

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE SCIENCES-TECHNOLOGIE-SANTE

FACULTE des Sciences

UMR 1061 « Génétique Moléculaire Animale » Limoges et

GIDTIP, Commissariat à l'Energie Atomique, Fontenay-aux-Roses

Année : 2004

N°312004

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline: Biologie et Santé

Présentée et soutenue par

Agnès Barret

Le 22 Novembre 2004

MALADIES A PRIONS

Recherche de nouvelles molécules et cibles thérapeutiques

Directeurs de Thèse :

Professeur Raymond Julien et Docteur Jean-Philippe Deslys

Jury

Monsieur le Docteur H. Laude

Rapporteur

Monsieur le Professeur J.P Caruelle

Rapporteur

Monsieur le Docteur P.F. Gallet

Examineur

Monsieur le Professeur A. Maftah

Président

Monsieur le Docteur J.P. Deslys

Co-Directeur

Monsieur le Professeur R. Julien

Co-Directeur

Remerciements

Je remercie le Conseil Régional du Limousin et le Commissariat à l'Energie Atomique pour leur soutien financier sans lequel ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Pierre Caruelle et le Docteur Hubert Laude pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Abdou Maftah d'une part, pour avoir accepté la présidence du jury et d'autre part, pour son accueil au sein du laboratoire de Limoges.

Je remercie le Professeur Raymond Julien ainsi que le Docteur Jean-Philippe Deslys pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires.

Je tiens à remercier tout particulièrement François, d'une part, pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, et surtout, pour son aide précieuse et son encadrement durant ces trois années de travail au sein du laboratoire de Limoges.

Je remercie également Lionel, Florence, Chantal, Céline et Peggy pour leur participation à ce travail et pour leur accueil à Limoges.

Maintenant, place à l'équipe de choc parisienne. Il y aurait tant de choses à dire ! Un grand merci tout particulier à Claire (le hasard a fait que l'on travaille ensemble, j'en suis heureuse, car une amitié sincère nous lie désormais), Emilie et Estelle (sans votre complicité, une grande partie de ce travail n'aurait pas pu aboutir). Un grand merci, donc, pour l'amitié qui nous unit (si chère à mon coeur), pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces trois années passées en votre compagnie, pour votre soutien précieux, pour avoir réussi à me supporter malgré les coups de blues, sans oublier bien sûr les fous rires, les gâteaux au chocolat et tous les bons moments passés ensemble (quelques soirées sont mémorables !). Bien sûr, je ne t'oublie pas Fred, nos sorties sportives estivales au Parc de Sceaux suivies d'un petit remontant, tes bougonnements et les petites bouffes (certaines vraiment inoubliables !) vont me manquer ! Aude, Dom et Dolo, je vous remercie aussi pour les bons moments passés avec vous.

Je n'oublie pas non plus Chris et Max, pour nos nombreuses discussions « hautement philosophiques ! » au téléphone ou au labo, nos moments de soutien réciproque, et nos petites bouffes.

Merci aussi à Aurore pour m'avoir donné un énorme coup de pouce en histologie, à Frédéric, René, Seb et Anthony pour s'être occupé de nos nombreuses (beaucoup trop !) petites bêtes, sans oublier Nathalie, Guillaume et Steve.

Pensée particulière pour Céline et Kadija pour leur amitié et leur soutien, malgré la distance.

Un merci tout spécial à Karine, Sophie, Bastien, Ariane, Gérald et Philippe pour leur amitié, tous les bons moments et toutes les soirées passées ensemble aussi bien toulousaines, montpellierennes, bayonnaises que parisiennes.

Enfin, un grand merci à toute ma famille et tout particulièrement mes parents pour l'amour qu'ils me portent, à mes sœurs et, à Marie-Noëlle et Jean-Claude pour leur incomparable générosité et leur accueil et à ma grand-mère, pour son soutien sans limites.

Abbréviations

Ac: Anticorps

AD: *Alzheimer's Disease* (maladie d'Alzheimer)

APP: *Amyloid precursor protein* (précurseur de la protéine amyloïde)

Asn: Asparagine

ATNC : Agent transmissible non conventionnel

Bn : Benzylamide

ChPF: *Chondroitin polymerization factor* (facteur de polymérisation de la chondroïtine)

Chst8 : Carbohydate sulfotransférase-8

CDG : *Congenital disorder of glycosylation* (maladie congénitale de la glycosylation)

CM: Carboxyméthyl

CsGalNAcT-I et II : Chondroïtin Sulfate N-Acétylgalactosaminyltransférases-I et II

CsGlcAT : Chondroïtin sulfate glucuronic acid transférase

CS : Chondroïtine sulfate

CSPG : Chondroïtine sulfate protéoglycane

CSS : Chondroïtin sulfate synthase

Cu : Cuivre

DC : Dichroïsme circulaire

DS500 : Dextran sulfate 500

DTT : Dithiothreitol

DMMB : *1,9-Diméthylméthylène Blue* (bleu de 1,9-diméthylméthylène)

DNA : *Desoxyribonucleic acid* (acide désoxyribonucléique)

DNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate

DRG : Ganglion dorsal

EEG : Electroencéphalogramme

ERAD : *Endoplasmic reticulum associated degradation* (dégradation associée au réticulum endoplasmique)

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

ESST : Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles

FCS : *Fetal Calf Serum* (Sérum de veau foetal)

