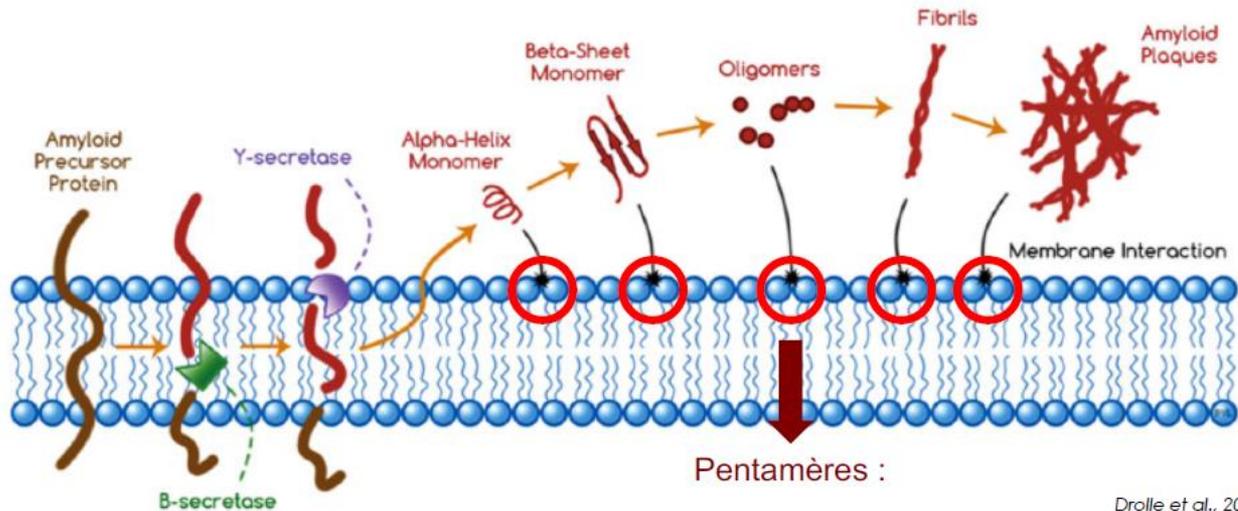


Superoxide Dismutase



Mutations A30P et A53T de l' $\alpha$ -synucléine montrant la formation de pores et d'anneaux

## Les conséquences : la formation de pores



*Drolle et al., 2014*

Schéma illustrant la formation des fibrilles amyloïdes et des mécanismes potentiels de toxicité

- Probablement l'espèce la plus toxique
- Formerait des aquaporines-like dans les membranes des cellules
- Par exemple, on a pu montrer qu'ils perturbaient la membrane des vésicules dopaminergiques

## Les conséquences

### 1. Accumulation

Les agrégats fibrillaires de protéine peuvent ne pas être toxiques par eux-mêmes, mais en tout cas leur accumulation provoque un dommage aux tissus (amyloïdoses)

### 2. Perte de fonction

Une mutation peut entraîner une perte ou une diminution de fonction de la protéine

### 3. Gain de toxicité

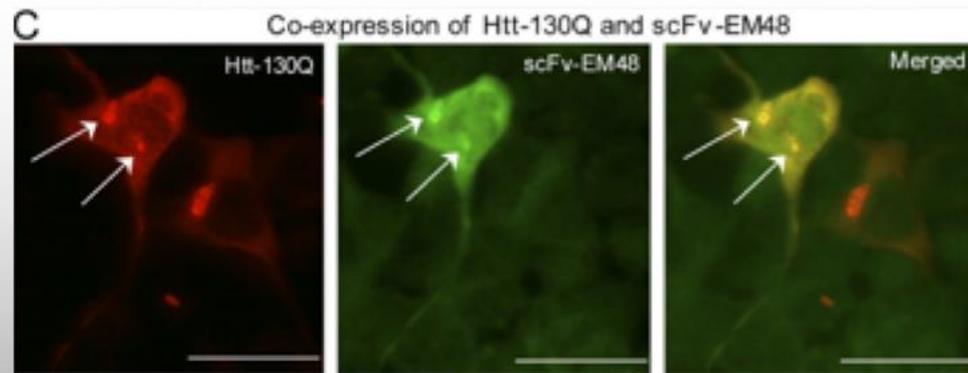
L'effet délétère peut être aussi dû à un gain d'activité, ici de toxicité, comme dans les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington,...) où le mauvais repliement conduit à la formation d'amyloïdes potentiellement **toxiques** pour la cellule mais aussi potentiellement **transmissibles**

## Les conséquences : gain de toxicité (1/7)

Conséquence de l'accumulation de huntingtine (HTT) dans le cytoplasme

- **But** : démontrer ou infirmer le rôle des agrégats de HTT dans la pathogenèse de la maladie de Huntington
- **Méthode** : les auteurs ont généré un anticorps (« antibody », scFv-EM48) exprimé à l'intérieur des cellules (« intrabody ») et qui cible spécifiquement le mutant HTT

*HEK-293 co-transfectées avec le mutant htt-130Q*

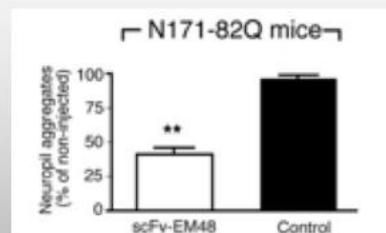
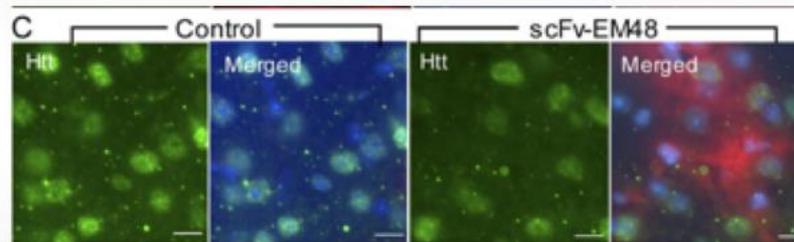


Wang et al., 2008

## Les conséquences : gain de toxicité (2/7)

Conséquence de l'accumulation de huntingtine (HTT) dans le cytoplasme

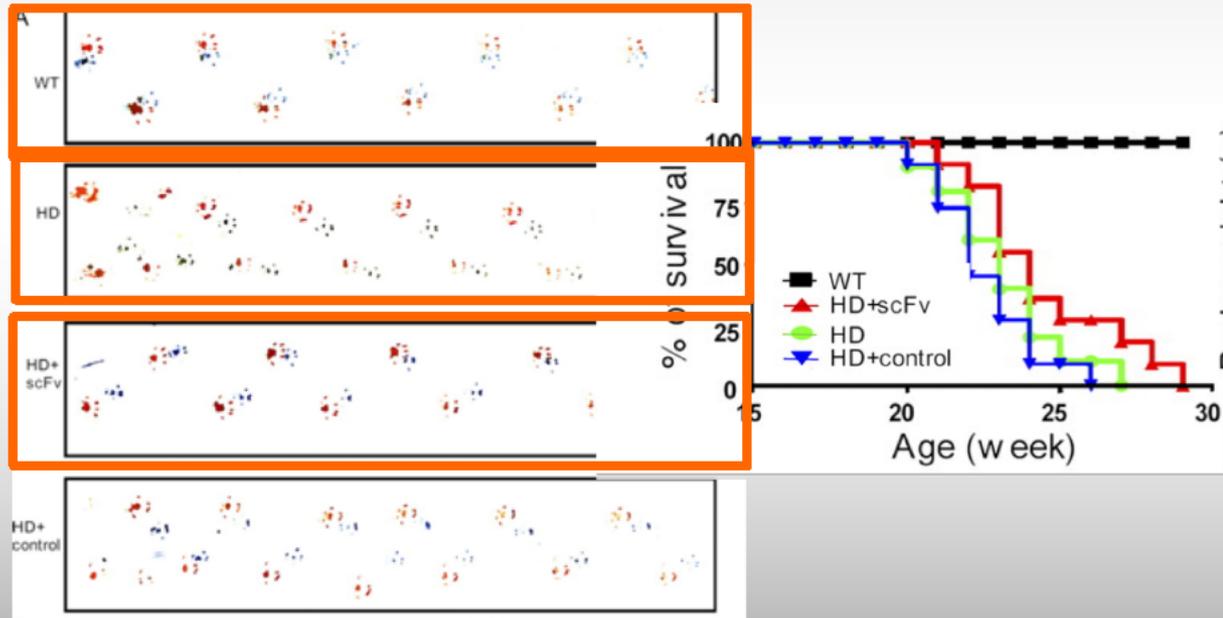
- L'anticorps scFv-EM48 réduit la formation d'agrégats de HTT dans le cerveau de souris N171-82Q :



## Les conséquences : gain de toxicité (3/7)

Conséquence de l'accumulation de huntingtine (HTT) dans le cytoplasme

- scFv-EM48 limite les déficits moteurs observés chez la souris N171-82Q



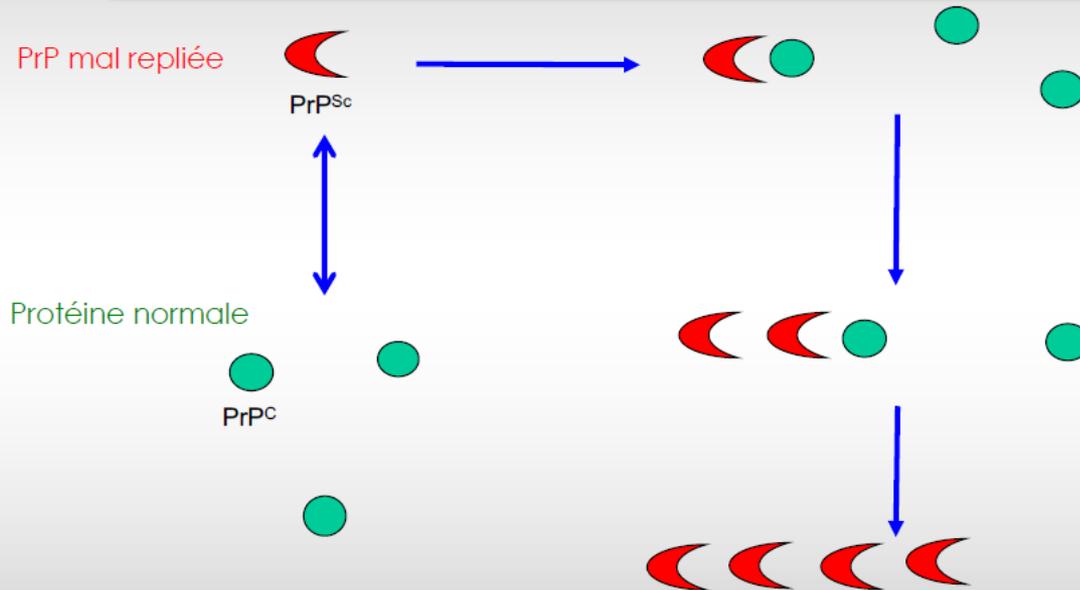
## Les conséquences : gain de toxicité (4/7)

Conséquence de l'accumulation de huntingtine (HTT) dans le cytoplasme

- En conclusion :
  - ✓ Cette étude montre que l'accumulation de HTT dans le cytoplasme a un rôle dans la pathogenèse de la maladie de Huntington (déficits moteurs)
  - ✓ Et donc que les agrégats de HTT peuvent constituer une cible thérapeutique

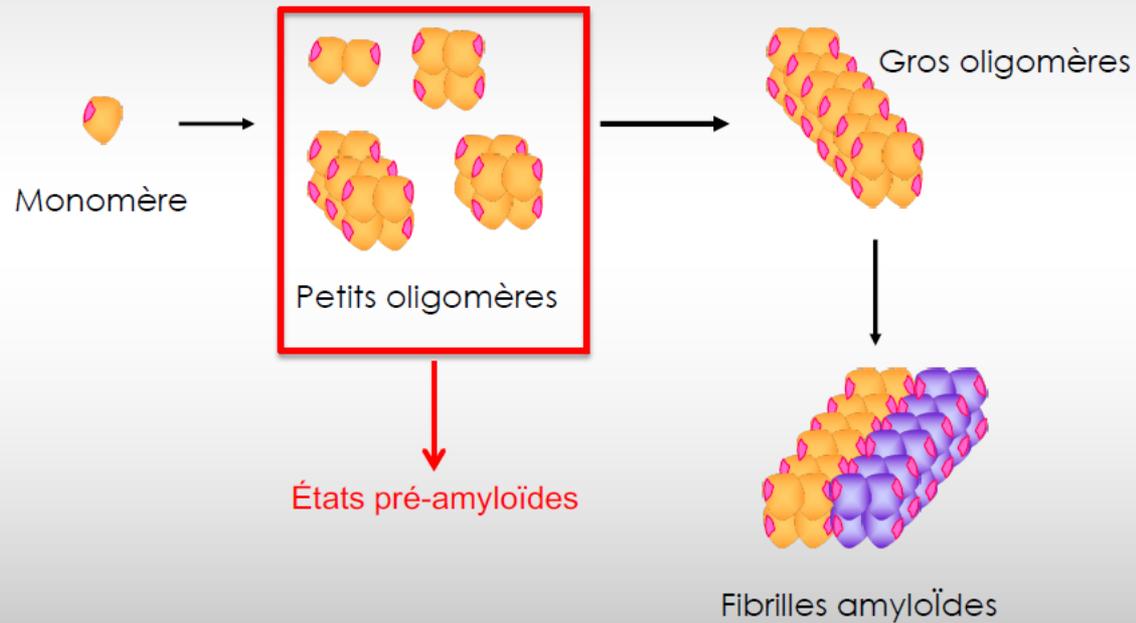
## Les conséquences : gain de toxicité (5/7)

Les protéines mal repliées peuvent être infectieuses  
(cas des maladies à prions)

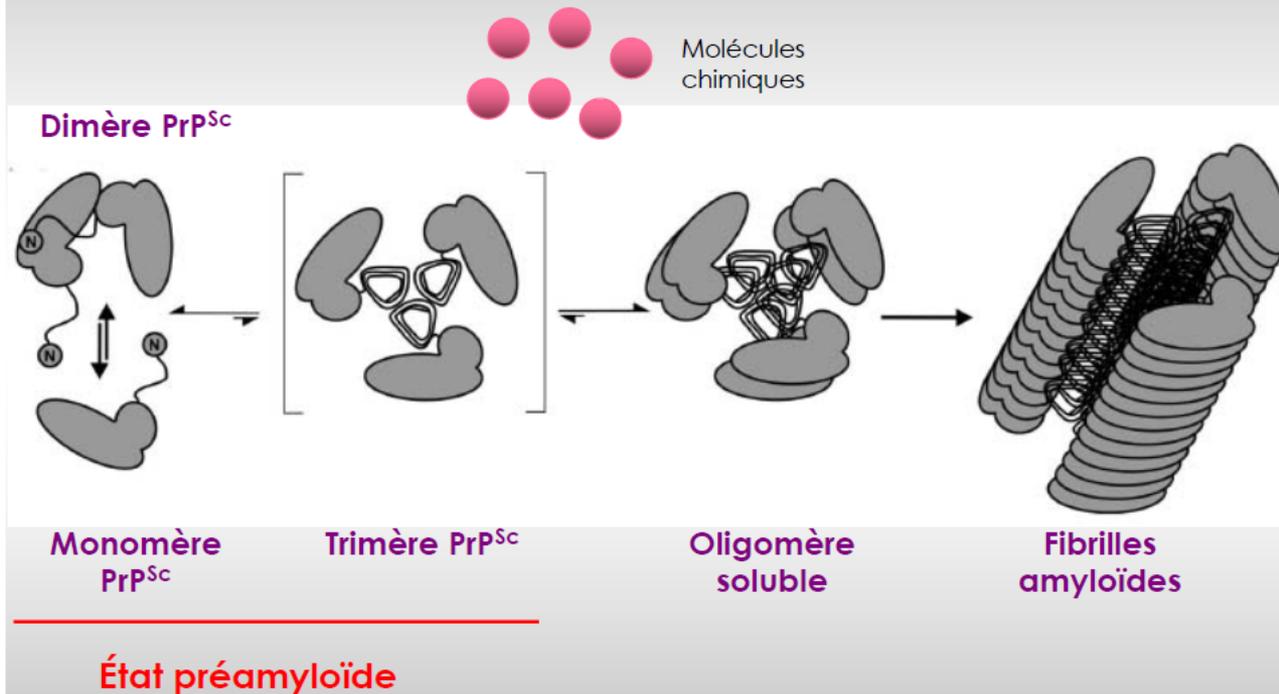


## Les conséquences : gain de toxicité (6/7)

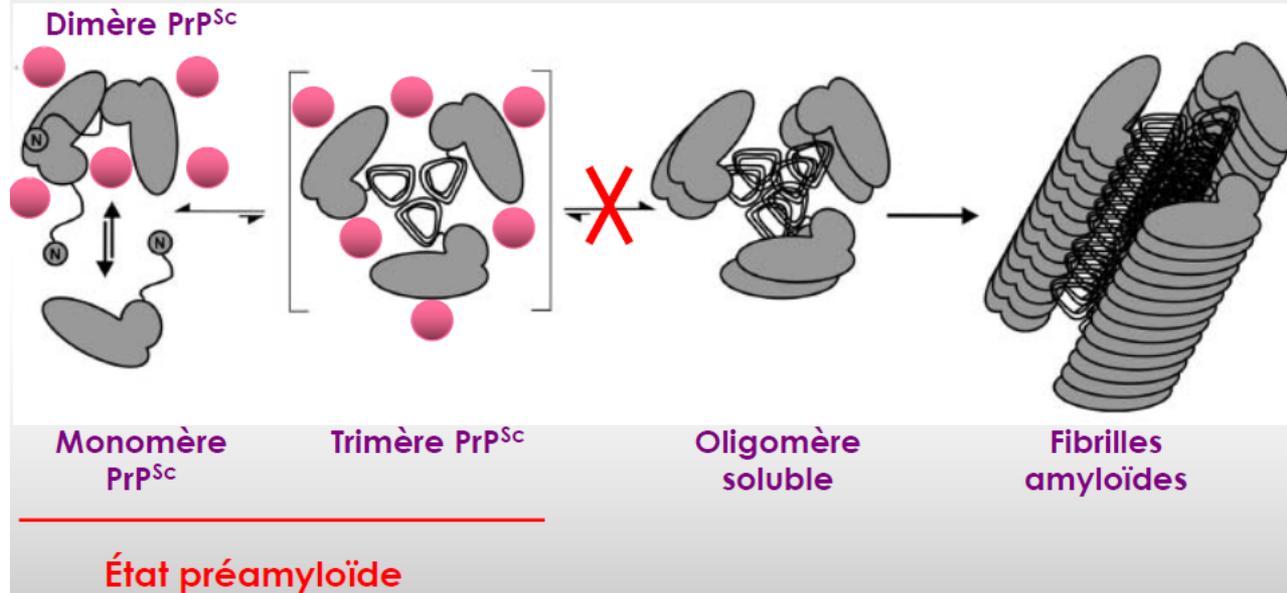
Les différents états au cours des processus agrégatifs



## Les formes préamyloïdes : des cibles pour le criblage de drogues à effets potentiellement thérapeutiques



## Les formes préamyloïdes : des cibles pour le criblage de drogues à effets potentiellement thérapeutiques



## Du criblage virtuel au criblage cellulaire

Chimiothèque virtuelle  
(Dr D. Rognan, Strasbourg)

350 000 molécules



Modélisation moléculaire

Docking *in silico*

37 molécules

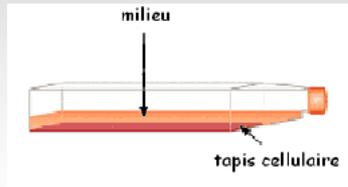


Criblage *in vitro*

32 composés

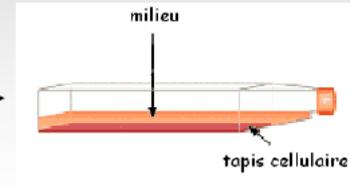
Neuroblastomes murins N2a58 infectés  
par la souche de prions 22L (Nishida et al., 2000)

## Test de criblage cellulaire



+ produit criblé  
virtuellement à  
20  $\mu\text{M}$

3 jours  
37 °C



Lyse



Détection de la  
PrP<sup>Sc</sup> (résistante à la PK)  
par Immunoblot

Digestion  
Protéinase K  
1h à 37°C

Dosage (test BCA)  
et normalisation du  
taux de protéines

## Conclusion générale

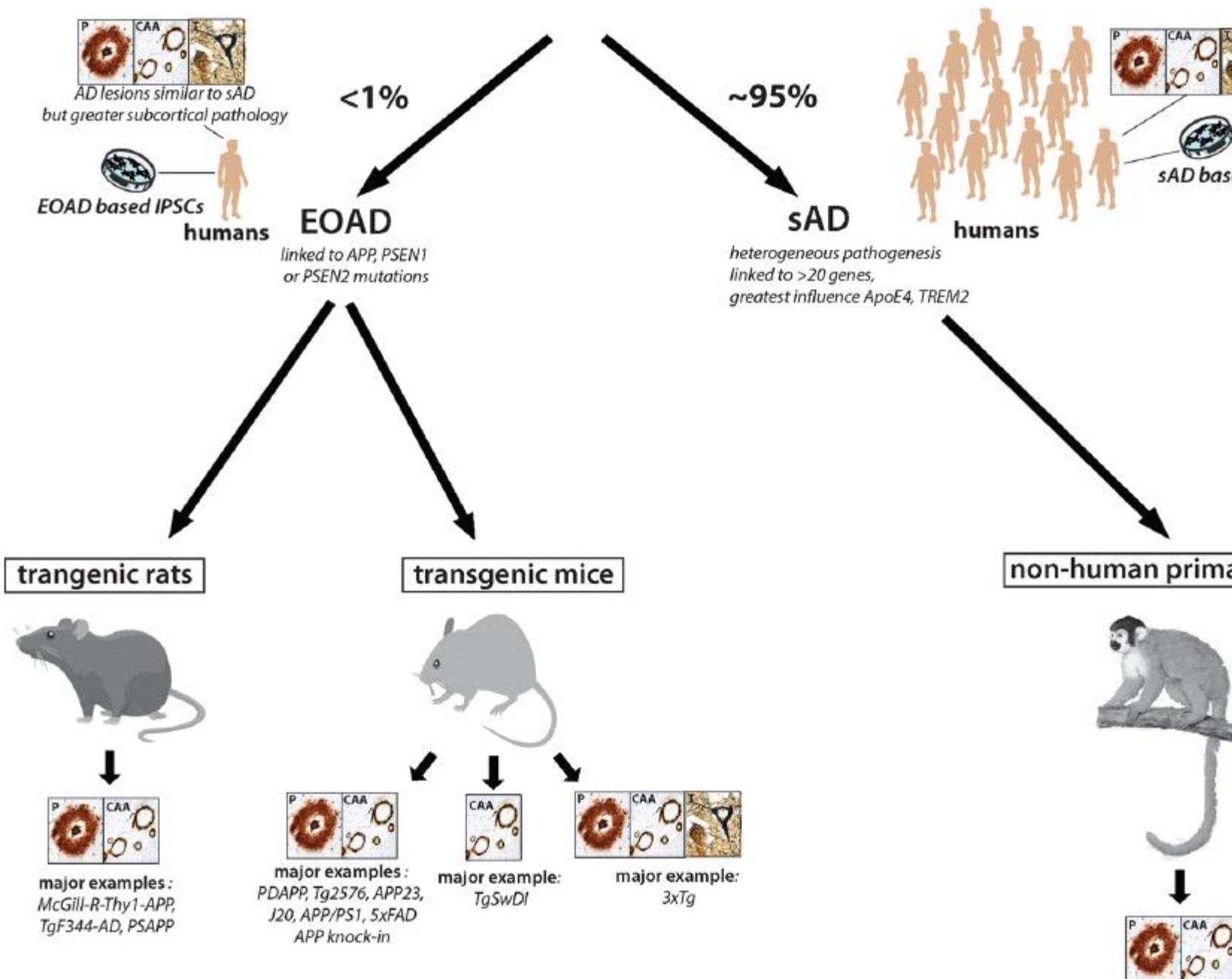
- Dans le cerveau, ces amyloïdoses sont associées à des démences neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la démence fronto-temporale,...)



- On note une **vulnérabilité neuronale sélective** (par exemple, les neurones dopaminergiques dans Parkinson ou cholinergiques dans Alzheimer, avec phénomènes dégénératifs dans des régions bien spécifiques)
- Il existe des souches d'amyloïdes selon les patients qui pourraient refléter :
  1. La diversité des zones atteintes
  2. La diversité des symptômes observés

# Exemples de Modèles animaux de maladies neurodégénératives

# Alzheimer's Disease



# *Microcebus murinus*

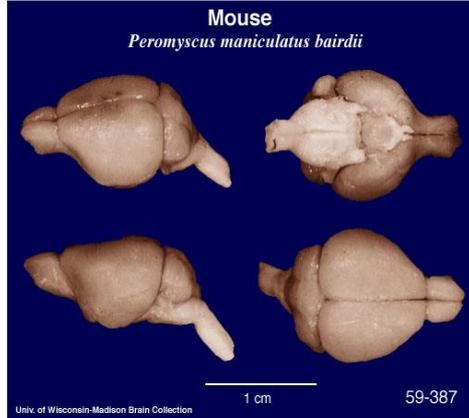
Primate, prosimien, lémurien, Cheirogalidae



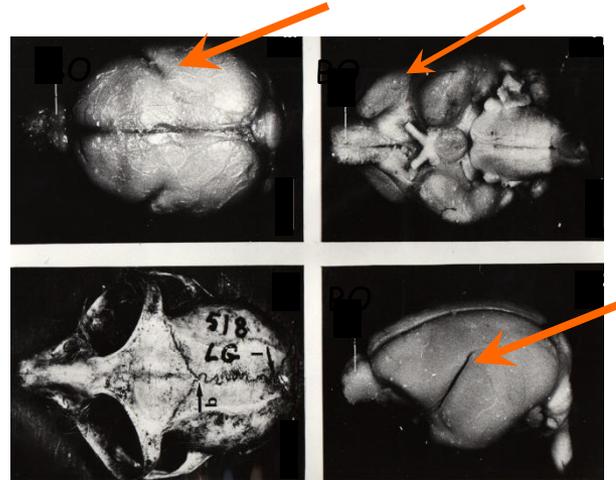
- Taille: 12 cm
- Poids: 70-120 g
- Longévité: 8-12 ans en captivité
- Maturité sexuelle: 6 - 8 mois
- Reproduction: 1 à 2 petits par an
- Avec l'âge, le microcèbe présente des similitudes avec le vieillissement humain

# Avantages par rapport aux rongeurs

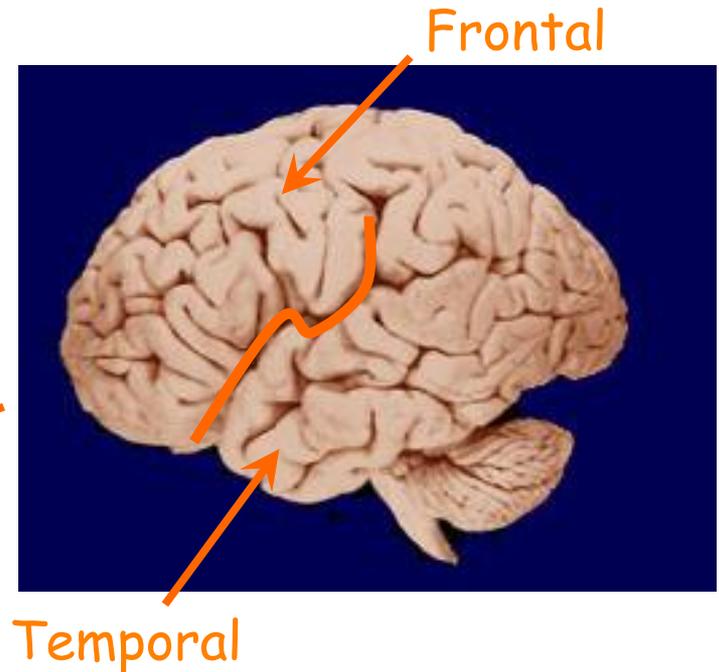
Cerveau de souris



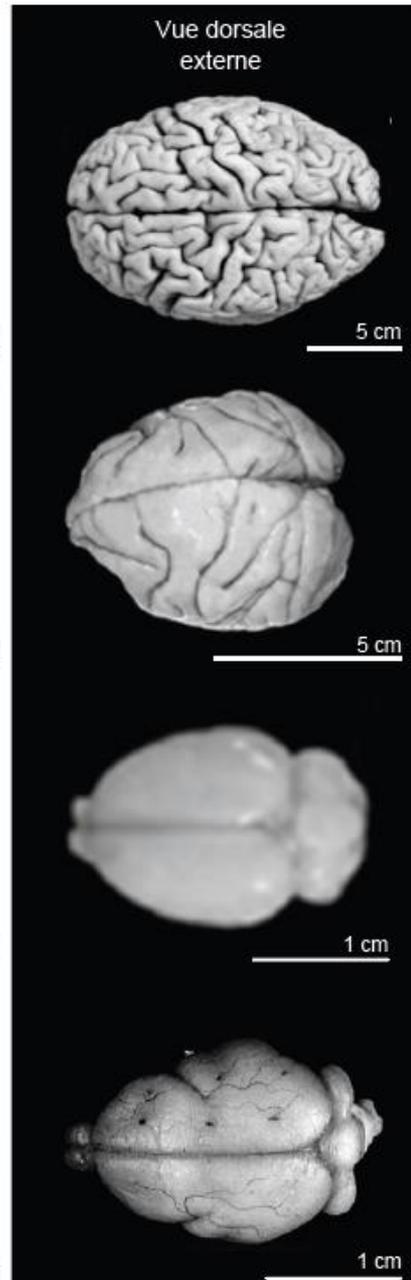
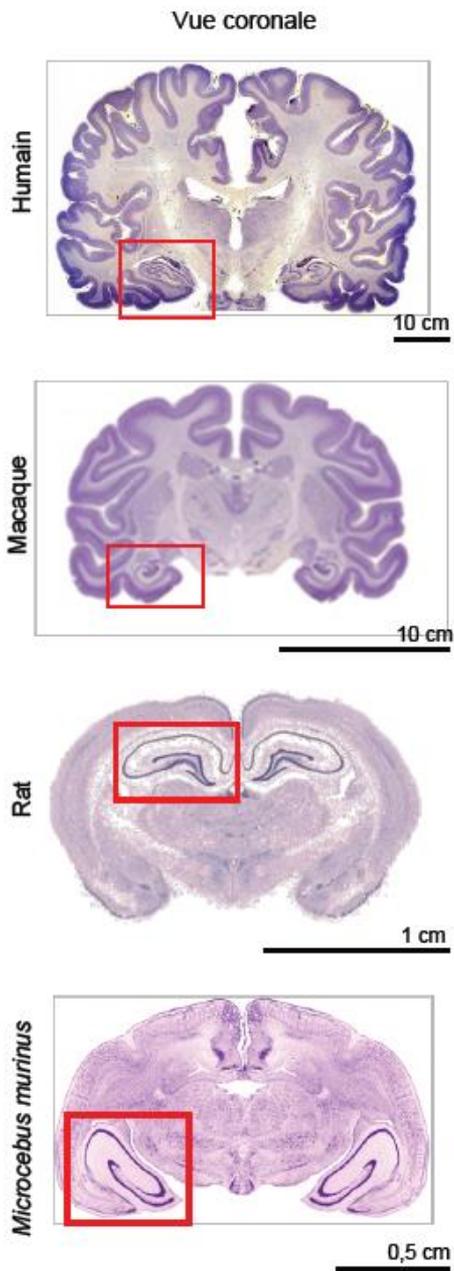
Cerveau de microcèbe



Cerveau humain



Présence d'un sillon profond chez le microcèbe  
à Lobes frontal et temporal plus développés chez ce primate  
(donc plus proche de l'homme)



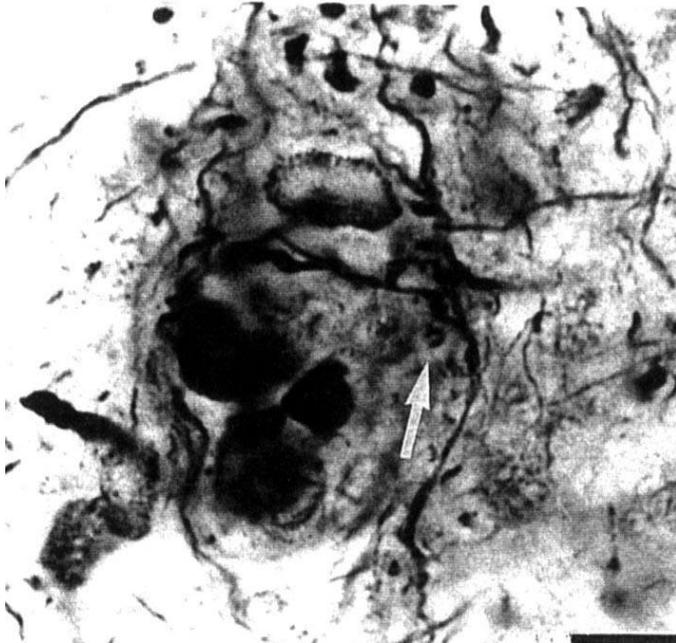
Localisation de  
l'hippocampe

# Le modèle microcèbe

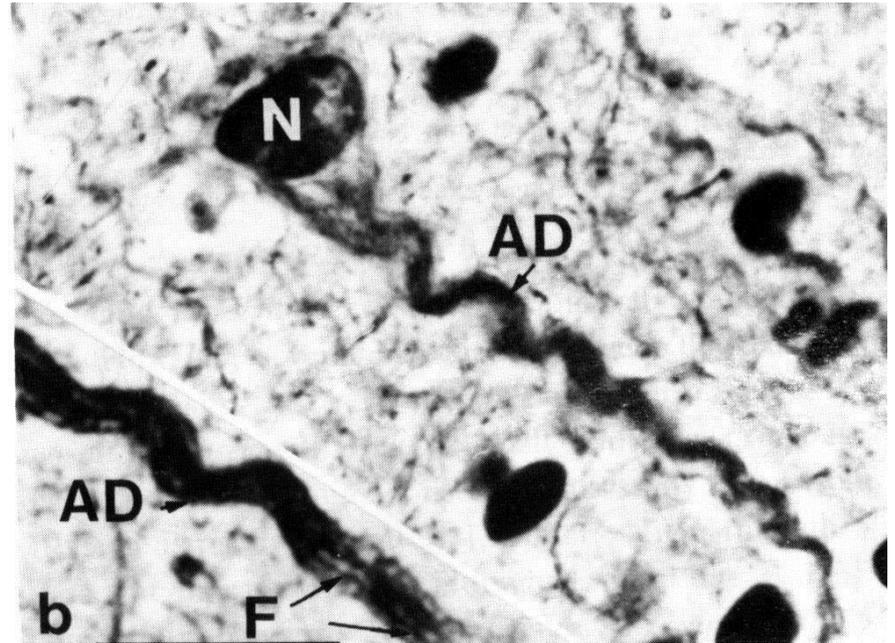


- Neuropathologie:
  - *plaques amyloïdes*
  - *protéine Tau anormale*
  - *Perte neuronale*
- Études comportementales
  - *exploration spontanée*
  - *discrimination*

# Lésions de type Alzheimer chez le microcèbe



Plaque



Dégénérescence  
neurofibrillaire

# Modifications physiques et comportementales liées à l'âge chez le microcèbe

- Blanchiment progressif du pelage
- Baisse des facultés sensorielles (vue, ouïe, olfaction)
- Motricité ralentie
- Désintérêt pour l'environnement extérieur
- Repli sur soi



Microcèbe âgé de 1  
an



Microcèbe âgé de 10  
ans

# Modifications cérébrales liées à l'âge chez le microcèbe

- Atrophie cérébrale en particulier du cortex, des noyaux de la base, du tronc cérébral et du cervelet, accompagnée d'une dilatation ventriculaire



Microcèbe jeune

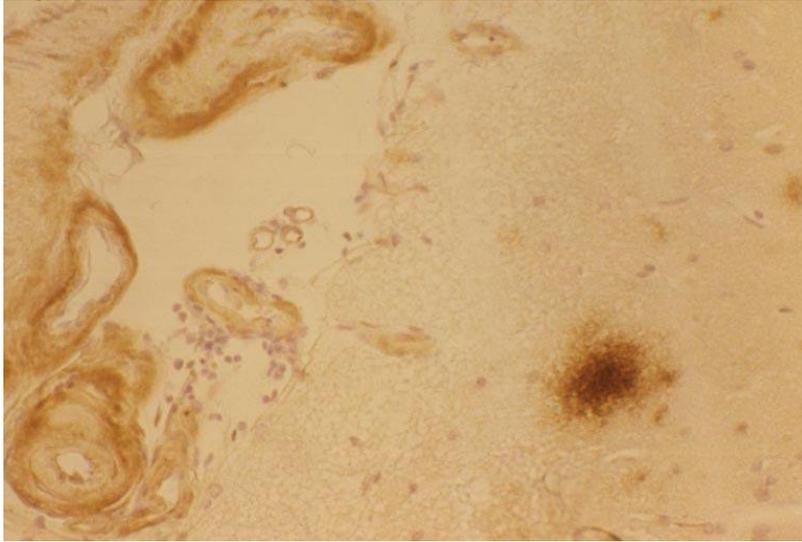


Microcèbe agé

# Modifications cérébrales liées à l'âge chez le microcèbe

- Atrophie cérébrale en particulier du cortex, des noyaux de la base, du tronc cérébral et du cervelet, accompagnée d'une dilatation ventriculaire
- Présence de dépôts amyloïdes:
  - dans la paroi des vaisseaux cérébraux
  - dans le parenchyme cortical sous forme de plaques diffuses et compactes accompagnées d'une gliose réactive

## Dépôts amyloïdes



Dépôts dans la paroi des vaisseaux sanguins



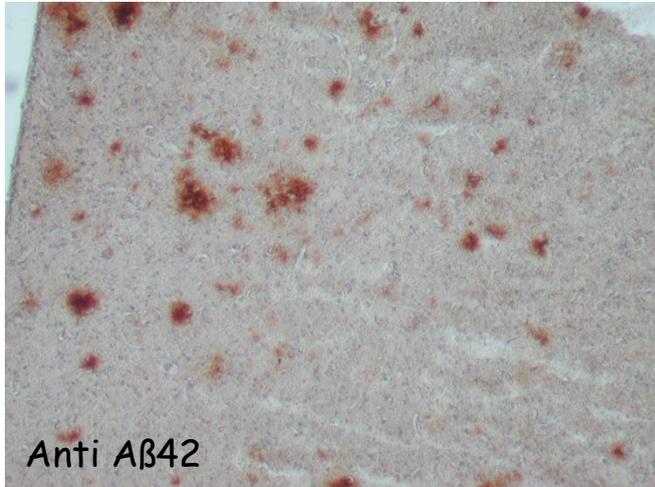
Plaques dans le cortex pariétal



# Neuropathologie: amyloïde

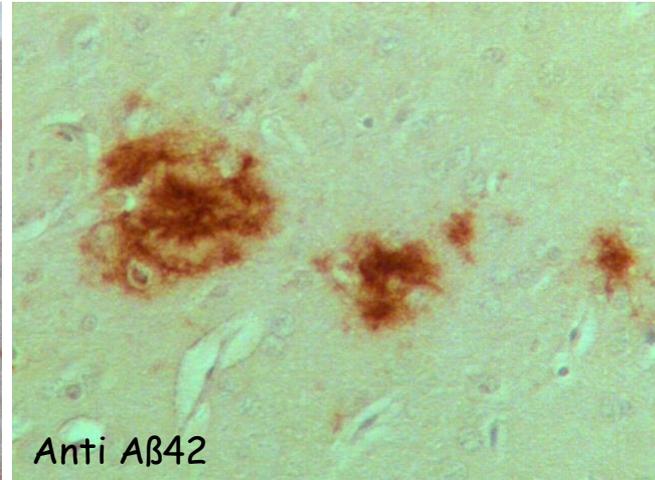
## Dépôts amyloïdes

Plaques diffuses

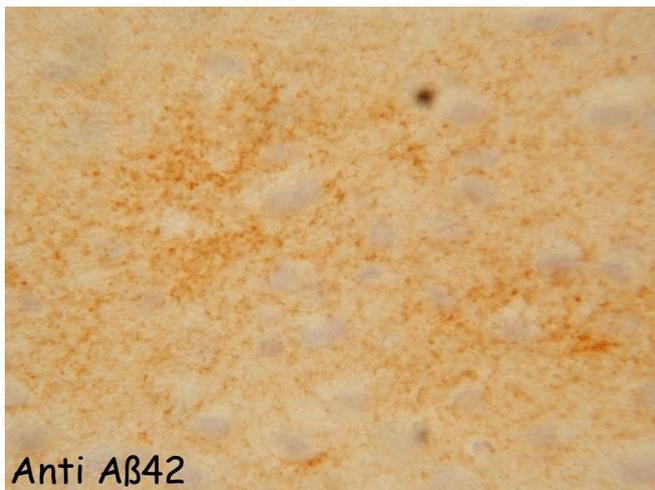


Anti Aβ42

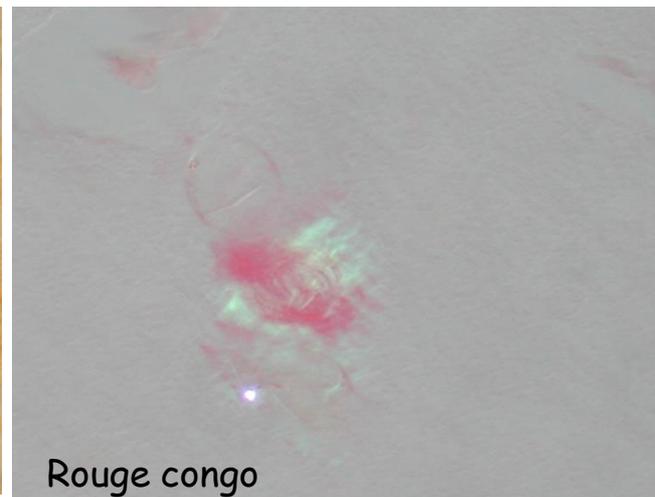
Plaques compactes



Anti Aβ42



Anti Aβ42



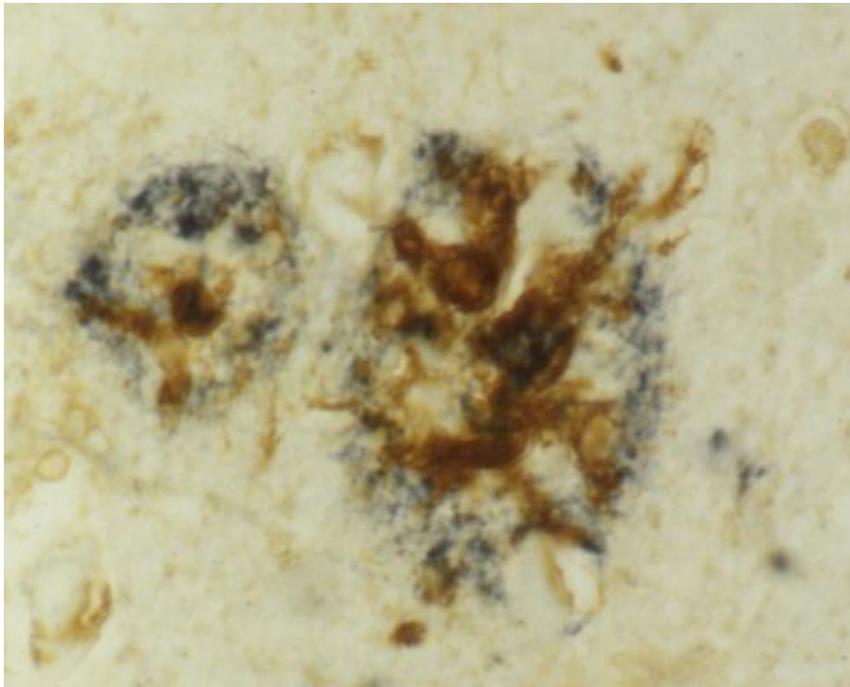
Rouge congo

# Modifications cérébrales liées à l'âge chez le microcèbe

- Atrophie cérébrale en particulier du cortex, des noyaux de la base, du tronc cérébral et du cervelet, accompagnée d'une dilatation ventriculaire
- Présence de dépôts amyloïdes:
  - dans la paroi des vaisseaux cérébraux
  - dans le parenchyme cortical sous forme de plaques diffuses et compactes accompagnées d'une *gliose réactive*

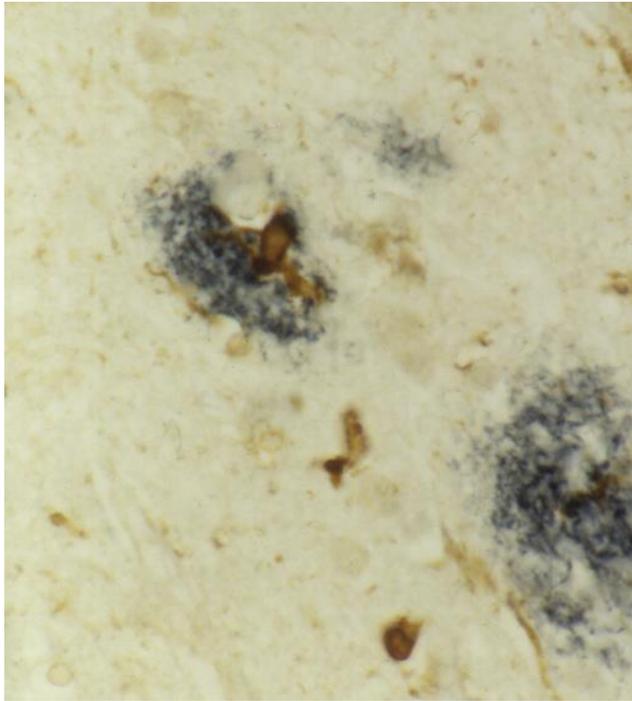
# Plaques séniles

Chez l'homme, les plaques amyloïdes s'accompagnent d'une gliose importante.