FDC: Cellules folliculaires dendritiques

GAG : Glycosaminoglycane

GalNAc-4-ST1: N-acetylgalactosamine sulfotransférase I

GaT-I: Galactosaminyltransférase-I
GaT-II: Galactosaminyltransférase-II
GlcAT-I: *Glucuronic Acid transférase-I* (Acide glucuronique transférase 1)
GlcNAc: N-acétylglucosamine
GalNAc: N-acétylgalactosamine
GPI: Glycosylphosphatidylinositol
Gy: Gray
HM : Héparane mimétique
HME: *Hereditary multiple exostosis* (exostose multiple héréditaire)
HPA23 : Hétéropolyanion 23
HS : Héparane sulfate
HSPG : Heparan sulfate protéoglycane
IDX: 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicine
i.c.: Intracérébral
IFF: Insomnie fatale familiale
i.p. : Intrapéritonéal
IR : *Insulin receptor* (récepteur à l'insuline)
LRP: *Laminin receptor precursor* (précurseur du récepteur à la laminine)
LR : *laminin receptor* (récepteur à la laminine)
MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob
Mn : Manganèse
N-CAM : Neuronal Cell Adhesion Molecule
PAPS : 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
PAMAM : Polyamidoamide
PBS : *Phosphate buffer saline* (tampon salin phosphate)
PEI : Polyéthylène imine
PCR : *Polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)
PDI : Protein disulfide isomérase
PK : Protéinase K
PMCA : *Protein misfolding cyclic amplification* (amplification cyclique de transconformation protéique)
Prnp : Gène de la PrP
Prion : Proteinaceous infectious particule
PrPc ou PrPsen: Protéine prion cellulaire normale sensible aux protéases

PrPres : Protéine prion pathologique résistante aux protéases
PrPSc : Protéine prion scrapie résistante aux protéases et infectieuse
PrnP0/0 : Souris dont le gène *Prnp* a été invalidé
PrnP -/- : Souris dont le gène *Prnp* a été invalidé
RE : Réticulum endoplasmique
RGTA : *Regenerating Agent* (Agent de régénération)
RNA : *Ribonucleic acid* (Acide ribonucléique)
SAF : *Scrapie Amyloid Fibril* (PrPres purifiée)
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SDS PAGE : SDS-polyacrylamide gel
SGSS : Syndrôme de Gerstmann –Sträussler-Sheinker
Sinc: *Scrapie incubation period* (gène impliqué dans la période d'incubation de la tremblante)
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SOD : Superoxyde dismutase
SRE : Système réticulo-endothélial
STE : *Stop transfert effector* (séquence d'arrêt de transfert)
XT-I et II : Xylosyltransférases-I et II
vMCJ : Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
Zn : Zinc

Table des matières

INTRODUCTION	13
ETAT DE L'ART	16
I-GENERALITES	17
II-LES AGENTS TRANSMISSIBLES NON CONVENTIONNELS (ATNC)	19
II-1 PROCEDES D'INACTIVATION DES ATNC	19
II-1.1 Procédés physiques	19
II-1.1.1 Chaleur	19
II-1.1.2 Rayonnements Ultra-Violets	20
II-1.1.3 Radiations ionisantes	20
II-1.2 Procédés chimiques	20
II-1.2.1 Soude (NaOH)	20
II-1.2.2 Hypochlorite de sodium	20
II-1.2.3 Détergents	21
II-1.2.4 Dérivés phénoliques	21
II-1.2.5 Le peroxyde d'hydrogène	21
II-1.2.6 Thiocyanate de guanidium	21
II-2 NATURE DES ATNC	22
II-2.1 Hypothèses virales	22
II-2.2 Hypothèse protéique : le prion	23
II-2.2.1 Mise en évidence de l'hypothèse	23
II-2.2.2 Limites de l'hypothèse du prion	24
III-LA PROTEINE PRION	26
III-1 LA PROTEINE PRP	26
III-1.1 Le gène codant la PrP	26
III-1.2 Polymorphisme et mutations	27
III-1.3 Structure de la protéine PrP	28
III-1.3.1 Structure primaire	29
III-1.3.2 Structures secondaire et tertiaire	30
III-2 CONVERSION DE LA PRP	31
III-2.1 Hypothèse du mécanisme hétérodimère	32

III-2.2 Hypothèse d'une autocatalyse coopérative	32
III-2.3 Hypothèse d'une polymérisation par noyau de nucléation	33
III-2.4 Hypothèse de la dimérisation	34
III-2.5 Chaperonnes et formation de PrPSc	34
III-3 BIOSYNTHESE ET LOCALISATION CELLULAIRE	35
III-4 FONCTIONS DE LA PRPC	38
III-4.1 Signalisation	38
III-4.1.1 Survie cellulaire	38
III-4.1.2 Adhésion	39
III-4.2 Fonction synaptique	39
III-4.3 Transport synaptique	40
III-5 GLYCOSYLATION ET PRP	40
III-5.1 Glycosylation de la PrP	40
III-5.1.1 N-Glycosylation	40
III-5.1.2 Glycosylation et repliement	42
III-5.1.3 Glycosylation et localisation de la PrP	42
III-5.1.4 Glycosylation et conversion PrPc/PrPres	43
III-5.1.5 Glycosylation et typage de souches	44
III-5.2 Interactions de glycannes exogènes avec la PrP	45
IV- LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES SUBAIGUES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES ET LEUR MODE DE PROPAGATION	46
IV-1 LES DIFFERENTES ESST	46
IV-1.1 Les EEST animales	47
IV-1.2 Les ESST humaines	48
IV-2 PROPAGATION DE L'AGENT INFECTIEUX	51
IV-2.1 La lymphoinvasion	51
IV-2.2 L'interface neuroimmune	52
IV-2.3 Propagation dans la SNC	53
V- THERAPEUTIQUE EXPERIMENTALE	55
V-1 GENERALITES	55
V-2 LES DIFFERENTES APPROCHES THERAPEUTIQUES TESTEES	57
V-2.1 L'iododoxorubicine (IDX)	57
V-2.2 Tétracyclines	57
V-2.3 Le Rouge Congo (CR)	58
V-2.4 Peptides synthétiques « β -sheet breaker peptides »	58