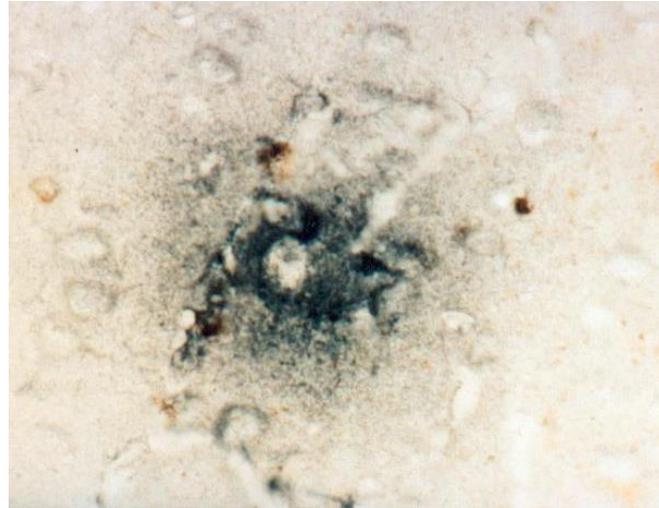


Double marquage anti  $\beta$  amyloïde et anti-ferritine: mise en évidence de la microglie au centre des plaques amyloïdes

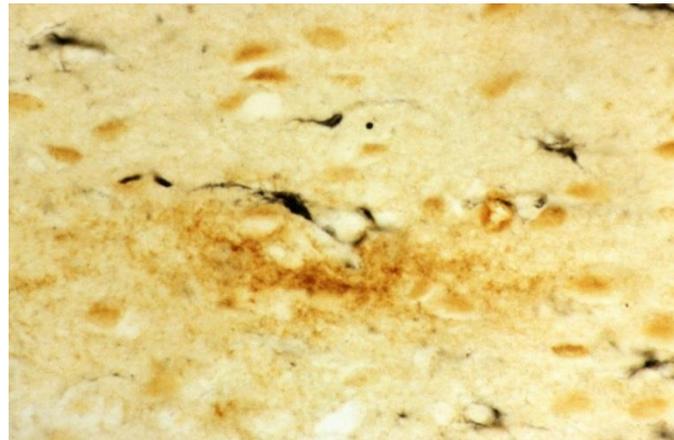
# Glie associée aux plaques



humain



microglie



astrocyte

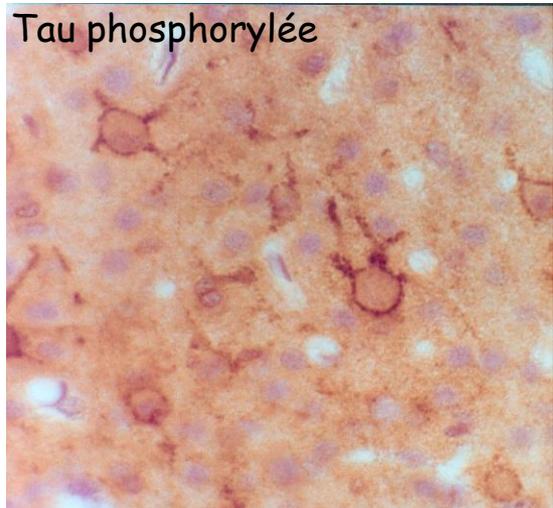
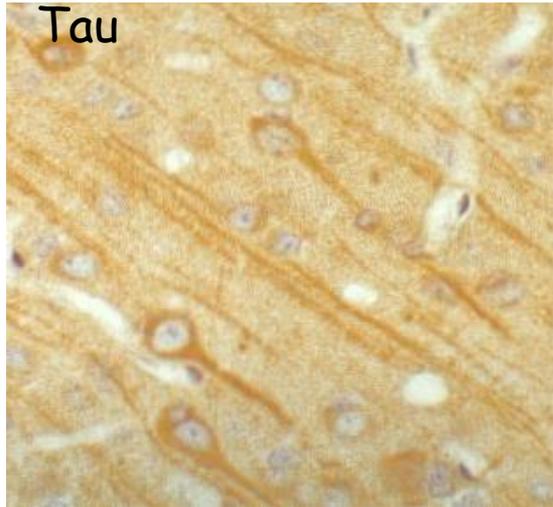
microcèbe

# Modifications cérébrales liées à l'âge chez le microcèbe

- Atrophie cérébrale en particulier du cortex, des noyaux de la base, du tronc cérébral et du cervelet, accompagnée d'une dilatation ventriculaire
- Présence de dépôts amyloïdes:
  - dans la paroi des vaisseaux cérébraux
  - dans le parenchyme cortical sous forme de plaques diffuses et compactes accompagnées d'une gliose réactive
- Présence de protéines Tau agrégées et parfois PHF-positives

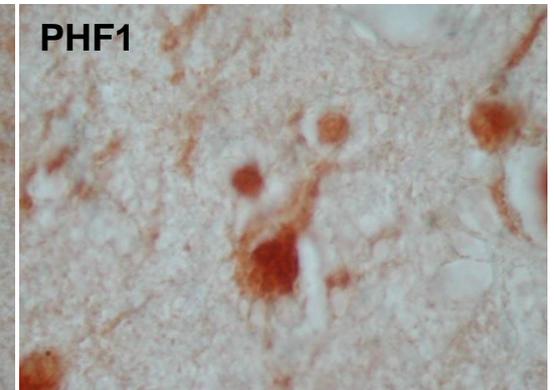
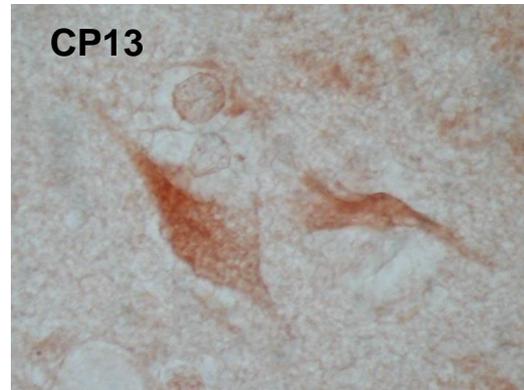
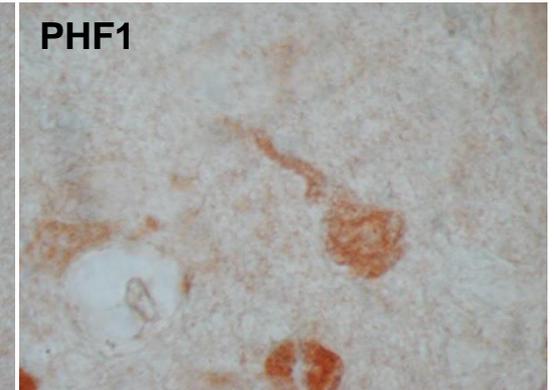
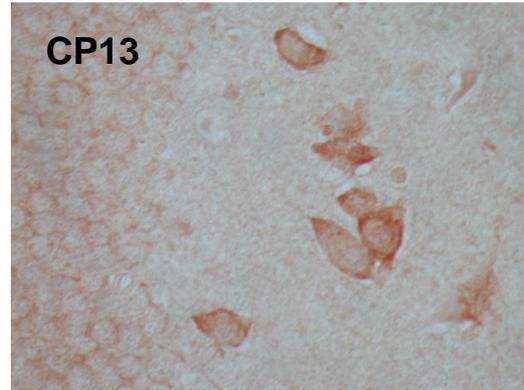
# Neuropathologie: Protéine Tau

## Dégénérescence neurofibrillaire



Pré-DNF

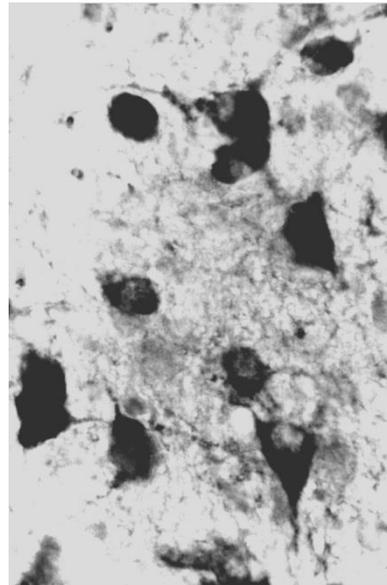
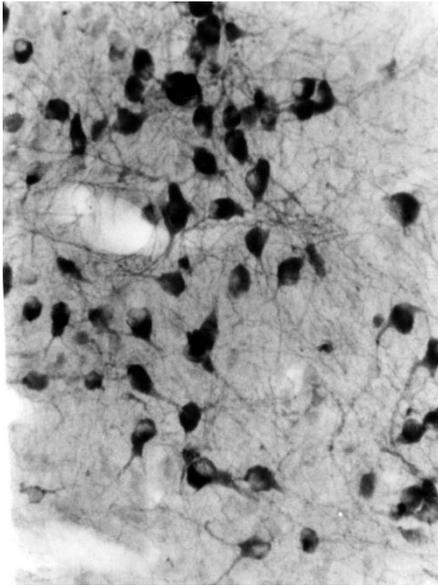
DNF



# Modifications cérébrales liées à l'âge chez le microcèbe

- Atrophie cérébrale en particulier du cortex, des noyaux de la base, du tronc cérébral et du cervelet, accompagnée d'une dilatation ventriculaire
- Présence de dépôts amyloïdes:
  - dans la paroi des vaisseaux cérébraux
  - dans le parenchyme cortical sous forme de plaques diffuses et compactes accompagnées d'une gliose réactive
- Présence de protéines Tau agrégées et parfois PHF-positives
  
- Perte neuronale

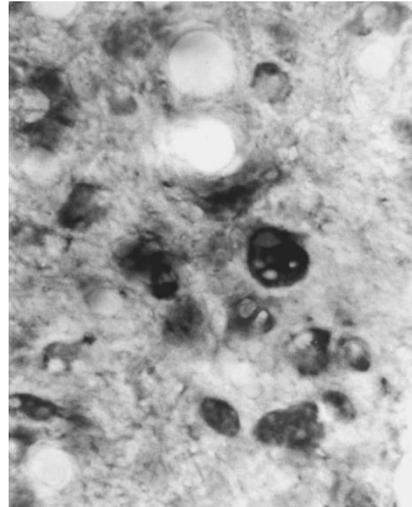
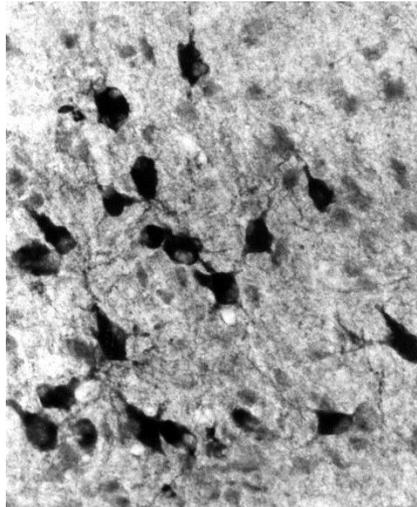
# Perte neuronale



Neurones  
cholinergiques

Microcèbes jeunes

Neurones sains avec de  
nombreux prolongements

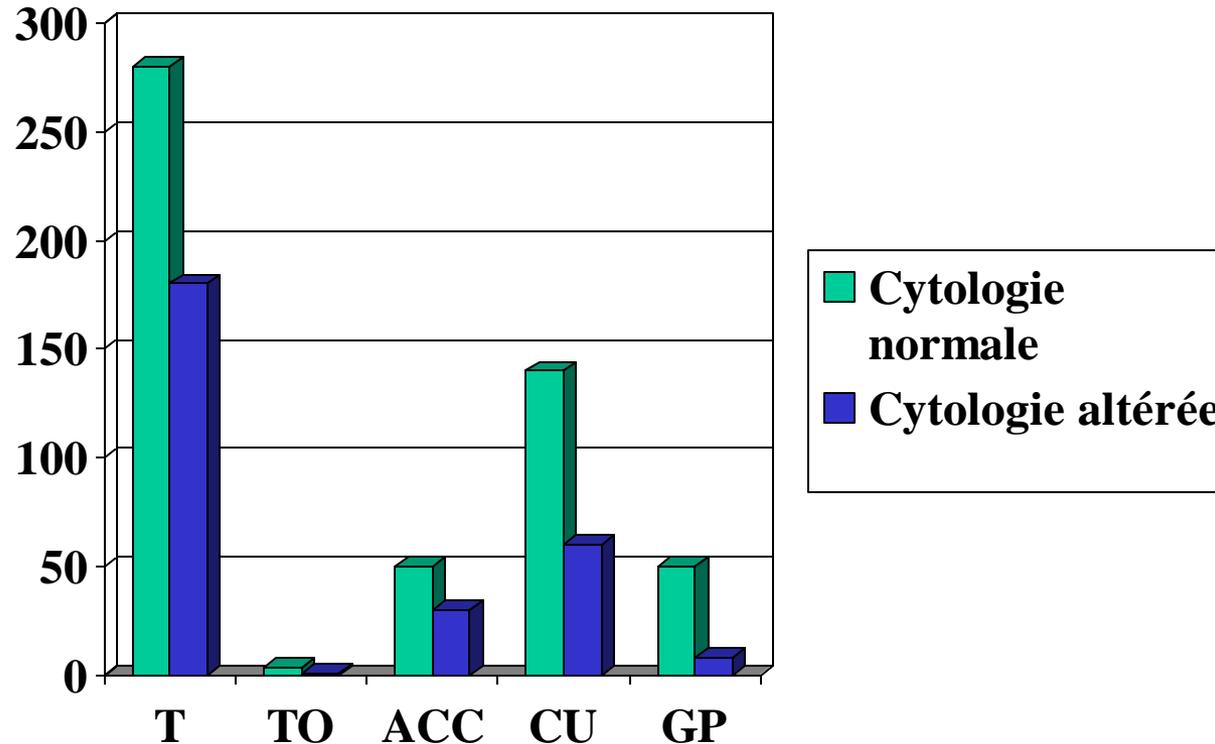


Microcèbes âgés

Perte de prolongements  
neuronaux

Présence de vacuoles

# Perte neuronale cholinergique

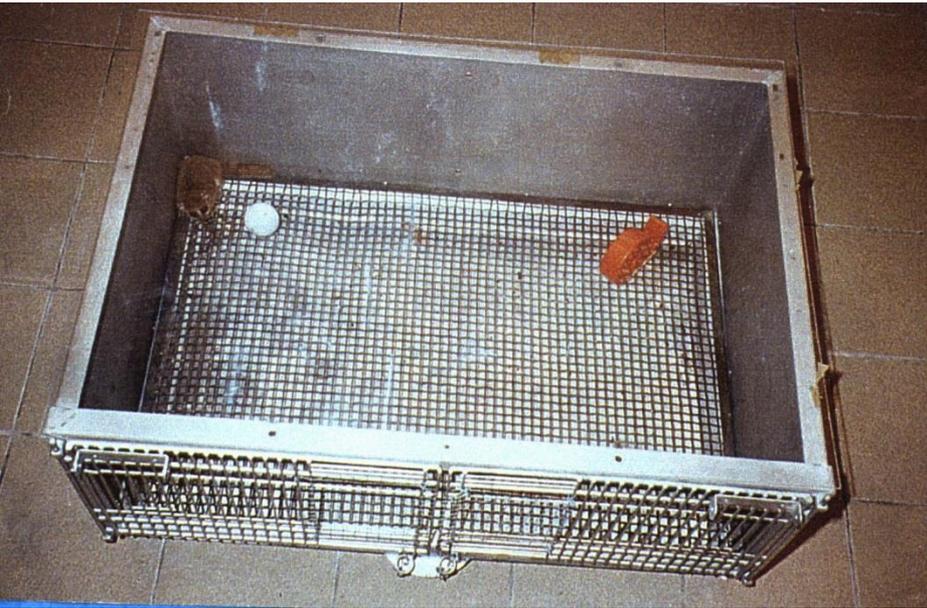


Perte de neurones cholinergiques importantes chez les microcèbes présentant des neurones cholinergiques avec cytologie altérée

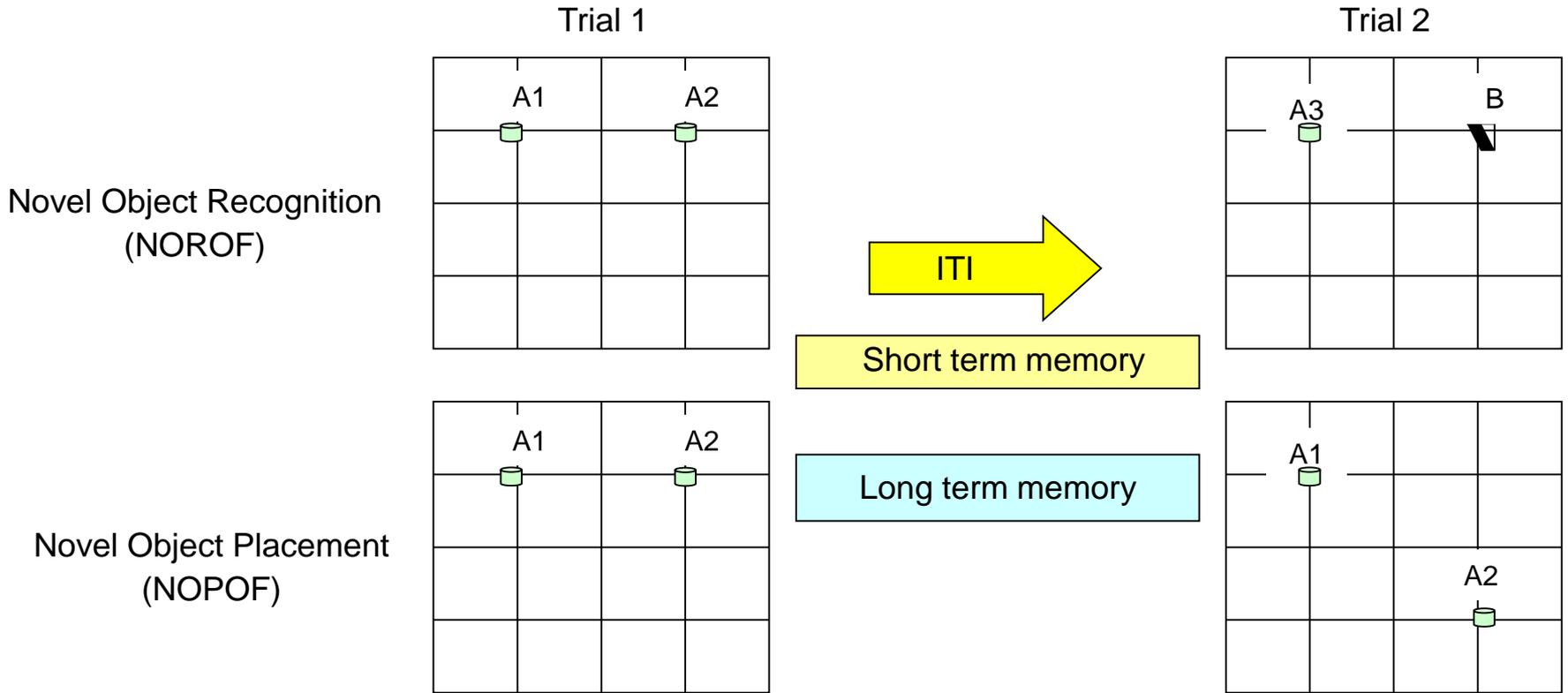
# Etudes comportementales

- Test de réaction à la nouveauté
- Test cognitif: discrimination simple et réponse après délai
- Stimulus visuel
- Stimulus olfactif

# Réaction à la nouveauté

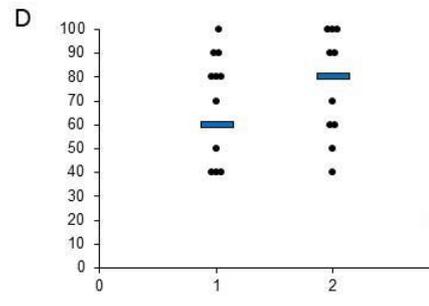
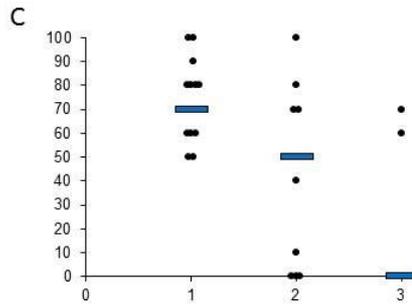
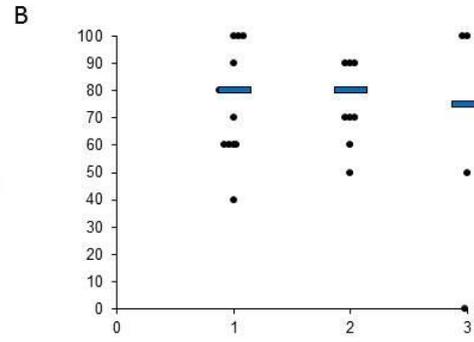
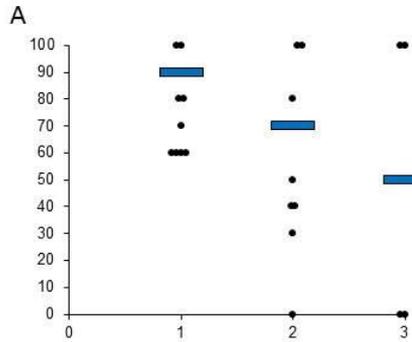


- Exploration différentielle spontanée d'objets familiers et nouveaux
- Comportement normal: l'animal s'intéresse d'avantage à l'objet nouveau



Parameter :

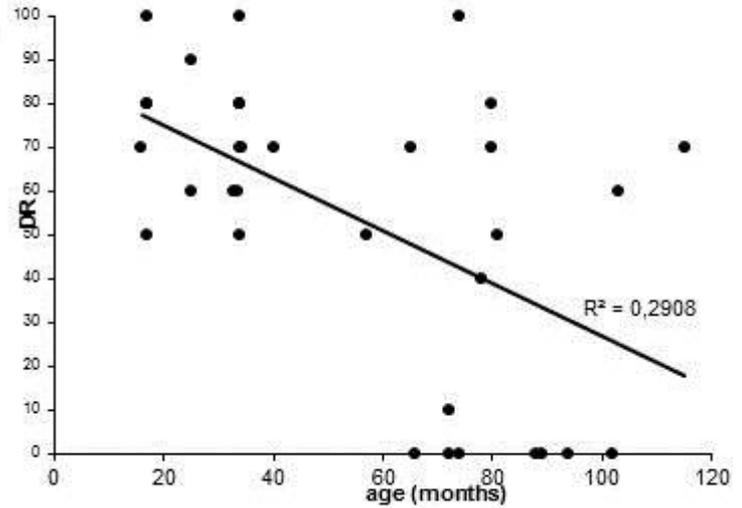
$$\text{Discrimination ratio (DR)} = \frac{\text{Novel object interaction (or Object moved)}}{\text{Interaction with both objects}}$$



norof

nopof

Nopof 5mn



# Spatial memory, working memory

Use in rodents and adapt to mouse lemur



*Three panel runway task*  
(working memory)

Criterion: error number (= closed door pushed in)

Analyse: Evolution of the number of errors during the successive trials



*Spontaneous alternance*  
(spatial memory)

Criterion : sequence of corridors visited

Analyse : *pourcentage total alternance (ex. ABCD)*

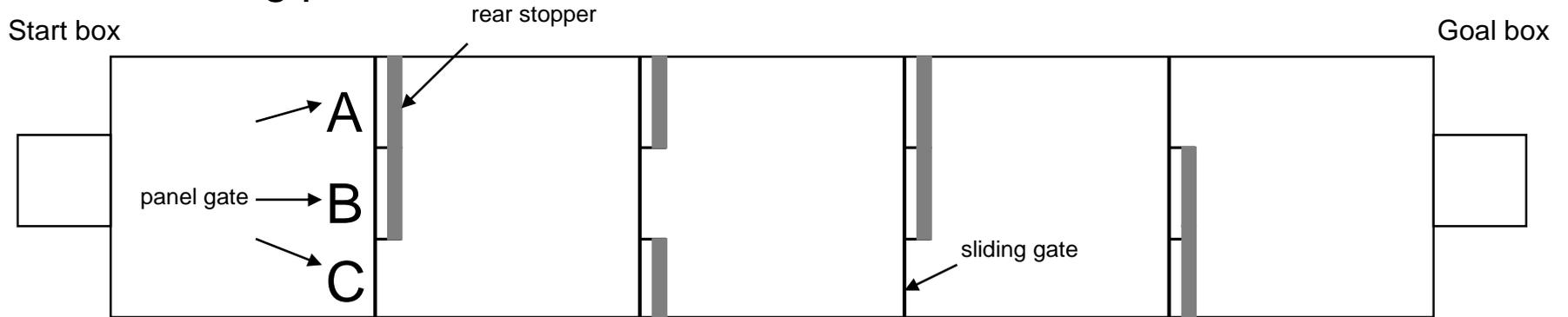


*Barnes maze*  
(working memory)

Criterion: number of errors (= attempt to enter a closed hole)

Analyse : Evolution of the number of errors during the successive trials

## A : Testing phase



## B : Procedure

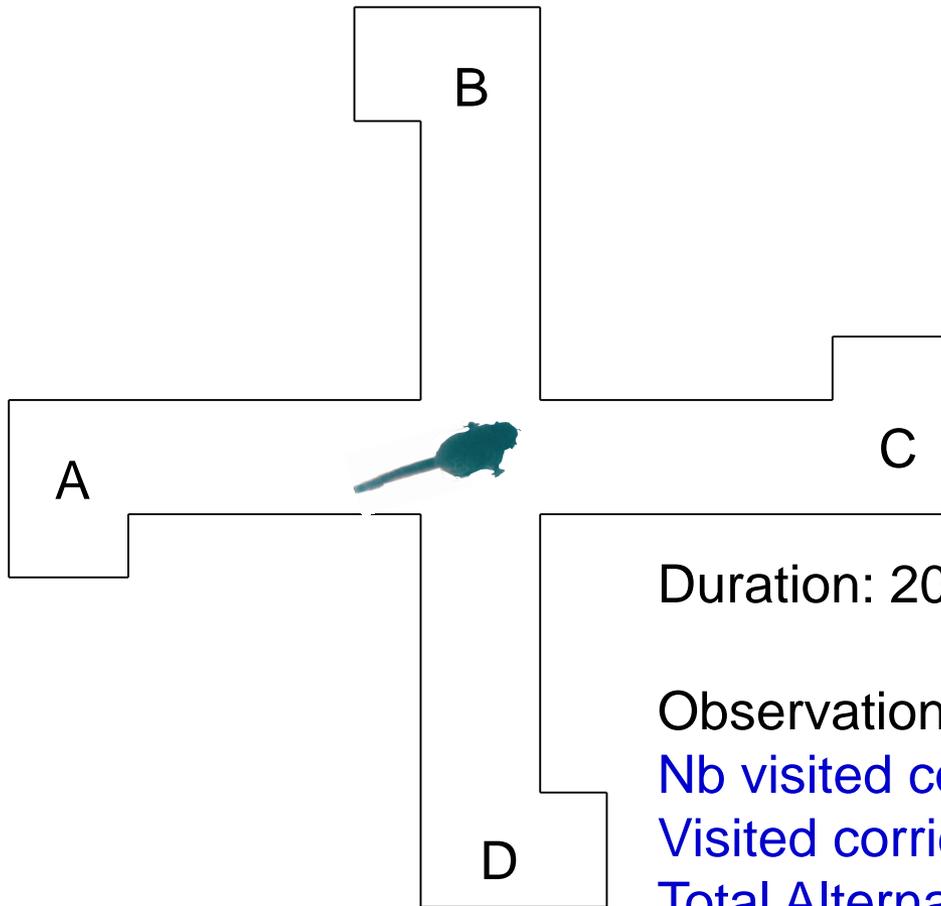
Session (6 trials/day)

	Session (6 trials/day)					
	sample	Test trial				
session	1	2	3	4	5	6
1	CBCA	CBCA	CBCA	CBCA	CBCA	CBCA
2	BABC	BABC	BABC	BABC	BABC	BABC
...						
N	ACBA	ACBA	ACBA	ACBA	ACBA	ACBA

Durée: 10 min by trial

Closed door pushed =  
reference error





A = polystyrene

B = Bamboos

C = Plastic corks

D = black scotch on the wall

Duration: 20 minutes

Observation:

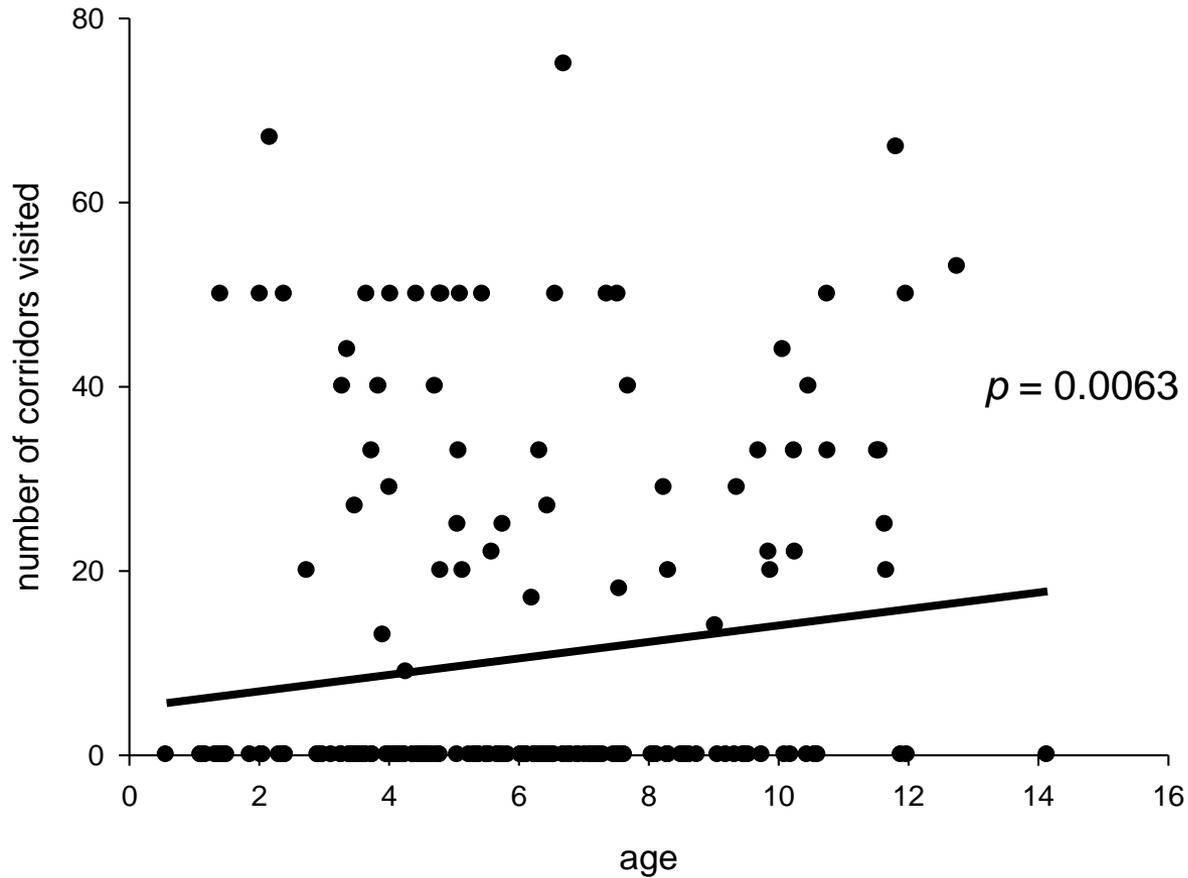
Nb visited corridors

Visited corridor sequence

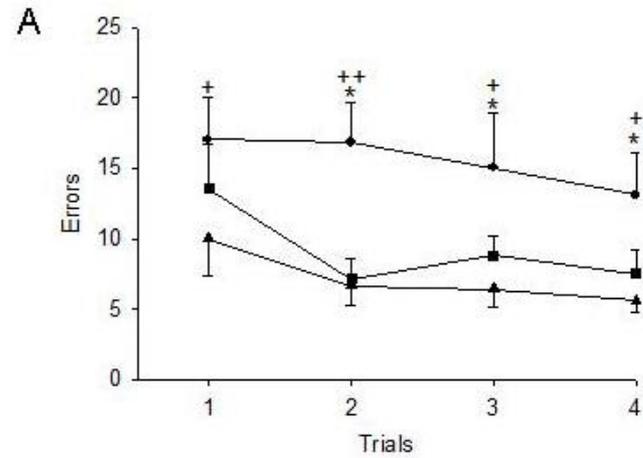
Total Alternance (e.g., ABCD)

Inclusion criterion : at least 8 corridors visited

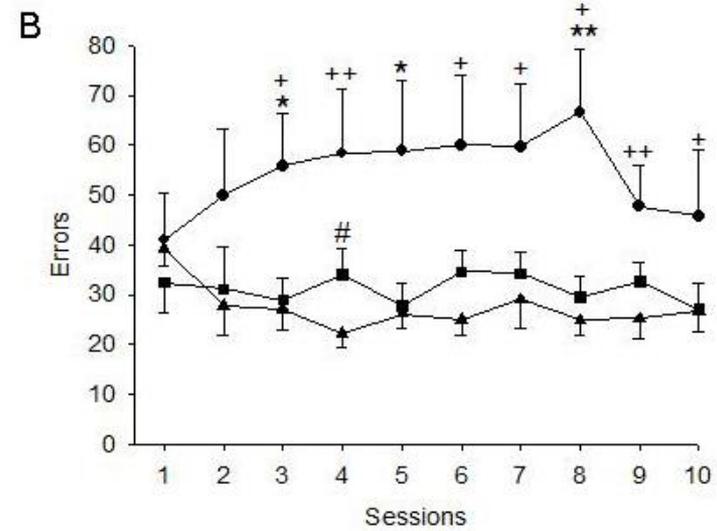
194 anx



Increase in the number of corridors visited during aging

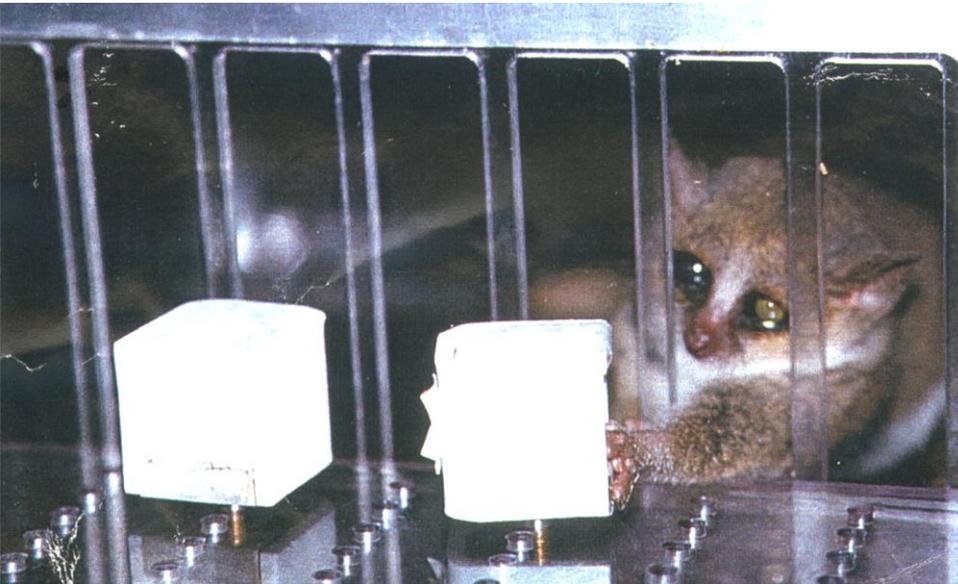


■ young adult  
 ▲ middle-aged  
 ● aged



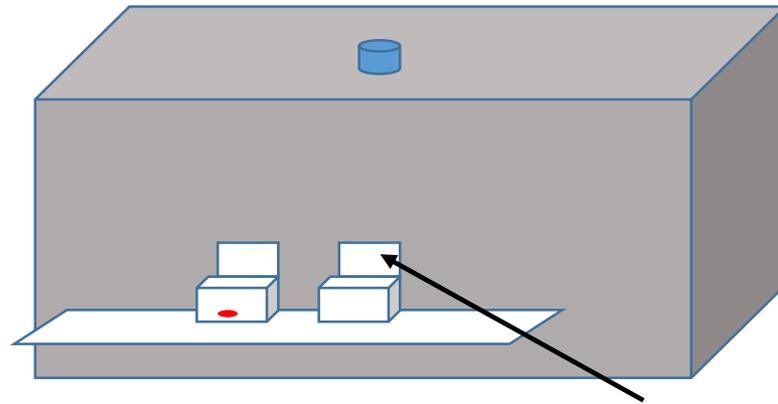
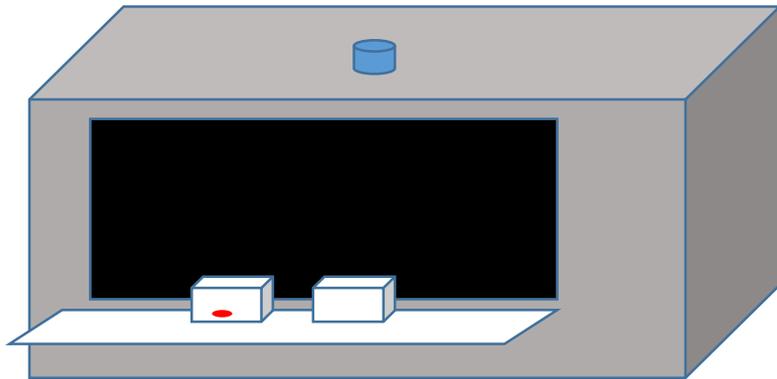


# Test cognitif



- Discrimination visuelle
- Phase d'entraînement
- Discrimination simple, motif différents
- Réponse après délais de 3, 6, 12, 20 secondes

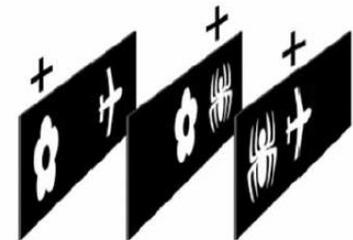
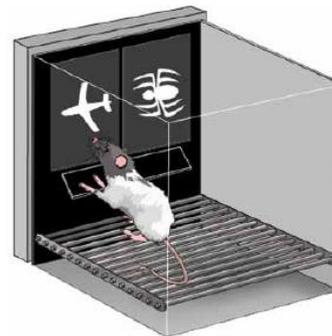
Certains microcèbes âgés n'arrivent plus à réaliser les tests lorsque la difficulté augmente



Animal access



## Automatisation with touchscreen display



2 access  
touchscreen

11-06-2013 Mer 15:26:10

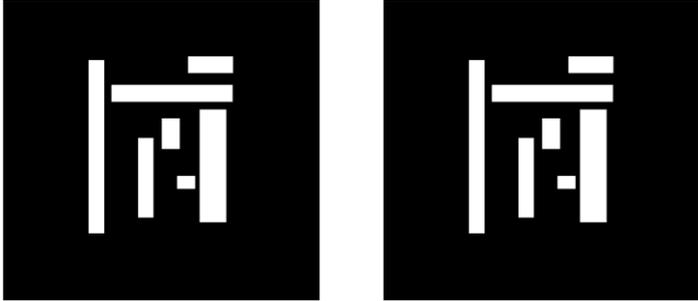
Introduction  
de l'animal



Reward distribution tray  
(apple juice)

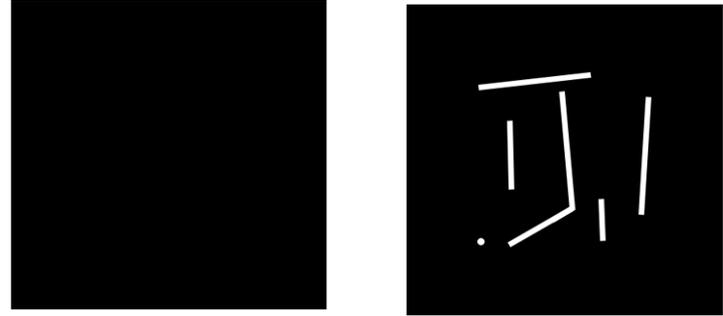
ITT : Presentation of 2 identical images

The animal must touch one of the 2 images to receive its reward



MTT : Presentation of a single image

The following test is started as soon as the animal touches the screen presenting the image



MIT : Presentation of a single image

The following test is started as soon as the animal touches the screen presenting the image and collects its reward from the distribution tray



PIT : Presentation of a single image

When the animal touches the screen presenting the image, the reward is distributed

If it touches the black screen, a beep sounds to indicate the error. No reward is given