V-2.5 Polyanions	59
V-2.6 La suramine	62
V-2.7 La dapsone	62
V-2.8 La quinacrine	62
V-2.9 La chlorpromazine	64
V-2.10 Les antibiotiques polyéniques	64
V-2.11 Porphyrines tétrapyroles	65
V-2.12 Polyamines branchées	65
V-2.13 Acides ribonucléiques	66
V-2.14 Modulateurs de la mort neuronale	66
V-2.15 Intervention immunothérapeutique	66

RESULTATS	68
------------------	-----------

I- RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES	69
I-1 AVANT-PROPOS	69
I-2 ARTICLE N°1	70
I-2 EVALUATION D'AUTRES MOLECULES	79
I-2.1 Les Héparanes Mimétiques	79
I-2.1.1 Matériel et Méthodes	80
I-2.1.1.1 Analyse de l'efficacité des molécules in vitro	80
I-2.1.1.2 Analyse de l'efficacité des molécules in vivo	80
I-2.1.2 Résultats	80
I-2.1.2.1 Analyse de l'efficacité in vitro	80
I-2.1.2.1.2 Analyse de l'efficacité des molécules in vivo	81
I-2.2 Les porphyrines	82
I-2.2.1 Matériel et méthodes	83
I-2.2.2 Résultats	83
II- GENES INTERVENANT DANS LES MECANISMES DE LA GLYCOSYLATION ET NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES	87
II- 1 AVANT PROPOS	87
II-2 ARTICLE 2	88
II-3 EXPRESSION DES GENES <i>CHST8</i> ET <i>CHGN1</i> DANS UN AUTRE MODELE CELLULAIRE	108
II-3.1 Matériel et méthodes	108
II-3.1.1 Cellules	108

II-3.1.2 Extraction des ARNm totaux et analyse de l'expression des gènes <i>Chst8</i> et <i>ChGn1</i> dans les Mov et les ScMov	108
II-3.2 Résultats	109
<u>DISCUSSION</u>	111
I- RECHERCHES DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES	112
I-1 LA QUINACRINE	113
I-2 LES HEPARANES MIMETIQUES	114
I-3 LES PORPHYRINES	119
I-4 LES POPULATIONS CELLULAIRES DANS LE CONTROLE DE LA REPLICATION DE L'AGENT INFECTIEUX	122
I-5 EFFICACITE THERAPEUTIQUE ET SOUCHES DE PRIONS	123
II- GENES INTERVENANT DANS LES MECANISMES DE LA GLYCOSYLATION ET LES MALADIES A PRIONS	126
II-1 CHOIX DU MODELE UTILISE	127
II-2 LES PRIONS ET LE CONTROLE DE LA GLYCOSYLATION CELLULAIRE	128
II-3 PATHOLOGIES LIEES A LA PERTURBATION DE LA GLYCOSYLATION ET LEUR ENSEIGNEMENT	129
II-3.1 Les CDG	129
II-3.2 Pathologies et glycosaminoglycannes	131
II-3.3 Rôle de la sulfatation	133
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	137
<u>REFERENCES</u>	140
<u>ANNEXES</u>	172

Table des illustrations

Figures

Figure n°1: Représentation de la structure du gène, de l'ARNm messenger et des structures primaires et secondaires de la PrP humaine (p.27)

Figure n°2: Position des différentes mutations et différents polymorphismes au niveau du gène *PRNP* humain (p.28)

Figure n°3: Structures tertiaires de la PrP^c et PrP^{Sc} (p.31)

Figure n°4: Modèle de la conversion conformationnelle par formation d'hétérodimère (p.32)

Figure n°5: Modèle de conversion par polymérisation autocatalytique (p.33)

Figure n°6: Modèle de conversion par la formation d'un noyau de nucléation (p.33)

Figure n°7: Modèle de réplication des ATNC basé sur la formation de dimère et du réarrangement des ponts disulfure (p.34)

Figure n°8: Trafic intracellulaire de la PrP^c et PrP^{Sc} (p.36)

Figure n°9: Représentation de la position des N-glycans et de l'ancre GPI sur la PrP (p.40)

Figure n°10: Comparaison de l'évolution du nombre de cas par année d'ESB et de nvMCJ au Royaume-Uni (p.51)

Figure n°11: Différentes voies d'action thérapeutiques (p.56)

Figure n°12: Effet du CMDS comparativement au HM2602 sur l'accumulation de la PrP^{Sc} dans la rate de souris infectées la souche de tremblante C506M3 (p.82)

Figure n°13: Structure de la porphyrine P7 et de P17 testées par Caughey et de P23 (p.84)

Figure n°14: Anatomie fonctionnelle de la rate (p.117)

Figure n°15: Initiation de la réponse immune après métabolisme local des HSPG (p.118)

Figure n°16: Mécanisme de défense antioxydant (p.119)

Figure n°17: Activité hème oxygénase dégradant le hème en ferritine, biliverdine et CO (p.121)

Figure n°18: Mécanisme de transfert de groupement SO₄ par la GalNac-4-ST1 (p.133)

Tableaux

Tableau n°1: Composition en hélices \square et feuillets \square de la PrP cellulaire et pathologique (p.30)

Tableau n°2: Représentation des profils de migration sur gel des 4 types de souches identifiées dans la MCJ et l'ESB (p.44)

Tableau n°3: Les différentes ESST animales et leur première observation (p.46)

Tableau n° 4: Les différentes ESST humaines et leur première observation (p.47)