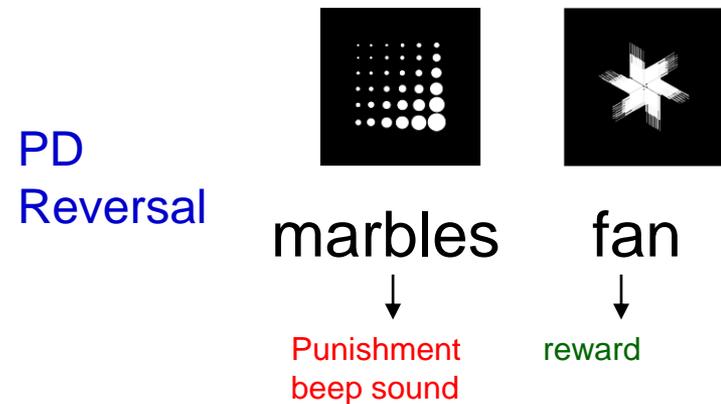
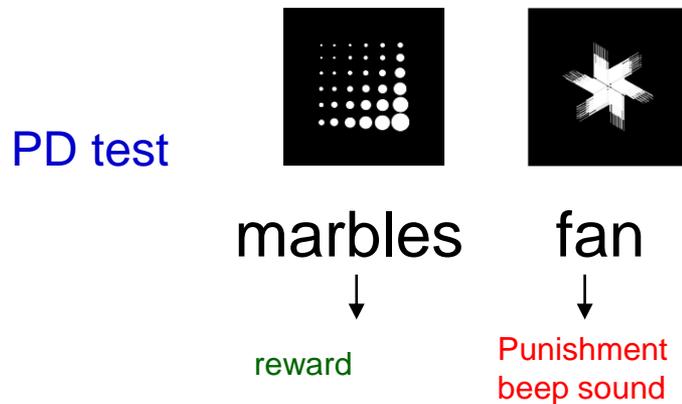
reward



Punishment beep sound

Test phase	Conditions	Maximal duration	Objectif
PD test	No fruit juice on the touch screen	60 minutes	30 trials in 30 minutes ≥ 80% correct responses on 2 consecutive sessions
PD Reversal test	No fruit juice on the touch screen	60 minutes	30 trials in 30 minutes ≥ 80% correct responses on 2 consecutive sessions

## Choice of the award-winning image for PD test

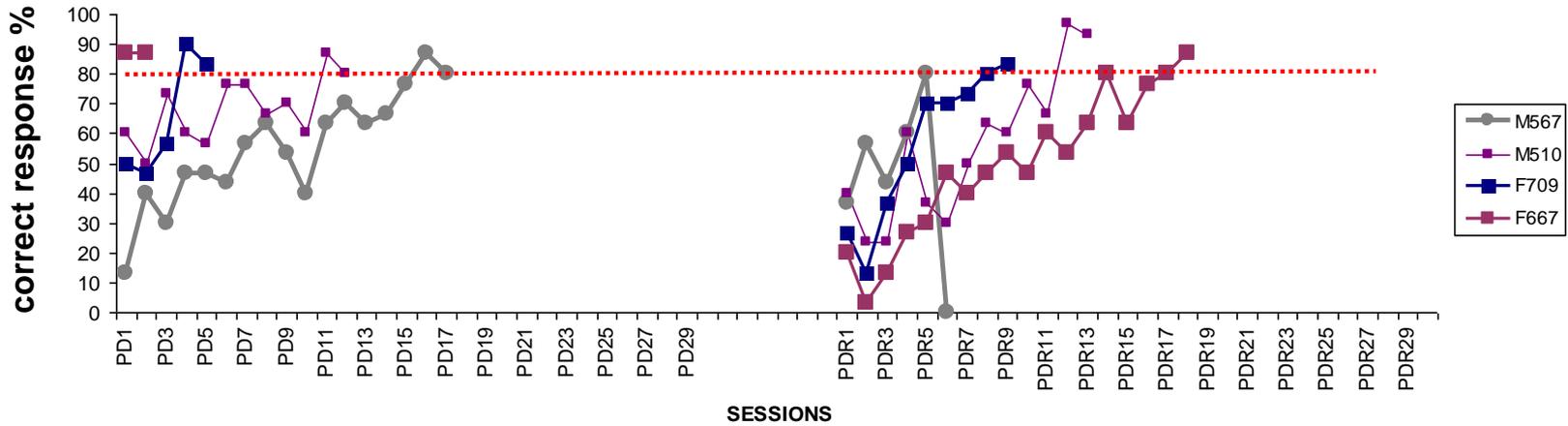


12-10-2013 Mar 14:21:24

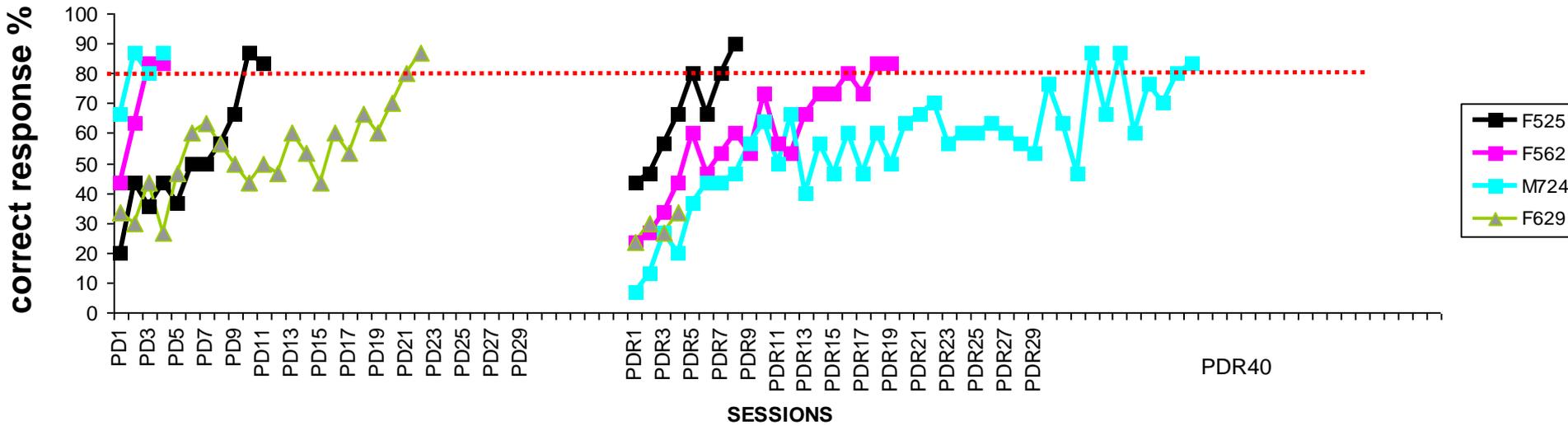
Camera 01



### pairwise discrimination and reversal in old mouse lemurs



### Pairwise discrimination and reversal



# Modèle microcèbe

Le microcèbe est un modèle naturel intéressant mais limité

- *Avantages:*

- Primate
- Modèle naturel
- Petite taille
- Longévité relativement courte pour un primate
- Possibilité d'accélérer le vieillissement

- *Inconvénients:*

- Faible reproduction
- Faible pourcentage d'animaux touchés (environ 5% des animaux âgés)

# Maladie à Prions chez les mammifères

# Maladies Animales



Hôte	Maladie	
<b>Animaux d'élevage</b>		
Ovins, caprins	tremblante naturelle	1730
Bovins	ESB	1985
<b>Carnivores</b>		
Vison	Encéphalopathie spongiforme du vison	1947
Chat	Encéphalopathie spongiforme féline	1990
<b>Animaux sauvages</b>		
Wapiti, Cerf	Maladie du dépérissement chronique	1967
Mulet		
<b>Animaux de captivité</b>		
Guépard, Puma	Encéphalopathie spongiforme	1992
Singes	Encéphalopathie spongiforme	1996

# Tremblante naturelle du mouton

Décrite en France depuis 1732

Maladie endémique

Cas de tremblante partout

excepté;: Nouvelle Zélande, Australie



Clinique:

Ataxie progressive: troubles coordination des mouvements

Tremblements

Prurit sévère

Dépérissement et mort

Phase clinique 2 à 6 mois

Origine: ? Possibilité de transmission verticale (infectiosité du placenta)

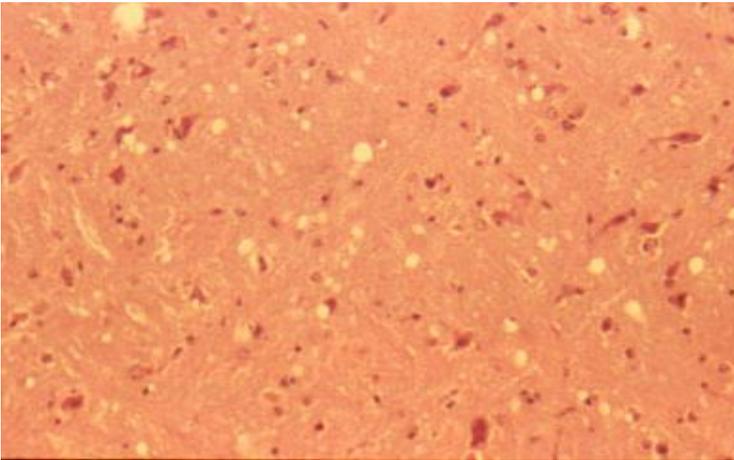
Polymorphisme du gène PrnP: ARR résistants, VRQ très sensibles

# NEUROPATHOLOGIE DE LA SCRAPIE

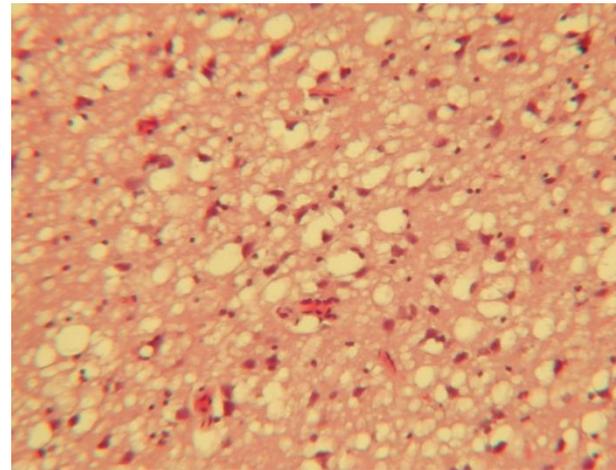
- ❖ Lésions confinées au système nerveux central, bien que du matériel infectieux soit également trouvé dans le système lympho-réticulaire
  
- ❖ Pas d'inflammation, pas de cellules infiltrées, pas d'évidence d'une réponse immune

# Lésions caractéristiques

## Formation de vacuoles dans le cerveau



**Spongiose diffuse**



**Spongiose très développée**

# L'ESB

Apparition en GB 1985

198 000 cas cumulés en GB

(majoritairement vaches laitières)



## Symptômes

Troubles locomoteurs (ataxie du train postérieur, chutes)

Troubles du comportement (nervosité , agressivité, isolement en paturage)

Amaigrissement puis cachexie

Incubation : 5 ans

Phase clinique : 6-8 semaines

# Chronic Wasting Disease

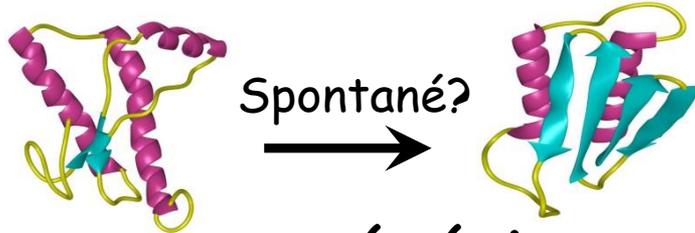


Dans le Colorado et le Wyoming, 4 à 6% des daims sont atteints de la Maladie du dépérissement chronique

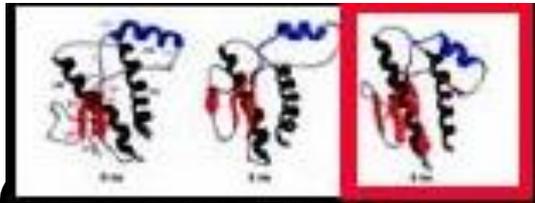
Existe-t-il une infection de type prions en Amérique du Nord?

# Maladies humaines

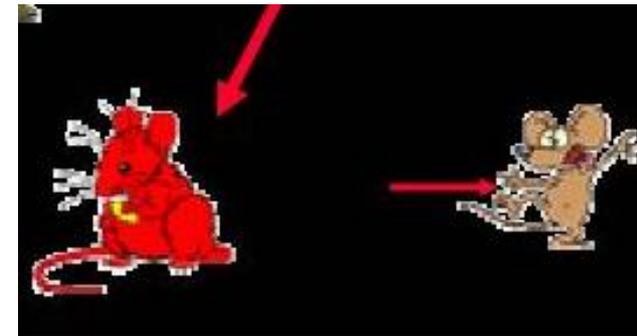
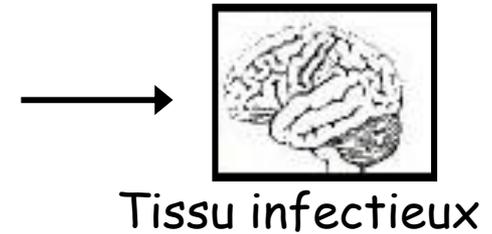
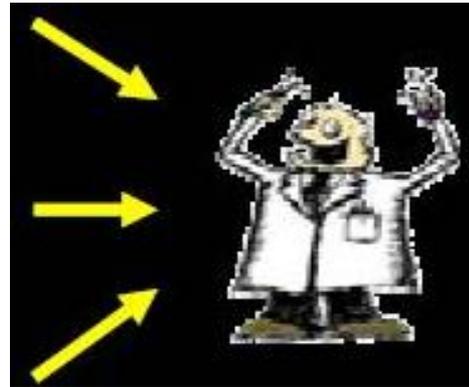
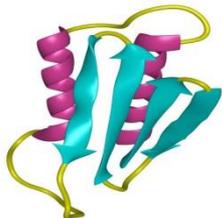
Origine sporadique



Origine génétique  
Mutation du gène PRNP



Origine infectieuse :  
Infection par matériel contaminé



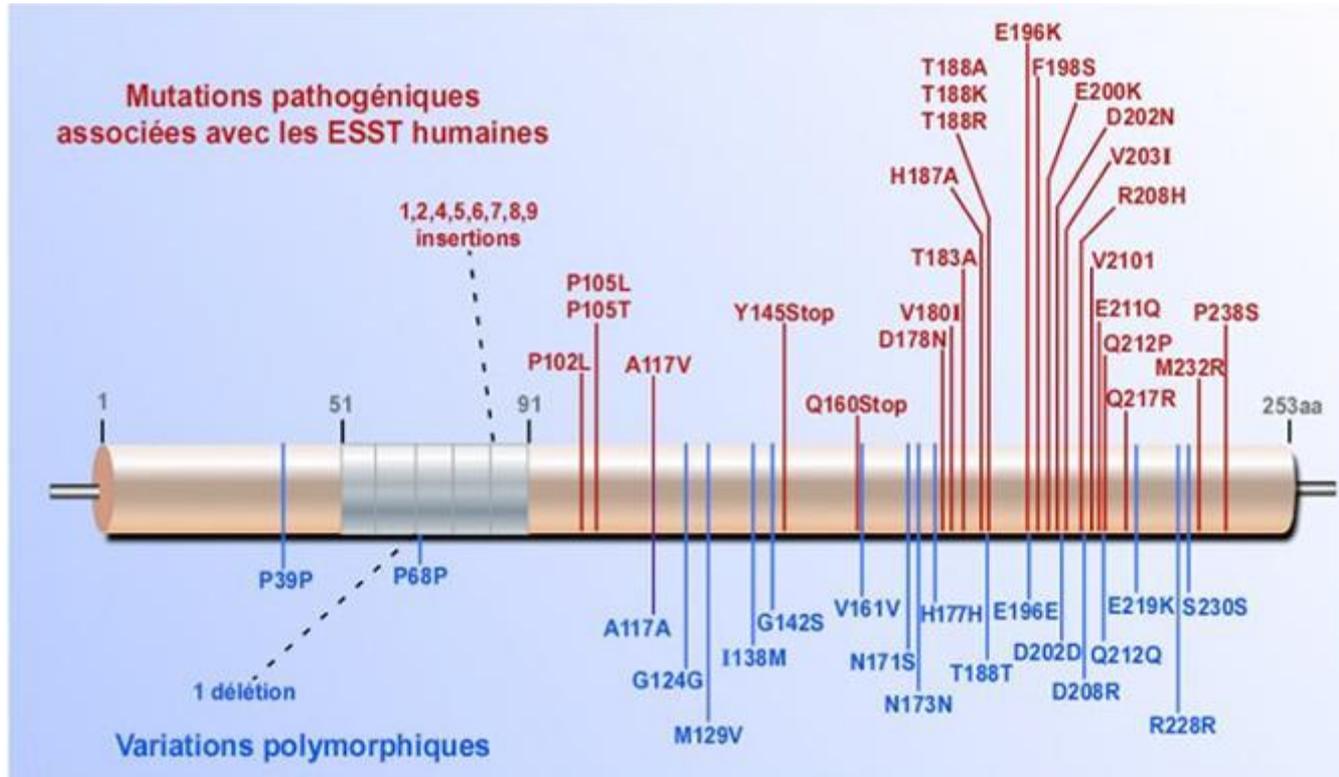
# Maladies humaines

---

Maladie	Origine
Maladie de Creutzfeldt Jakob sporadique	Conversion spontanée PrPc/Prpres? Mutation somatique Infectieuse
MCJ iatrogène	Infectieuse (administration de matériel contaminé)
MCJ nouveau variant	Infectieuse (agent de l'ESB)
MCJ familiale	Mutation du gène PRNP
GSS	Mutation du gène PRNP
IFF	Mutation du gène PRNP
Kuru	Infectieuse

---

# LES FORMES GÉNÉTIQUES



PrP: 254 aa codés par un gène unique

# Maladies humaines infectieuses

---

Nombre de cas	Origine
130	Hormones de croissance
5	gonadotrophine
3	Greffes de cornées
2	Electrodes dans le cerveau
5	Instruments de neurochirurgie
104	Greffes de dure-mère

---

# Maladies humaines infectieuses: le Kuru



Iles de papouasie Nouvelle Guinée

Ingestion de cerveaux humains  
lors de rites cannibales

Cannibalisme abandonné en 1950

- diminution de l'incidence
- 3000 cas

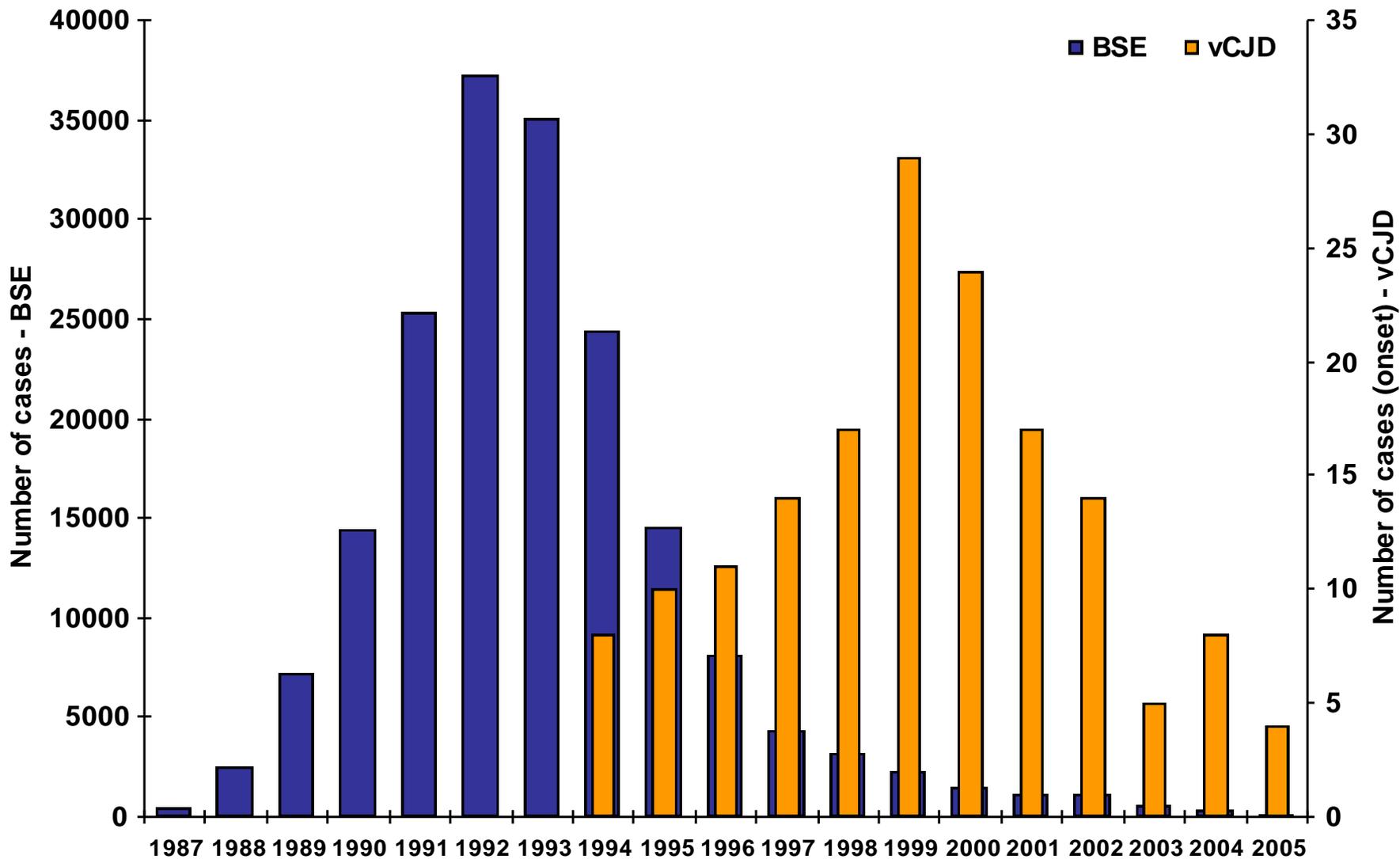


# MCJ : Prédiposition génétique

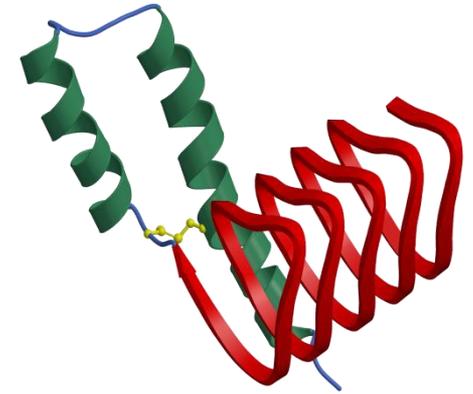
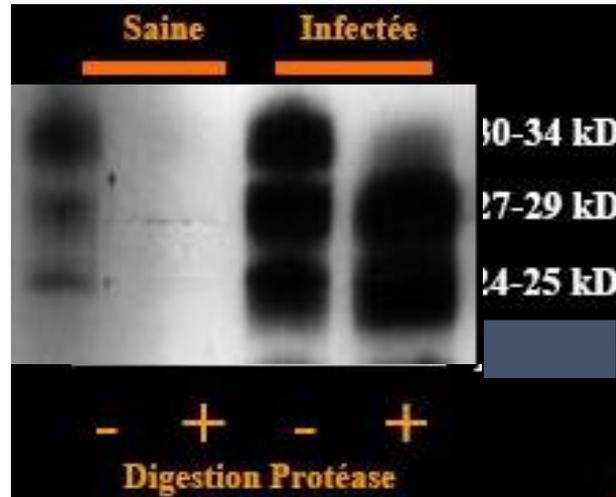
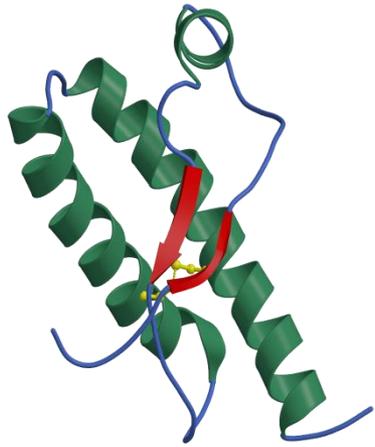
Polymorphisme au codon 129

<u>forme</u>	<u>normal</u>	<u>sCJD</u>	<u>iCJD</u>
M/V	45%	16%	7%
M/M	43%	70%	60%
V/V	12%	14%	33%

# ESB et vCJD au RU



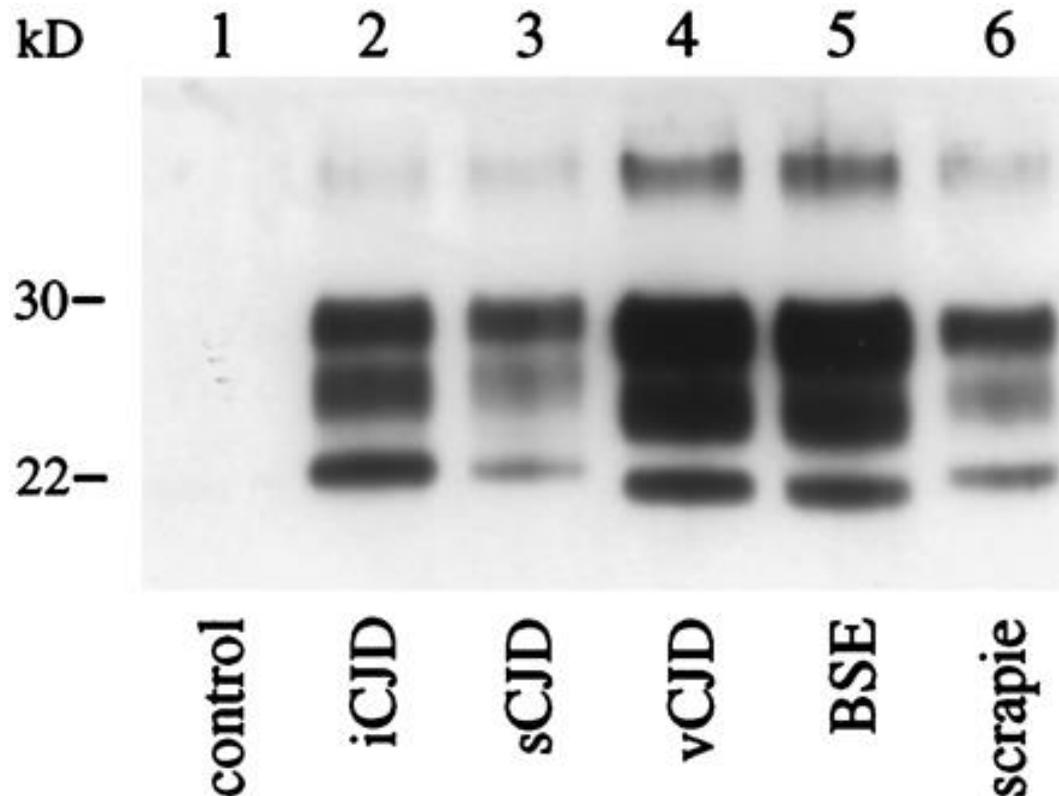
# La PrPres, marqueur spécifique des ESST



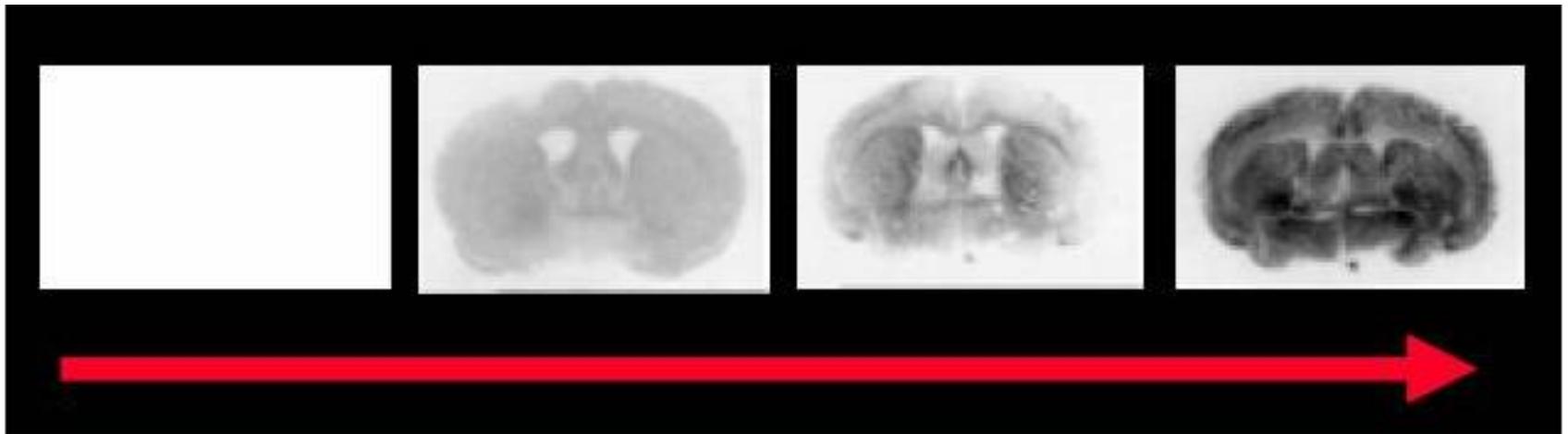
PrPres : forme anormale d'une protéine de l'hôte, la PrP

# COMPARAISON DES PROPRIÉTÉS DES ISOFORMES PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>sc</sup>

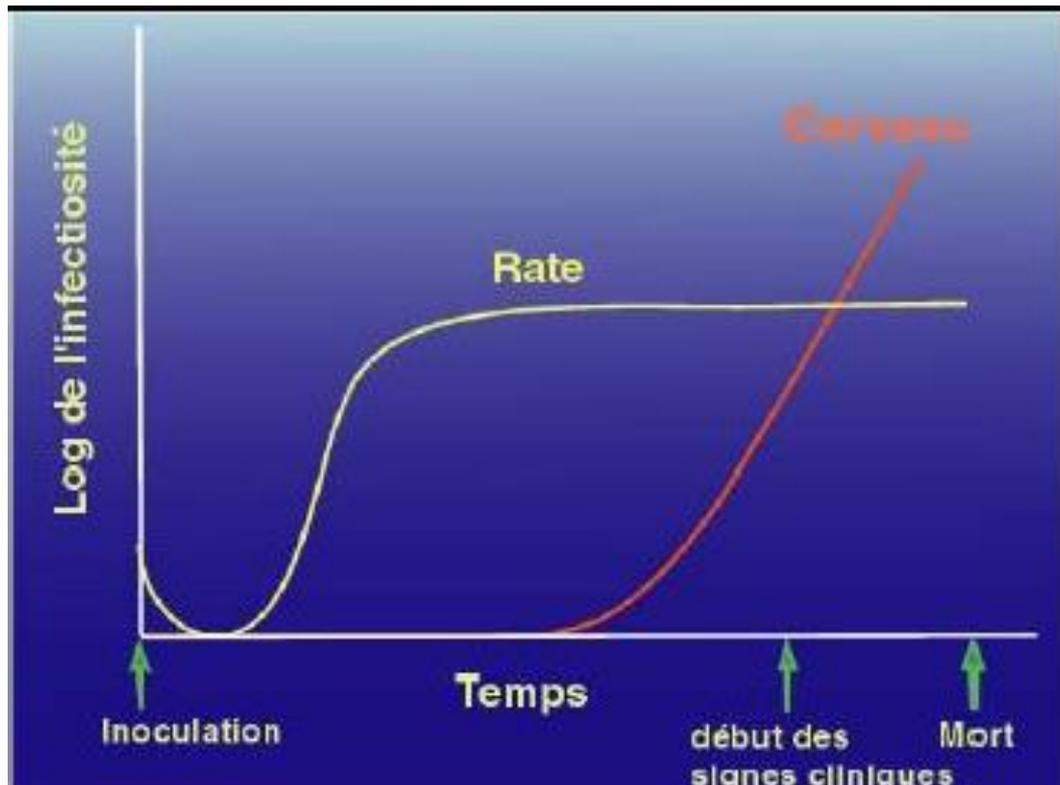
La PrP<sup>c</sup> est sensible à la digestion par la protéinase K  
tandis que la PrP<sup>sc</sup> est partiellement résistante



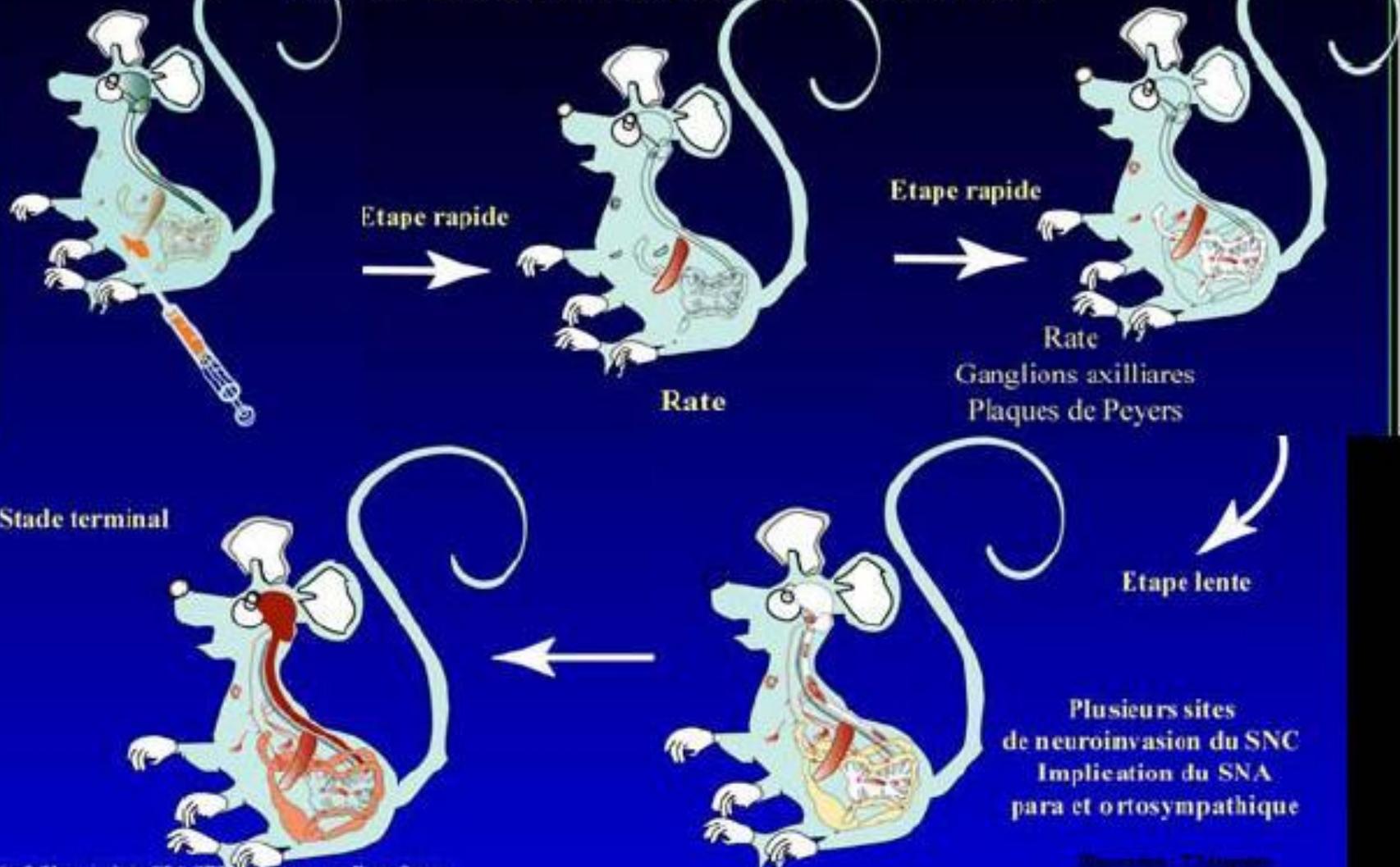
# Physiopathologie des maladies à prion



# Réplication des ATNC après contamination i.p.



# VOIE INTRA PERITONEALE

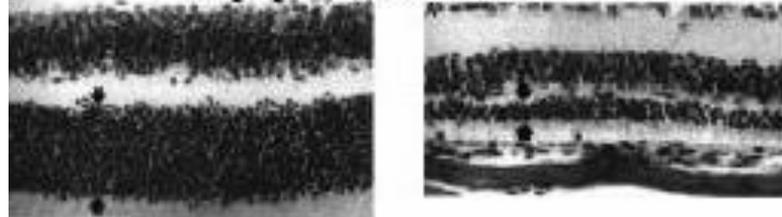


# Efficacité de la transmission

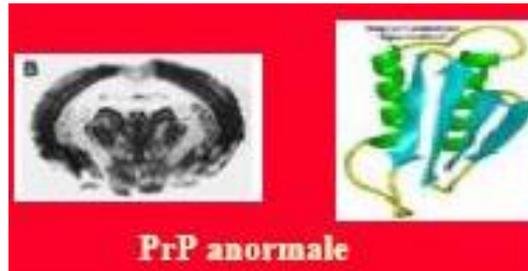
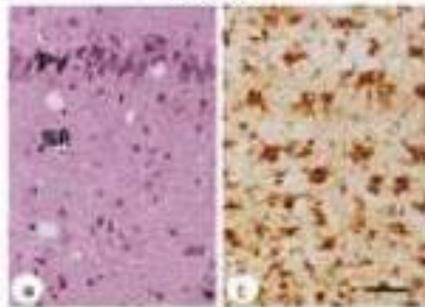
Voies de transmission	Nombre d'unités infectieuses suffisantes
Intracérébrale	1
Intraveineuse	10
Intra-péritonéale	50
Sous-cutanée	25 000
Orale	125 000

# Neuropathologie des maladies à prions : les maladies infectieuses

Apoptose Neuronale

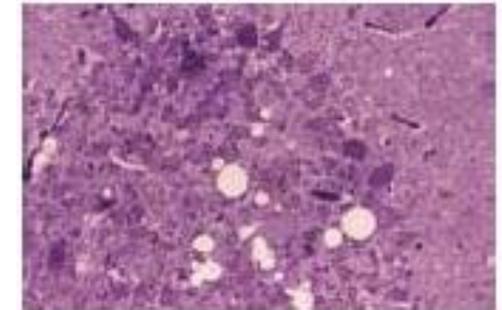


Gliose



PrP anormale

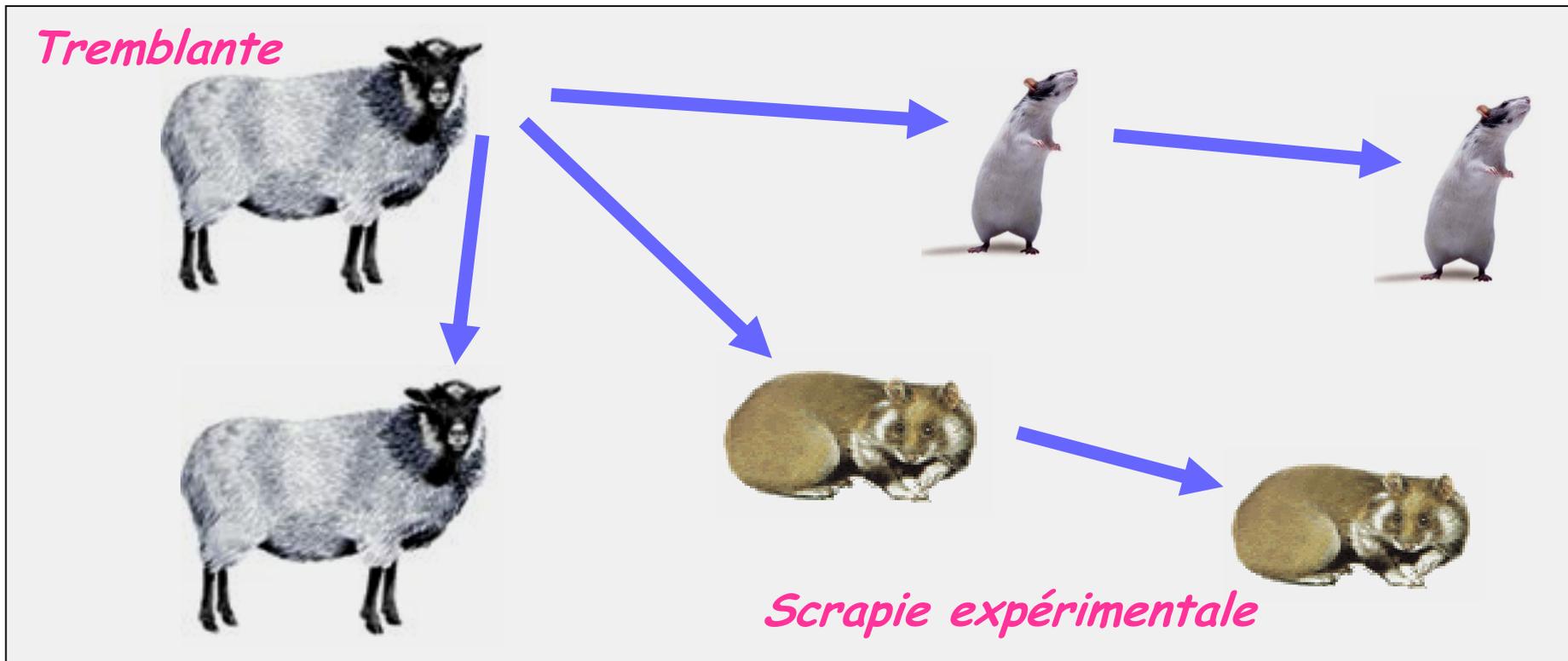
Spongiose



Plaque Amyloides



# Les maladies à prions animales sont transmissibles



# Modèles animaux conventionnels

Singes de laboratoire:

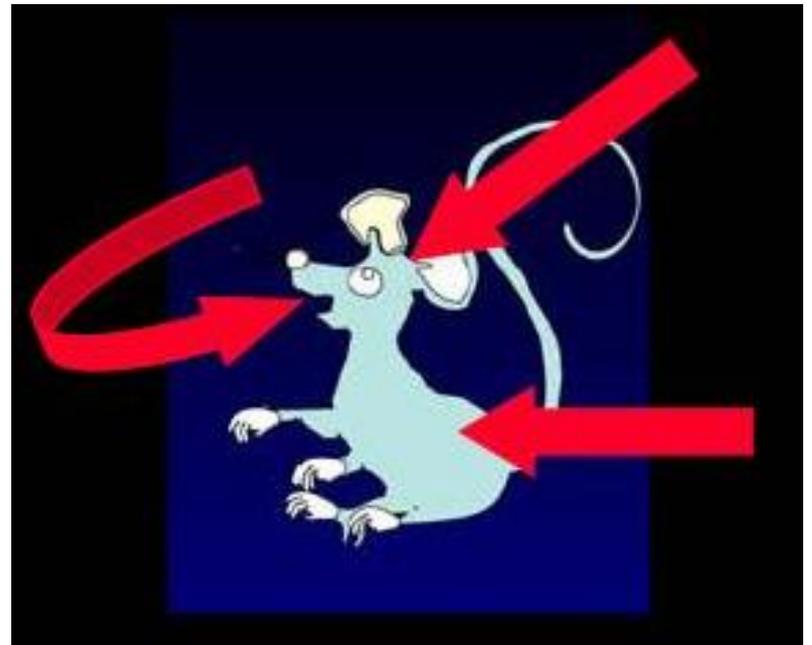
Modèle proche de l'homme mais  
période d'incubation 5 ans

Hamsters:

Maladie rapide # 60 jours

Souris

Maladie rapide, transgénèse



# Caractéristiques microbiologiques des ATNC

- Forte résistance aux procédés d'inactivation: spectre atypique
- Présence de souches biologiquement différentes chez l'hôte syngénique
- Barrière inter-espèce
- Adaptabilité de l'agent à l'hôte
- Pas de PrP cellulaire : pas de maladie
- Double déterminisme : génétique et infectieux

# Modèles animaux transgéniques

Possibilité d'utiliser des souris

Knock-out: n'exprimant pas de gènes d'intérêt

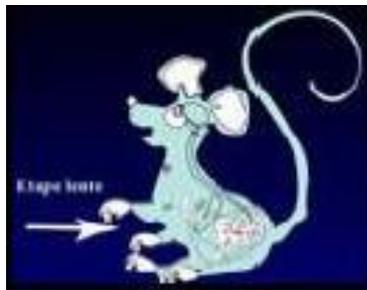
Transgéniques : surexprimant des gènes d'intérêt