Tableau n°5: Comparaison des génotypes au codon 129 dans la population normale et pour les différentes de MCJ (p.48)

Tableau n°6: Répartition mondiale et selon l'origine du nombre de cas de MCJ sporadiques (p.49)

Tableau n° 7: Comparaison de la MCJ sporadique et du vMCJ (p.50)

Tableau n°8: Détermination de l'efficacité (+) et de la toxicité (+) des différents HM testés (p.81)

Tableau n°9 Evaluation de la toxicité (+) et de l'efficacité (+) des différents composés (p.83)

Tableau n°10: Les anomalies congénitales de la glycosylation et les différents gènes touchés (p.130)

Introduction

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), plus communément appelées maladies à prions, sont des maladies neurodégénératives qui touchent à la fois l'homme et l'animal et dont l'issue est, à ce jour, toujours fatale. Ces maladies ont un déterminisme qui peut être sporadique, infectieux ou génétique et sont transmissibles.

Elles sont induites par des agents infectieux, agents transmissibles non conventionnels (ATNC). Le caractère insolite de ces maladies dont la période d'incubation asymptomatique est la plus longue connue en pathologie humaine est justifié par les propriétés exceptionnelles des agents dont elles sont à l'origine. En plus de leur extrême résistance aux procédés classiques d'inactivation des micro-organismes, de l'absence de toute réaction immunitaire spécifique, la composition chimique de ces agents oriente les hypothèses vers une nature exclusivement protéique actuellement la plus communément admise. Il s'agirait donc d'une protéine infectieuse (prion) sans particule nucléique, s'accumulant sous une forme anormalement conformée à l'origine du caractère pathogène de l'agent. Cette hypothèse, tout à fait révolutionnaire, excluant tout élément d'origine génétique, constitue un véritable bouleversement des dogmes de la biologie actuelle.

Si, à l'heure actuelle, il n'existe aucun argument épidémiologique pour affirmer que l'agent de la tremblante du mouton, qui est une maladie connue depuis plus de deux cents ans, est pathogène pour l'homme, toutes les études effectuées sur la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) apparue en 1996, tendent à montrer qu'elle est le résultat de la contamination de l'homme, probablement par voie alimentaire, par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). L'hypothèse selon laquelle plus d'un million de carcasses de bovins atteints d'ESB seraient passées dans la chaîne alimentaire humaine soulève alors un nouveau problème de santé publique s'ajoutant au risque iatrogénique en pathologie humaine causé par la contamination par des hormones de croissance humaines extractives infectées et les opérations neurochirurgicales. L'inquiétude suscitée par cette nouvelle épidémie est d'autant plus accrue par l'absence de tout traitement efficace des ESST. A l'heure actuelle, seule une molécule anciennement utilisée pour le traitement du paludisme, la quinacrine, ainsi que le pentosan polysulfate ont fait l'objet de traitements compassionnels pour les patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob entraînant des résultats plus ou moins encourageants, ceci probablement en raison de l'état avancé de la maladie au moment du traitement et de nos connaissances encore émergentes sur ces agents infectieux. L'étiologie encore inconnue des ESST est un obstacle à l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, préalable indispensable à la mise en place de diagnostics et de traitements précoces. Dès lors, les données actuelles encore partielles sur la physiopathologie de ces affections ne permettent pas la mise en œuvre d'approches expérimentales précises pour la

recherche de nouvelles thérapeutiques. C'est ce qui explique la variété des classes thérapeutiques testées. Par ailleurs, le caractère subaigu de ces maladies qui, après inoculation à l'animal, évoluent de trois mois à plusieurs années alourdit considérablement les expérimentations *in vivo*.

La difficulté concernant la mise au point d'un traitement efficace contre ces affections conduit donc la communauté scientifique à développer de nouvelles voies de recherche. L'explosion de la transcriptomique et de la protéomique pourrait peut-être apporter des éléments de réponse importants quant à la nature de l'agent lui-même ou d'éventuels partenaires et marqueurs de l'infection.

Ce travail s'inscrit donc dans le développement de stratégies expérimentales alternatives et complémentaires permettant de sélectionner des molécules efficaces et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant ces maladies. Cette étude a porté d'une part sur l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité de diverses molécules anciennement et nouvellement développées, et d'autre part, sur l'impact de la présence de l'agent infectieux sur la transcription de nombreux gènes liés à la glycosylation, afin d'apporter des données supplémentaires sur d'éventuelles nouvelles cibles moléculaires, ainsi que sur les mécanismes moléculaires intervenant dans les processus d'infection.

Etat de l'art

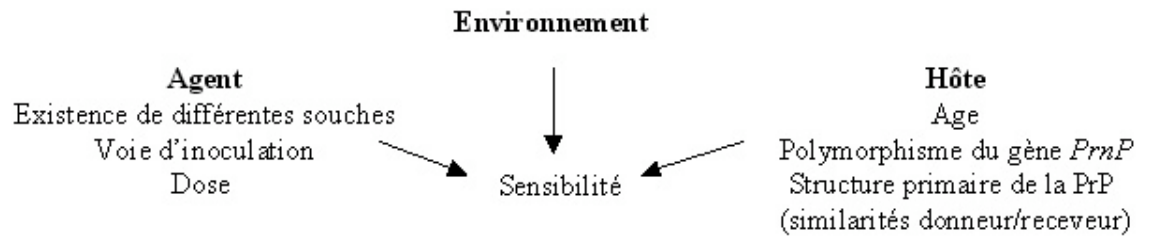
I-GENERALITES

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles regroupent principalement chez l'homme, la maladie de Creutzfeldt-Jakob et chez l'animal, la tremblante du mouton et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), plus communément appelée maladie de la vache folle (voir Etat de l'art IV).

Toutes ces maladies présentent des caractéristiques communes :

- Elles affichent une période d'incubation asymptomatique longue pouvant atteindre jusqu'à 40 ans, alors que la phase clinique, qui évolue selon un mode subaigu, est relativement courte (quelques semaines à quelques mois).
- La maladie est progressive, irréversible et toujours fatale.
- L'examen clinique traduit exclusivement la dégénérescence du système nerveux central (SNC) : ataxie cérébelleuse (incoordination motrice et instabilité posturale), tremblements et chez l'homme, myoclonies et démence.
- A l'examen histopathologique post-mortem, des lésions confinées au système nerveux central sont mises en évidence. Elles se caractérisent par la formation de vacuoles de spongiose au niveau des corps cellulaires, des prolongements axonaux et des dendrites neuronaux [147] et d'une perte neuronale et une gliose astrocytaire [100]. Pour certaines ESST, des plaques amyloïdes constituées de dépôts protéiques amorphes sont parfois observées.
- Malgré la description ces dernières années de l'intervention des cellules du système lymphoréticulaire dans la propagation de l'agent infectieux, aucune réponse immunitaire spécifique cellulaire ou humorale n'est identifiable chez les sujets infectés.
- Par définition, ces maladies sont toutes transmissibles à d'autres individus au sein d'une même espèce et pour certaines, inter-espèces. La transmissibilité dépend de

- la sensibilité de l'hôte à l'infection, dépendant elle-même d'autres facteurs et de la transmissibilité interspécifique dépendant de la force de la barrière d'espèce.



- Malgré la présence de titres infectieux très élevés dans le SNC, aucun agent infectieux ni aucune structure évocatrice d'un micro-organisme n'ont pu être mis en évidence. Les agents responsables de ces ESST sont donc appelés agents transmissibles non conventionnels (ATNC).
- Le seul marqueur moléculaire spécifique des ESST est une forme anormale d'une protéine de l'hôte, la PrPc qui s'accumule dans le SNC sous une forme pathologique (PrPres ou PrPSc) proportionnellement au titre infectieux.

II-LES AGENTS TRANSMISSIBLES NON CONVENTIONNELS (ATNC)

Le terme « ATNC » a été donné aux agents étiologiques des ESST en raison de leurs propriétés physicochimiques tout à fait exceptionnelles. En effet, d'une part, leur nature exacte reste encore à élucider et d'autre part, ils sont résistants aux principaux procédés habituellement utilisés pour inactiver les microorganismes.

II-1 Procédés d'inactivation des ATNC

II-1.1 Procédés physiques

II-1.1.1 Chaleur

Les résultats de l'inactivation par autoclavage sont variables selon les études et traduisent les différences de résistance des ATNC selon les souches et pour une même souche, selon son état d'agrégation, son degré de purification et les conditions exactes d'expérimentation.

La stabilité des ATNC à la chaleur (thermostabilité) est remarquable en milieu sec. Alors qu'un traitement de 160°C pendant 1h00 est efficace contre les micro-organismes et les virus, il se révèle inefficace contre les ATNC [91]. Il en est de même pour un traitement en chaleur sèche de 1h00 à 360°C [47, 49]. Une autre étude effectuée par l'équipe de Brown a même montré que les ATNC étaient résistants à une chaleur sèche de 600°C [50]. Par ailleurs, l'efficacité du traitement thermique diminue si la préparation a subi une fixation préalable. Si l'on effectue un prétraitement au formol, l'autoclavage devient inefficace [48].

A l'heure actuelle, les normes anglaises recommandent un autoclavage en charge poreuse de 18 min à 134-138°C et les normes françaises au moins 18 min à au moins 134°C. Néanmoins, compte tenu de la thermostabilité de certaines souches et de l'action inactivatrice de certains traitements physico-chimiques, les procédures de décontamination recommandées par l'OMS en particulier pour la décontamination des instruments chirurgicaux impliquent une

immersion dans la soude 1N pendant 1h00 suivie d'un autoclavage en charge poreuse à 134°C pendant 18 min [355].

II-1.1.2 Rayonnements Ultra-Violets

Les longueurs d'onde d'UV utilisées classiquement contre les micro-organismes contenant des acides nucléiques (entre 250 et 270 nm) sont inefficaces [91]. La D_{37} d'irradiation (dose à laquelle 37% de l'activité reste présente) [27, 200] est de 20 000J/m² pour l'agent de la tremblante 263K tandis qu'elle n'est que de 6,5 J/m² pour le bactériophage M13.

II-1.1.3 Radiations ionisantes

Plusieurs études ont montré que les rayonnements ionisants classiquement utilisés en stérilisation (25 000 Grays (Gy)) étaient peu efficaces contre les ATNC [127, 201]. La dose inactivante 37% est de 100 000Gy pour la MCJ, contre 100 Gy pour le virus Herpès et 5000 Gy pour le VIH [344].

II-1.2 Procédés chimiques

II-1.2.1 Soude (NaOH)

Seuls des pH fortement alcalins sont capables de diminuer efficacement le titre infectieux. Les bases minérales fortes comme la soude (1N, 40g/L, pH 14), pendant 1h00 à température ambiante, détruisent efficacement les ATNC. Cependant, certaines souches de MCJ et de tremblante ont été décrites comme résistantes à ce traitement [359].

II-1.2.2 Hypochlorite de sodium

L'eau de Javel concentrée à 48 degrés chlorométriques (48° CHL) contenant 12,5% de chlore actif utilisée dans les laboratoires et les hôpitaux constitue le désinfectant le plus efficace

contre les ATNC [46, 359]. Toutefois, l'eau de Javel à 48°C n'est pas stable, tandis que l'eau de Javel à 6-18°C est stable pendant un an. La procédure recommandée par l'OMS est un traitement de 1h00 à 20°C avec une solution d'eau de Javel titrant à 6°C.