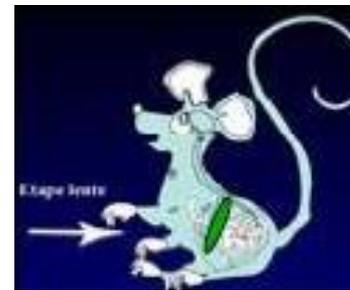
Souris normale



Souris ovinisée

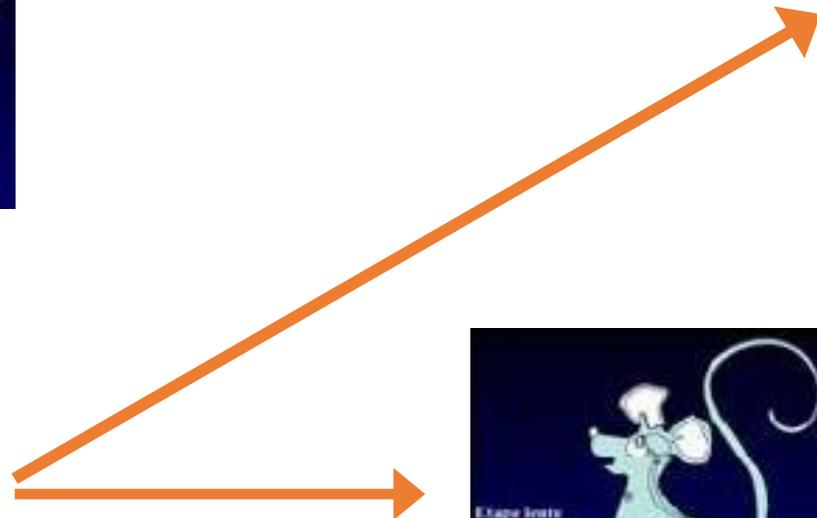
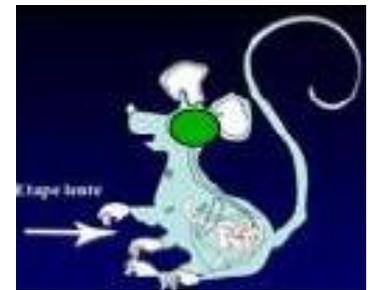


Souris knock-out PrP



Souris knock-out PrP

Réintroduction sélective



# Les souris $Prnp^{0/0}$ sont résistantes à la scrapie

Büeler et al., 1993 *Cell* ; Prusiner et al., 1993 *PNAS*

Prions



Souris  
normale

Les souris meurent  
en 5 mois

Prions



Souris  
Zrch  $Prnp^{0/0}$

Au bout de deux ans,  
les souris sont toujours  
vivantes

**Les souris  $Prnp^{0/0}$  ne sont pas infectables**

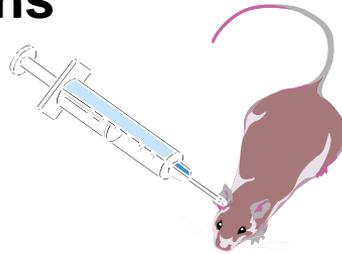


**Souris  
normale**



**Souris KO**

**Prions**



**Les souris Prnp+/0 redeviennent  
sensibles aux Prions  
426 ± 18 j**

**La PrP<sup>c</sup> est nécessaire au développement de la  
maladie**

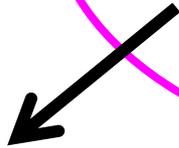
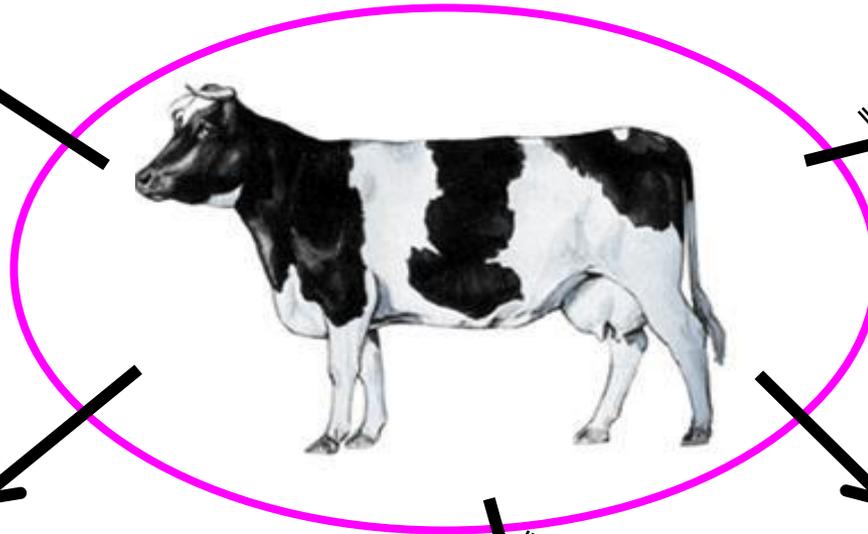
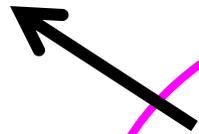
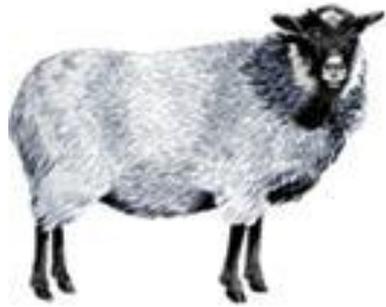
# La barrière d'espèce

- 1) Les agents ESST sont facilement transmissibles au sein de la même espèce
- 2) La transmissibilité interspécifique n'est pas aussi efficace
- 3) L'efficacité de franchissement est liée au gène de la PrP :
  - Pas de PrPc : pas de maladie
  - Plus les gènes PRNP du receveur et du donneur sont proches, meilleur est le franchissement

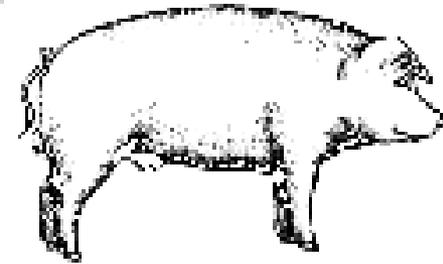
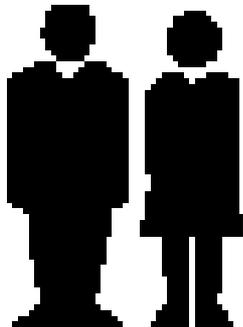
Ex: une souris Tg humaine devient susceptible à l'agent MCJ.

# L'agent de l'ESB est transmissible

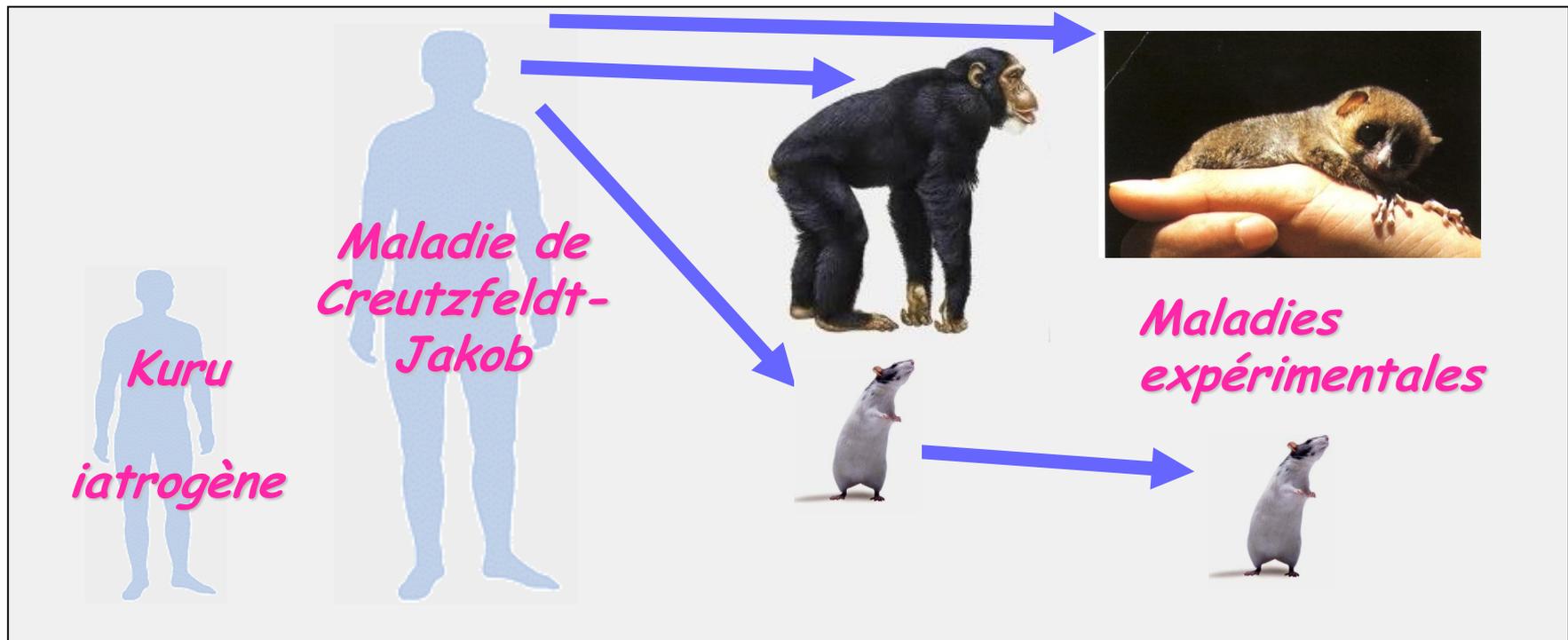
Encéphalopathie Spongiforme Bovine



vCJD



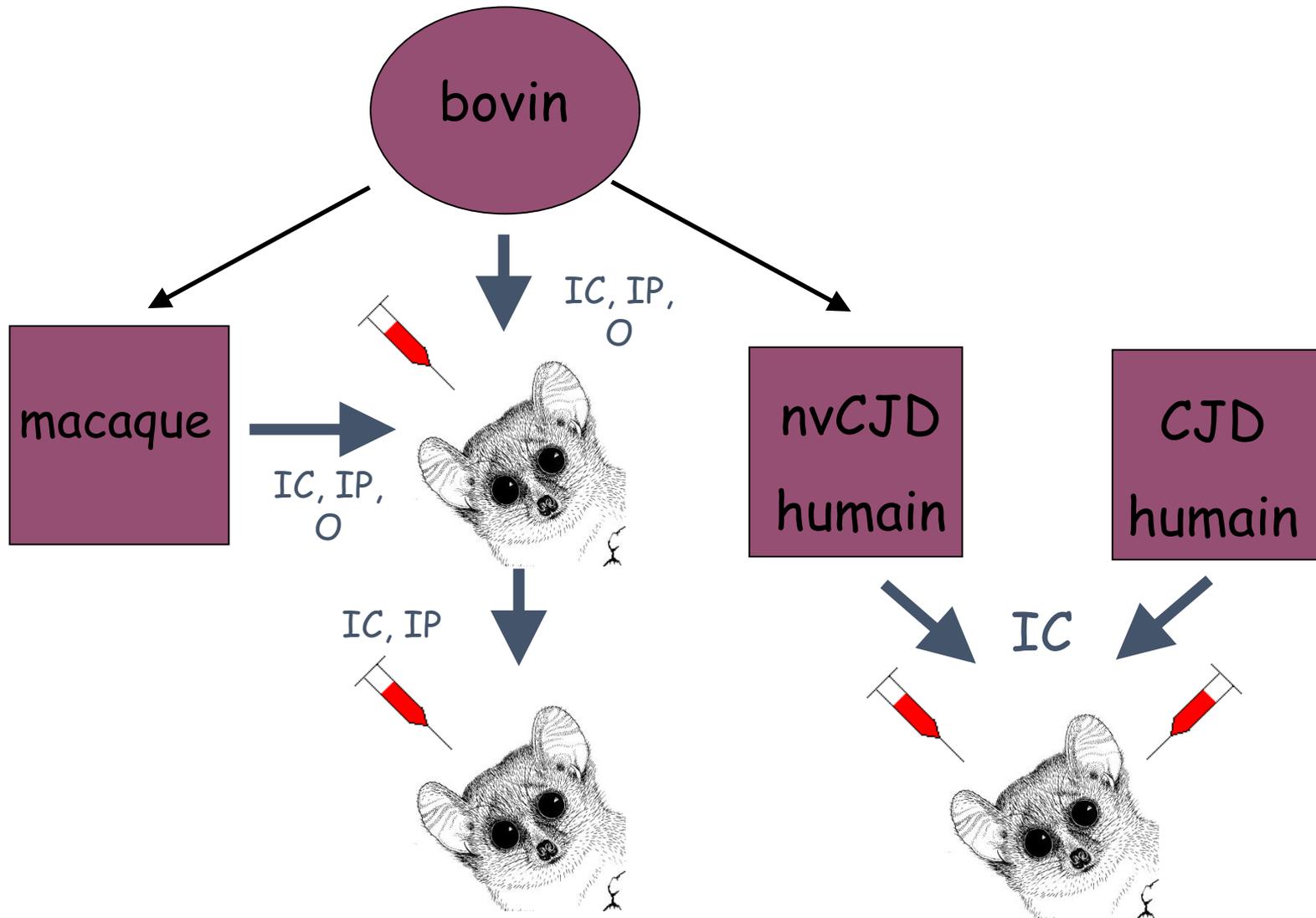
# Les maladies à prions humaines sont également transmissibles



# Aspects de la transmissibilité de l'agent prion



# Contaminations

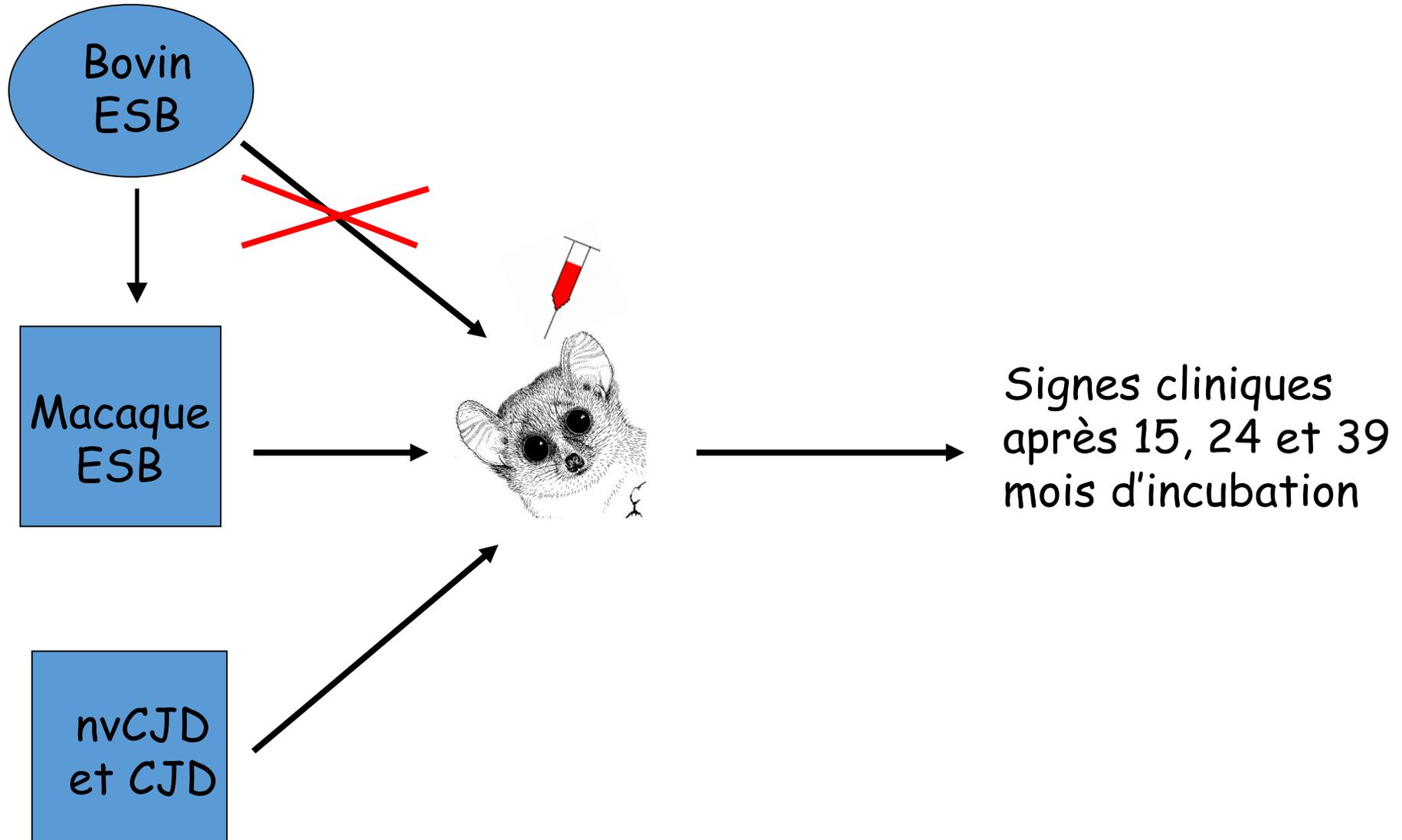


## Comparaison des temps d'incubation chez diverses espèces

	scrapie	ESB	CJD	nvCJD
Souris C57BL et RIII	15-22 mois	11-15 mois	23 mois	11 mois ou espérance de vie insuffisante
Souris Tg(HuPrP)		20 mois 35% de réussite	20-26 mois 10% de réussite	8 mois 50% de réussite
Souris Tg(ovPrP)	4-15 mois	10 mois (2nd)		
Souris Tg(boPrP)	8 mois 85% de réussite	8,5 mois 100% de réussite		9 mois 95% de réussite
<b>Macaque</b>		<b>36 à 40 mois (1er)</b> <b>18 à 25 mois (2nd)</b>		<b>25 et 30 mois</b>
<b>Ouistiti</b>	<b>41 mois</b>	<b>49 mois</b>	<b>21 mois</b> <b>17 mois (2nd)</b>	
<b>Microcèbe</b>		<b>13 à 18 mois (2nd)</b>	<b>37 mois</b>	<b>21 mois</b>



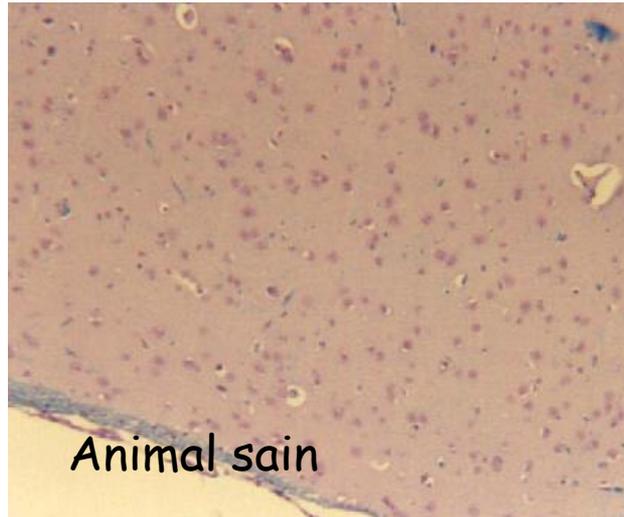
# Maladie à Prions





# Prion : lésions caractéristiques

spongiose



Animal sain



Animal contaminé

PrP res

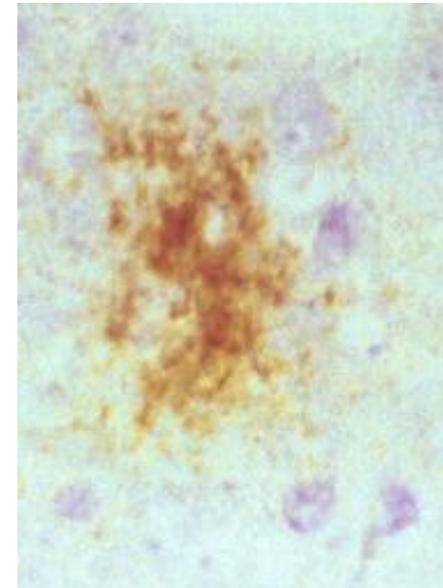
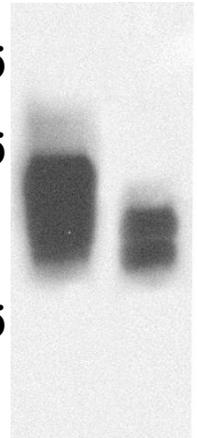
PK - +