II-1.2.3 Détergents

Les détergents non ioniques sont inefficaces contre les ATNC, en dehors du dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui, à chaud (90°C), réduit sensiblement l'infectiosité [180].

II-1.2.4 Dérivés phénoliques

Le phénol élimine l'infectiosité associée aux protéines présentes dans la phase aqueuse lors du protocole de purification des acides nucléiques [296]. Le dérivé phénolique LpH (Calgon Vestal Laboratories, Saint-Louis, Mo) a montré une très bonne efficacité sur la souche 263 K du hamster après une exposition au produit à 10% pendant 30 min ou 1% pendant 16h00 [105]. Par ailleurs, récemment, Fichet et al. ont montré que le LpH (Environ LpH, STERIS) était efficace sur la décontamination de tiges métalliques contaminées par la souche 263K implantées dans le cerveau de hamsters [112]. Le LpH pourrait constituer un substitut intéressant à l'emploi de la soude et de l'eau de Javel pour la décontamination de surface.

II-1.2.5 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène qui n'avait pas montré d'action majeure sur les ATNC a récemment montré une très bonne efficacité lorsqu'il était associé à un traitement enzymatique. En effet, lorsque des tiges métalliques contaminées par la souche 263K sont traitées avec un détergent alcalin (HAMO, STERIS) à 0,8%, 43°C, 5 min et avec du VPH (Vaporized Peroxyde Hydrogen) 1,5 mg/L, 25°C, 3 h et implantées dans un cerveau de hamster, il n'y a aucune transmission de la maladie [112].

II-1.2.6 Thiocyanate de guanidium

L'équipe de Manuelidis a montré que le thiocyanate de guanidium avait une certaine

efficacité sur la diminution du titre infectieux d'homogénats de cerveau [227].

II-2 Nature des ATNC

La nature exacte des ATNC dont la taille a été estimée entre 15 et 40 nanomètres [287] est encore inconnue. Virus, Virino, prion ? Aujourd'hui, l'hypothèse du prion semble la plus soutenue bien que plusieurs propriétés de ces agents démentent l'existence d'un agent purement protéique.

II-2.1 Hypothèses virales

Ce sont tout d'abord les travaux d'Alan Dickinson dans les années 1970 qui ont permis d'ouvrir la voie sur la nature potentielle de l'agent. En effet, le travail de cette équipe sur des souris syngéniques (qui possèdent le même patrimoine génétique) chez lesquelles il a été possible de stabiliser différentes souches d'ATNC, lui a permis d'établir l'existence d'une information spécifique d'une souche en raison de la caractérisation reproductible de plusieurs souches d'ATNC chez un hôte, ce qui a conduit à émettre l'idée d'un virus responsable de ces ESST. Cependant, malgré des titres infectieux importants, les études d'inactivation de ces agents par l'irradiation, la chaleur et les processus chimiques rendent les conclusions contradictoires [311]. En effet, l'hypothèse d'un virus ne peut pas être définitivement éliminée en raison de la résistance à la chaleur de l'agent, puisque certains virus isolés de bactéries ont été décrits comme pouvant résister à des températures de 93°C et des pH très faibles [304]. De plus, les données concernant la présence d'un acide nucléique sont difficilement interprétables : certains montrent la difficulté à identifier une molécule d'acide nucléique de la taille d'un génome potentiel [179] cependant d'autres décrivent la présence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de très petite taille [96, 268]. Par ailleurs, l'équipe de Supattapone a montré que des molécules d'ARN pouvaient stimuler la conversion de la protéine PrPc en protéine pathologique [87].

L'absence de réaction immunitaire [290] contrairement à toutes les autres infections virales conventionnelles humaines ou animales, la longueur inhabituelle de la période d'incubation et les propriétés exceptionnelles de ces agents ont conduit à plusieurs hypothèses :

- un virus lent [75].
- un rétrovirus conventionnel qui repose sur l'aptitude de certains virus neurotropes à induire des modifications membranaires sans réponse inflammatoire [226].
- un virus amyloïdogénique contenant une information génétique propre. L'accumulation de la PrPres sous forme amyloïde résulterait de la réplication du virus [94].
- un virino composé d'une structure hybride contenant un petit acide nucléique infectieux nu (qui ne coderait pour aucune protéine virale susceptible d'être reconnue par le système immunitaire) protégé par une coque de protéines codées par l'hôte [93]. Selon Weissman, l'ATNC serait constitué de deux parties distinctes : une partie protéique ou apoprion (codé par le génome de l'hôte) constituée de PrPres serait responsable des phénomènes neuropathologiques et de la transmissibilité et une partie nucléique ou coprion serait responsable du phénomène de souche [377]. Par ailleurs, Sommerville, qui a comparé l'infectiosité avec les propriétés biochimiques de la PrPSc, a pu en déduire les propriétés thermodynamiques des molécules impliquées dans la structure des particules infectieuses. Il en a conclu que l'agent causal des ESST contenait un composé macromoléculaire structurellement indépendant de l'hôte variant dans sa structure covalente entre les souches et protégé par d'autres composés macromoléculaires, ce qui est en accord avec l'hypothèse du virino [340].