47,5

32,5

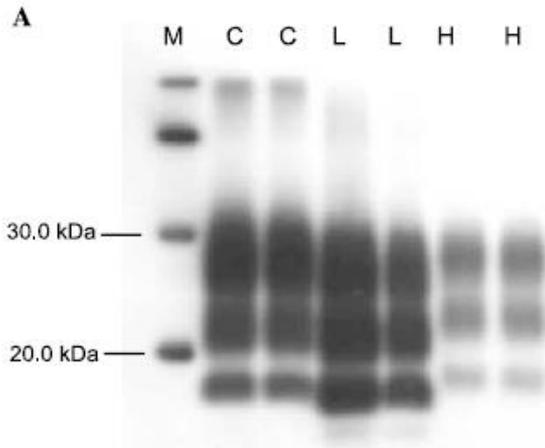
25

16,5

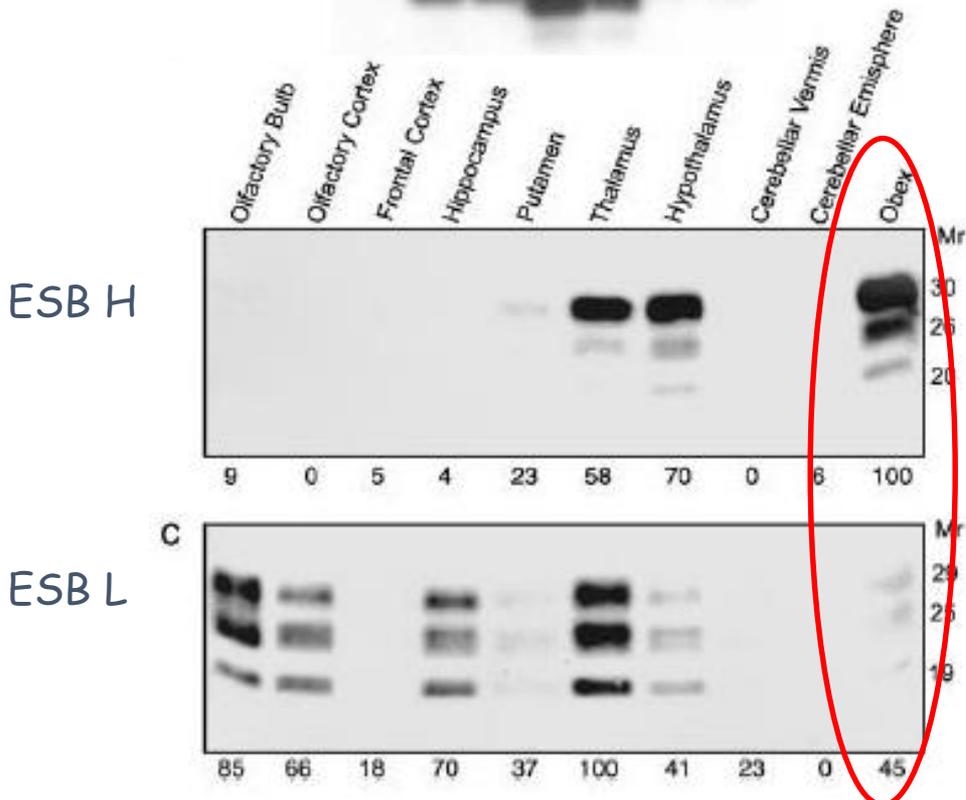




# ESB atypique



Poids moléculaire de la forme non glycosylée de la PrPres est plus élevé (H) ou moins élevé (L) que forme classique (C)



Distribution régionale de PrPres différente



# Transmission intracérébrale ESB atypique

animal	Age inoculation	Agent (50µl)	incubation	WB	spongiose	petblot	immuno
M487	1 an	ESB H	28 mois	-	+++	-	-
M481	1 an	ESB H	19 mois	-	++	-	-
F490	1 an	ESB H	27 mois	-	+	-	-
F492	1 an	ESB H	31 mois	-	+++	-	-
F495	1 an	ESB L	22 mois	++	++	++	++
F498	1 an	ESB L	22 mois	++	+++	++	++
M485	1 an	ESB L	19.5 mois	++	+++	++	++
M500	1 an	ESB L	19 mois	++	++++	++	++

Signes cliniques : amaigrissement (ESB L et ESBH), perte d'équilibre (ESBL)



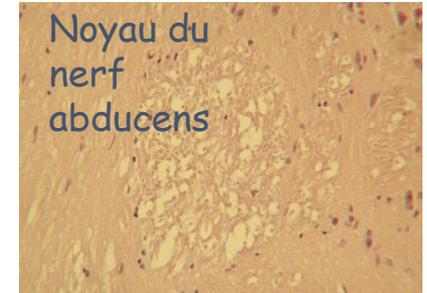
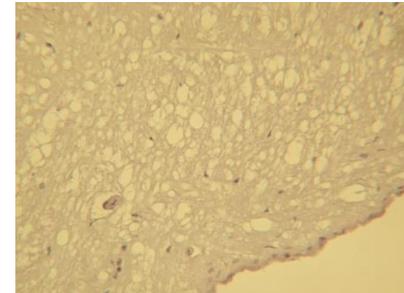
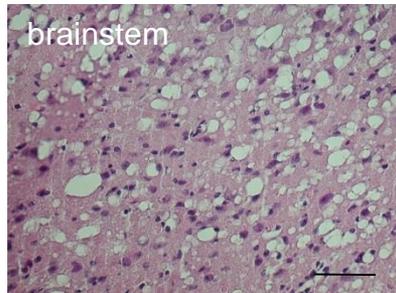
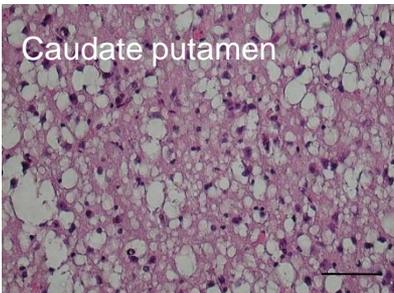
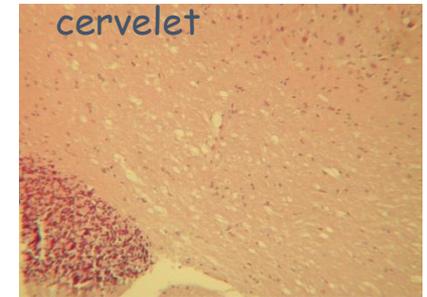
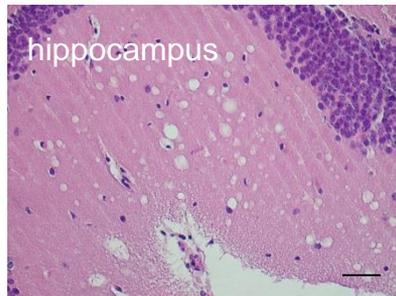
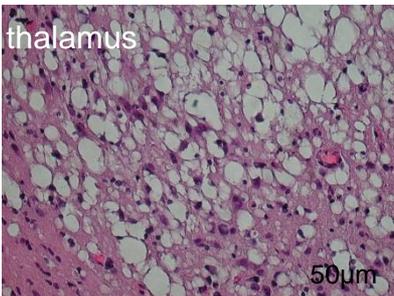
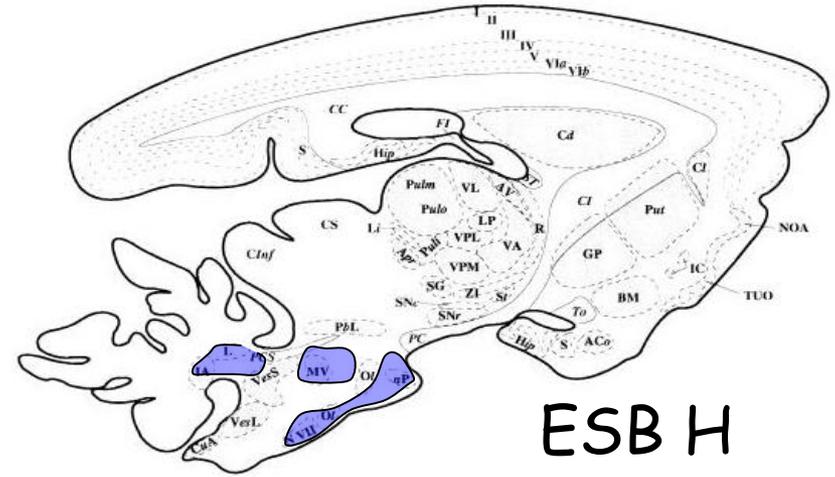
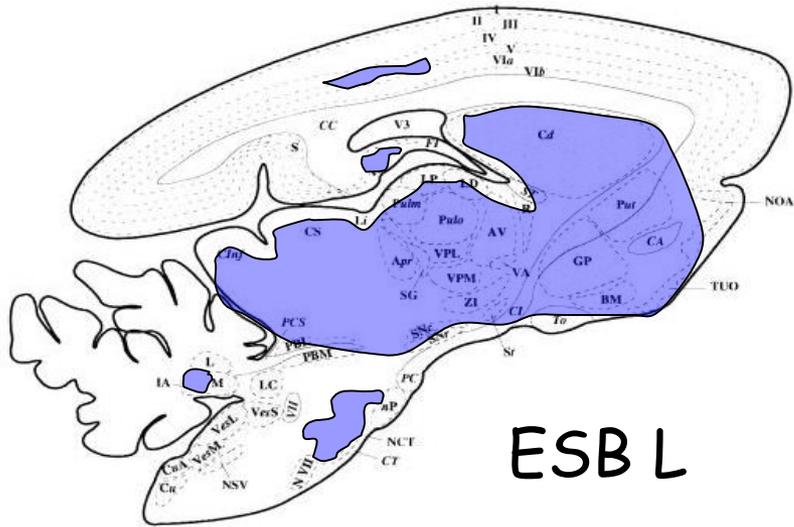
# ESB-L voie intracérébrale

Microcèbe 485, mâle inoculé à l'âge d'un an, en IC avec 50 $\mu$ l d'homogénat de cerveau bovin ESBL: 19,5 mois d'incubation





# Spongiose

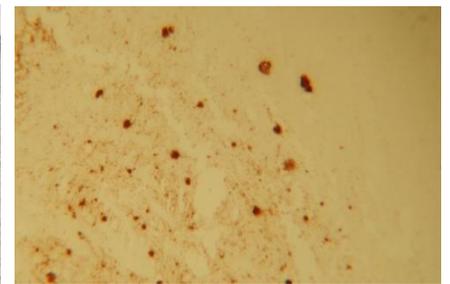
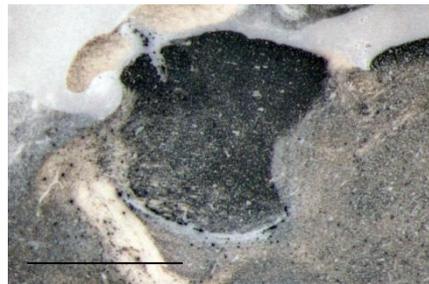
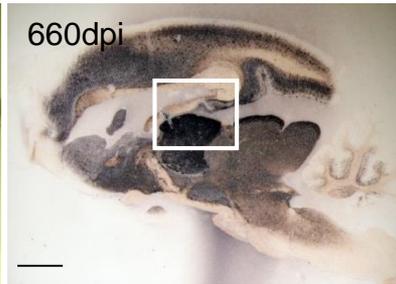
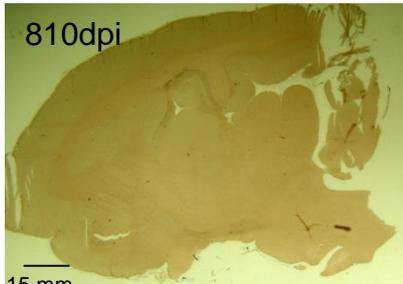
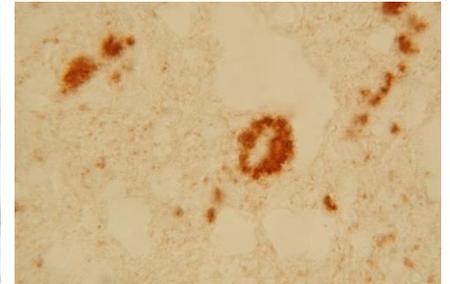
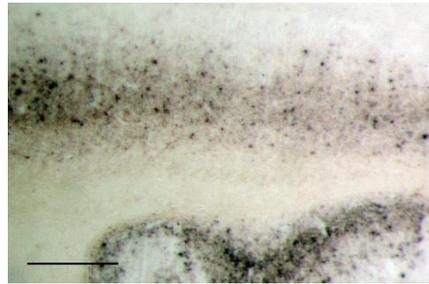
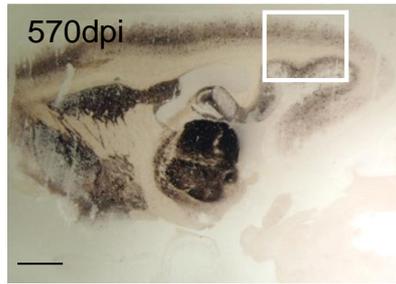
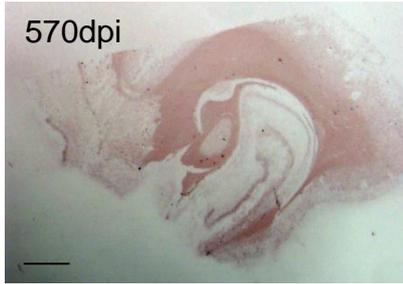




# Détection PrPres

ESB H

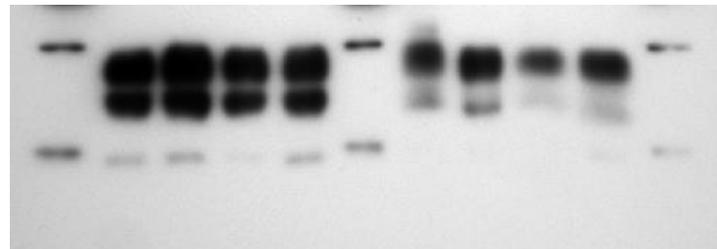
ESB L



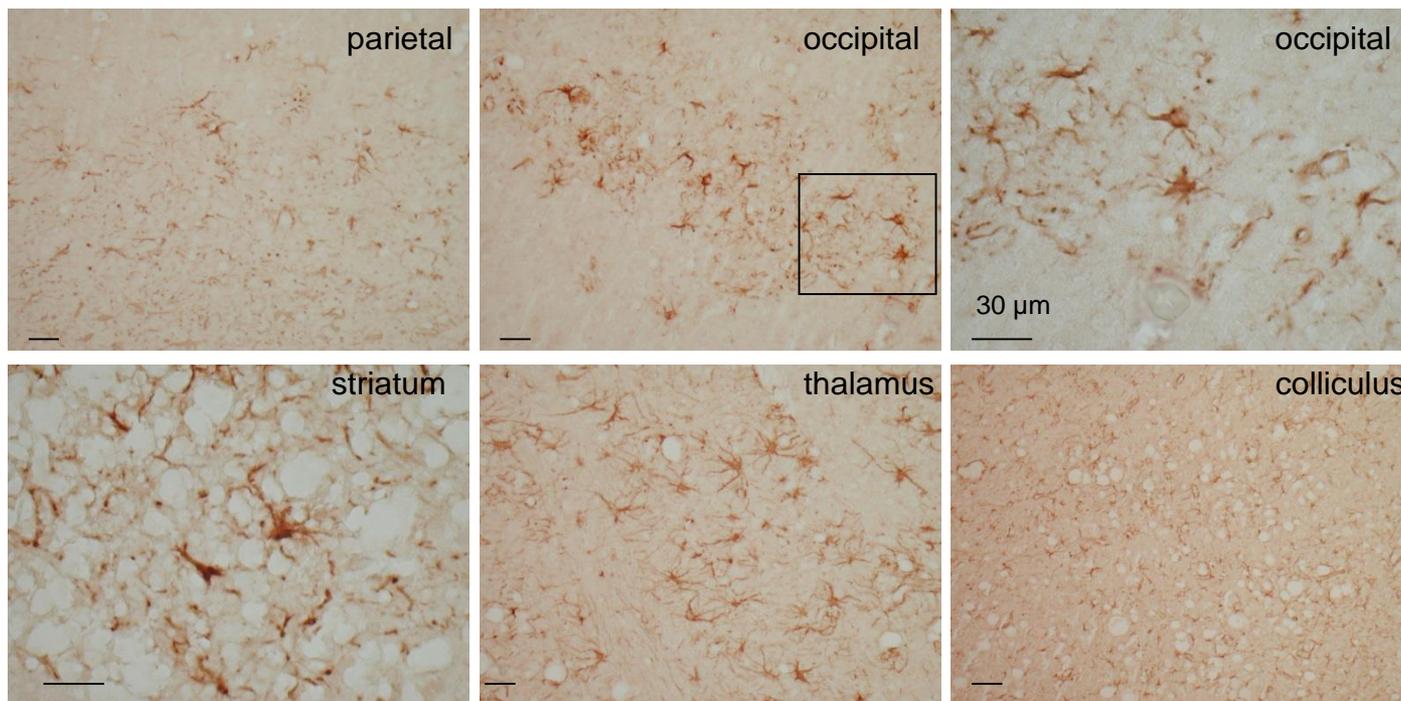
15 mm

- PK

+ PK



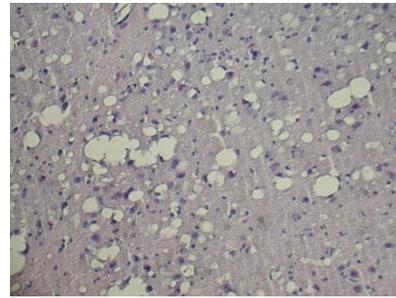
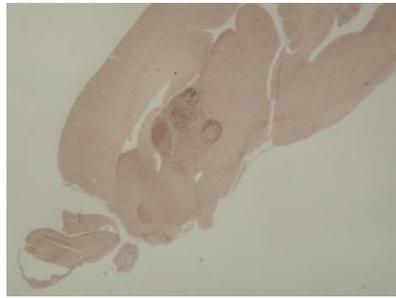
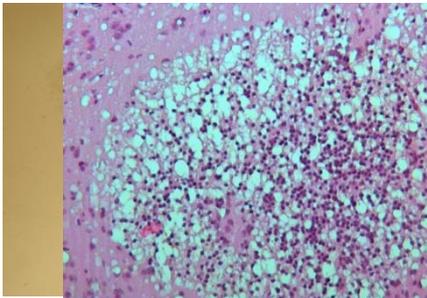
Le microcèbe est sensible à la forme ESB L





# Transmission ESB-L voie orale

animal	Age inoculation	Agent	incubation	Signes cliniques	WB	spongirose	petblot	immuno
M663	2 mois	ESBL, 5mg	27 mois	oui	+++	+++	+	++
M678	2 mois	ESBL, 5mg	34 mois	oui	++	+++	+	+
F676	2 mois	ESBL, 5mg	33 mois	non	-	+	-	-
F674	2 mois	ESBL, 5mg	32 mois	non		-	-	-
F677	2 mois	ESBL, 50mg	32 mois	oui		+++	++	++
M586	2 ans	ESBL, 5mg	31 mois	oui	++	++	++	+
M589	2 ans	ESBL, 5mg						
M592	2 ans	ESBL, 50mg						
M597	2 ans	ESBL, 50mg	18 mois	non	+	(+)	-	-





# ESB-L voie orale

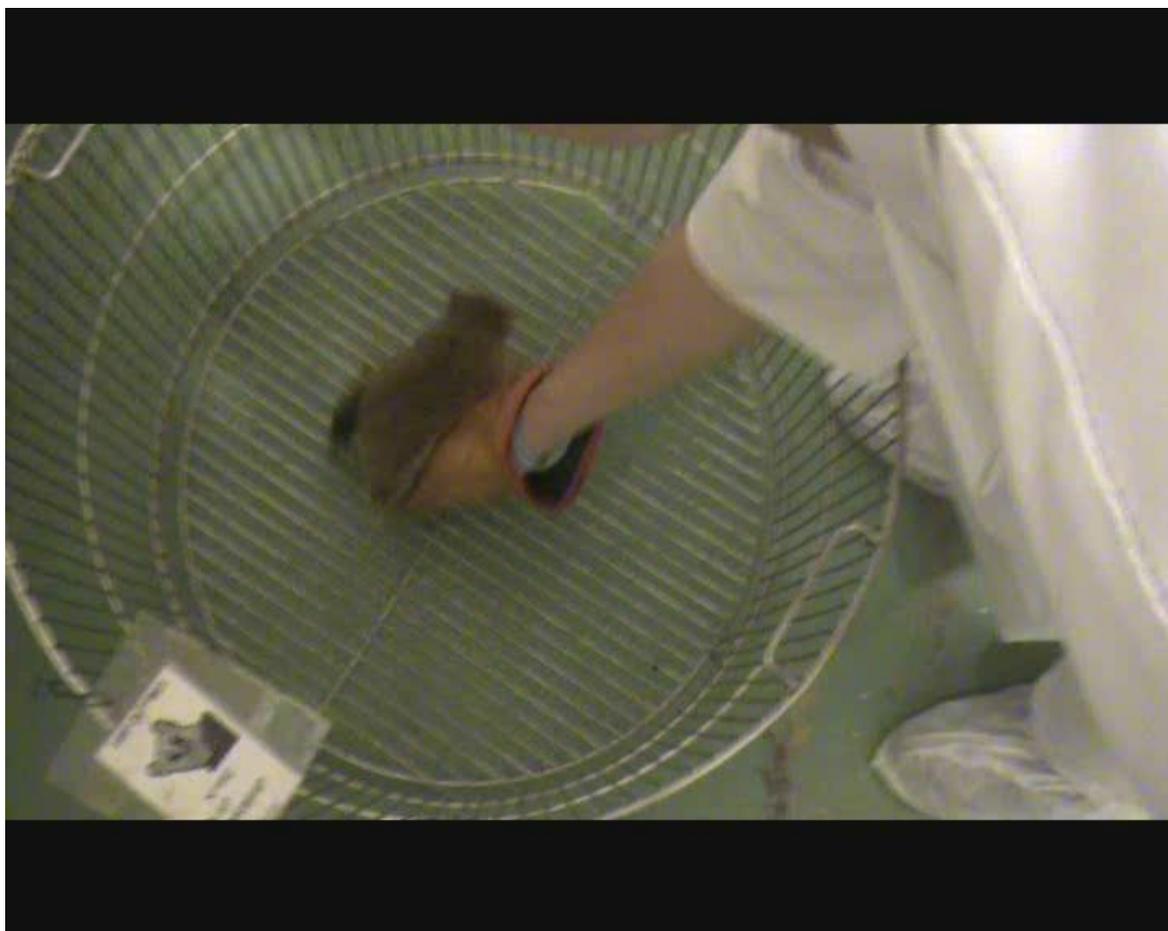
Microcèbe mâle 663, contaminé à l'âge de 2 mois, par voie orale, 5mg d'homogénat de cerveau de bovin atteint d'ESBL: 27 mois d'incubation





# ESB-L voie orale

Microcèbe mâle 592, contaminé à l'âge de 2 ans, par voie orale, 50mg d'homogénat de cerveau de bovin atteint d'ESBL: pas de signes cliniques





# Conclusions

ESB L beaucoup plus virulente que ESB classique pour les microcèbes

Par voie intracérébrale: 100% des individus développent des signes neurologiques

Par voie orale: 40% des individus contaminés très jeunes développent des signes cliniques accompagnés de spongiose. La protéine prion pathologique semble plus sensible aux protéases.

Ceci suggère un risque de transmission à l'homme.