II-2.2 Hypothèse protéique : le prion

II-2.2.1 Mise en évidence de l'hypothèse

L'hypothèse « purement protéique » a été pour la première fois avancée par T. Alper en 1966 suite à ses travaux montrant que les UV, qui détruisent habituellement les acides nucléiques et donc les virus, n'avaient aucun effet sur l'agent responsable de la tremblante du mouton et que le spectre de résistance aux rayonnements se rapprochait plus de celui des protéines que des acides nucléiques [6]. La première proposition de ce nouveau concept de l'hypothèse de la protéine seule est venue de Griffith en 1967 qui a suggéré que sous certaines conditions, des protéines pouvaient s'auto-répliquer et agir comme un agent infectieux [139]. Cependant, cette théorie était à l'encontre de tous les concepts de la biologie classique et ses résultats ont

été ignorés jusqu'en 1982, date à laquelle Stanley B. Prusiner, a publié une étude montrant que l'agent de la tremblante ne contenait pas d'acides nucléiques [297]. Cette étude a surtout permis de montrer que lorsque l'on exposait un extrait de cerveau infecté à des protéases, il était partiellement résistant. Cette remarquable découverte leur a permis d'en déduire que le marqueur de l'infection devait être une protéine qu'ils ont appelée « prion » pour « proteinaceous infectious particle ». La protéine infectieuse a ensuite été isolée et nommée PrP 27-30 en raison d'un poids moléculaire de la protéine entre 27 et 30 kDa après hydrolyse au niveau du domaine sensible à la protéinase K (PK).

En 1985, Chesebro et Oesch ont montré l'existence d'une protéine très similaire à celle du prion chez le hamster sain et la souris saine [71, 262]. Ces travaux ont permis de montrer que chez les animaux malades, la PrP existait à la fois sous une forme normale (PrP_c pour PrP cellulaire) et sous une forme anormale pathologique (PrP_{Sc} pour PrP scrapie, également nommée PrP^{res} pour PrP résistante à la dégradation par les protéases) [235].

C'est l'étude de Büeler qui a par la suite permis de contribuer à vérifier l'hypothèse de la protéine seule. Selon lui, si la PrP_{Sc} se multiplie par transconformation de la protéine PrP_c de l'hôte, dans ce cas des organismes qui n'expriment pas la PrP_c doivent être résistants à l'infection. L'inoculation avec un homogénat extrait d'un cerveau d'une souris malade de tremblante à des souris *PrnP* 0/0 qui n'expriment pas de PrP_c a montré que ces souris ne développaient pas la maladie [55]. Néanmoins, la démonstration de l'hypothèse de la protéine seule par ces expériences de souris transgéniques n'est pas suffisante pour certains auteurs qui postulent que la PrP_c pourrait représenter le récepteur pour un virus encore non identifié [289]. Selon eux, l'inactivation du gène *PrnP* pourrait plutôt conférer à la souris une résistance antivirale.

Cependant, ces dernières années, plusieurs travaux semblent aller vers cette hypothèse. Tout d'abord, l'infectiosité est considérablement réduite par des agents qui détruisent la structure de la protéine tels que des anticorps anti-PrP [103, 280]. D'autre part, les études dans un système acellulaire et par PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) ont permis de mettre en évidence la capacité de la PrP pathologique à convertir la PrP_c en PrP^{res} de novo [187, 319].

II-2.2.2 Limites de l'hypothèse du prion

Malgré les progrès décrits ces dernières années sur la compréhension des ESST, des incertitudes persistent encore. En effet, les ESST apparaissent sous la forme de différentes

souches caractérisées par différentes périodes d'incubation, manifestations cliniques et neuropathologiques [298]. Ce phénomène de souches serait dû à une conformation ou un état d'agrégation différents [64, 322], mais on n'a pas encore démontré que ces différences de conformation sont la cause de ce phénomène ou bien une simple manifestation. Par ailleurs, bien que la quantité de PrPres semble corrélée à l'infectiosité, l'infectiosité peut se propager sans PrPres détectable [199], et inversement, des échantillons peuvent contenir beaucoup de PrPres sans être forcément infectieux [153].

Un argument contre l'hypothèse de la protéine seule vient du fait que les ESST, bien que comparées aux autres amyloïdoses classiques en raison de l'accumulation d'une protéine mal conformée, sont les seules à être transmissibles expérimentalement. Ce constat semble dès lors indiquer que les interactions protéiques communes à toutes les amyloïdoses ne peuvent pas expliquer à elles seules le caractère unique de transmissibilité des ESST [72] ainsi que la grande variabilité des souches d'ATNC. Cependant, une étude a montré la transmissibilité d'une amyloïdose selon un mécanisme ressemblant à celui du prion [216]. Si cela était confirmé par d'autres équipes et pour d'autres amyloïdoses, il semblerait alors que l'hypothèse de la protéine seule soit vérifiée. Ceci pourrait d'ailleurs se confirmer en raison d'une étude récente de l'équipe de Prusiner sur de la PrP recombinante. En effet, le seul argument qui pourrait entièrement confirmer l'hypothèse du prion viendrait de la démonstration de la génération de novo de d'infectiosité à partir de PrPsen dans un système in vitro acellulaire, système qui ne permettrait la réplication d'aucun virus. Bien que jusqu'à présent toutes les études qui ont tenté cette expérience ont échoué [152], Prusiner a montré que l'inoculation intracérébrale à des souris de PrP murine synthétique produite chez *Escherichia coli* polymérisée en fibrilles amyloïdes entraînait l'apparition dans le cerveau de PrPres et de signes neuropathologiques [205]. Si ces données sont confirmées, cela pourrait représenter la démonstration finale que les agents étiologiques des ESST sont bien des protéines infectieuses.

III-LA PROTEINE PRION

III-1 La protéine PrP

C'est la purification de fractions infectieuses à partir de cerveaux de hamsters infectés qui a permis la découverte de la protéine du prion ou PrP, protéine existant de manière naturelle chez l'hôte (PrP^c) et s'accumulant sous une forme pathologique (PrP^{sc}) au cours des ESST [297]. Encore aujourd'hui, la PrP pathologique représente le seul marqueur moléculaire de ces maladies.

III-1.1 Le gène codant la PrP

Le gène codant pour la PrP joue un rôle essentiel dans les maladies à prions. Ce gène a été décrit par l'équipe de Alan Dickinson dans les années 70 : baptisé *Sinc* (pour Scrapie incubation period), il a été décrit comme le principal responsable de la susceptibilité des animaux à l'infection. Par la suite, Oesch a isolé de façon plus précise le gène de la PrP chez le hamster [262]. Ce sont les travaux de Westaway [384] et Moore [243] qui ont permis de montrer que le gène *Prnp* et *Sinc* étaient identiques.

Ce gène est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme (*PRNP*), le chromosome 2 chez la souris (*Prnp*), le chromosome 13 chez l'ovine (*Prnp*) et est très conservé chez tous les mammifères [383], ce qui suggère une fonction essentielle pour ce gène. Récemment, un analogue conservé a été identifié en aval du gène *Prnp*, appelé *Prnd* et codant pour la protéine Doppel (acronyme de downstream prion protein-like gene) [244].

Le gène de la PrP est constitué de 1, 2 ou 3 exons suivant les espèces : 1 pour les primates non humains, le lapin et les oiseaux [122, 214], 2 pour l'homme (figure n°1) et le hamster [16, 208] et 3 pour la souris, le bovin et le mouton [168, 385]. Pour toutes les espèces, la phase ouverte de lecture du gène de 759 à 792 nucléotides est contenue en totalité dans le dernier exon qui est constitué d'environ 2000 nucléotides.

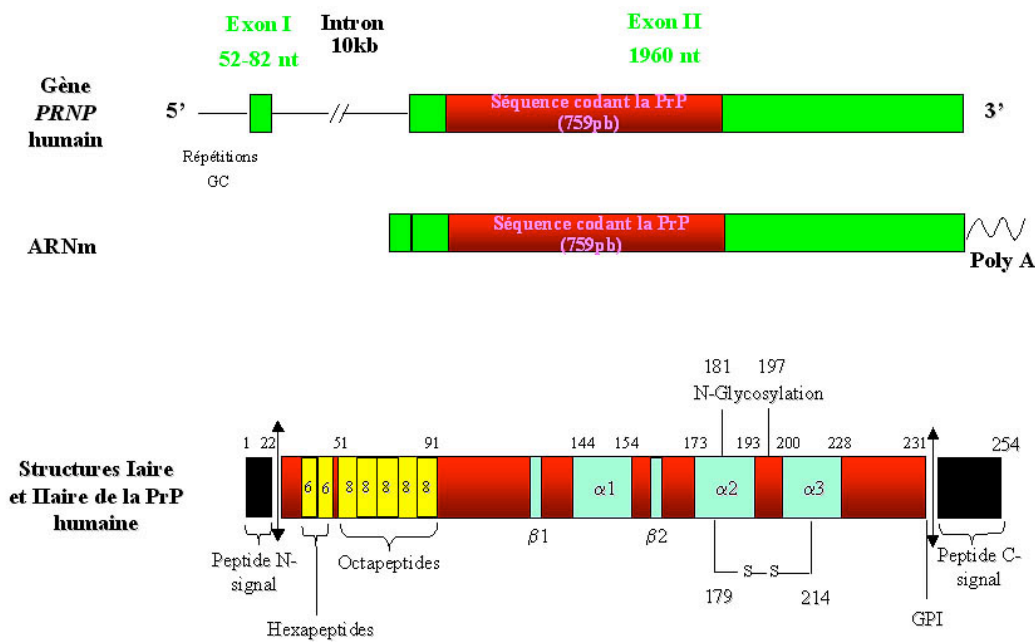


Figure n°1 : Représentation de la structure du gène, de l'ARNm messager et des structures primaires et secondaires de la PrP humaine (d'après Lee et al [204]).

Le gène ne possède pas de boîte TATA dans son promoteur mais des séquences riches en répétition G/C (4 motifs répétés CCGCCC), sites de fixation du facteur Sp1 caractéristiques des gènes de ménage. D'autres sites spécifiques pour AP-1 et AP-2 ont été identifiés [22, 223]. Cependant, il semble que d'autres séquences régulatrices restent à identifier puisque la PrP est exprimée de façon différentielle dans certains tissus et cellules et que les facteurs de transcription sus cités ne semblent pas impliqués dans une régulation tissu-spécifique [262]. Par ailleurs, la répression transcriptionnelle étant possible en ciblant Sp1 et l'activité du promoteur *Prnp* étant hautement dépendante de la structure de la chromatine [57], ces données indiquent que l'expression de la PrPc est régulée. De plus, la description de la présence de deux ARNm dans certains tissus périphériques chez le mouton (rate, rein, glandes surrénales) dont l'un résulterait d'une polyadénylation alternative [133] renforce l'idée d'une régulation de l'expression du gène *PrnP*.

III-1.2 Polymorphisme et mutations

Prnp est un gène peu polymorphe. Chez l'homme, le polymorphisme le plus connu se situe au niveau du codon 129 (méthionine ou valine) et semble associé à l'infection. En effet, l'homozygotie pour la méthionine au codon 129 représente 83% des cas de maladie de

Creutzfeldt-Jakob [148]. Un polymorphisme au niveau des codons 171 et 219 a également été décrit. De plus, des mutations ponctuelles et des insertions représentées sur la figure n°2 sont directement associées aux maladies humaines familiales (MCJ familiale, SGSS ou IFF).

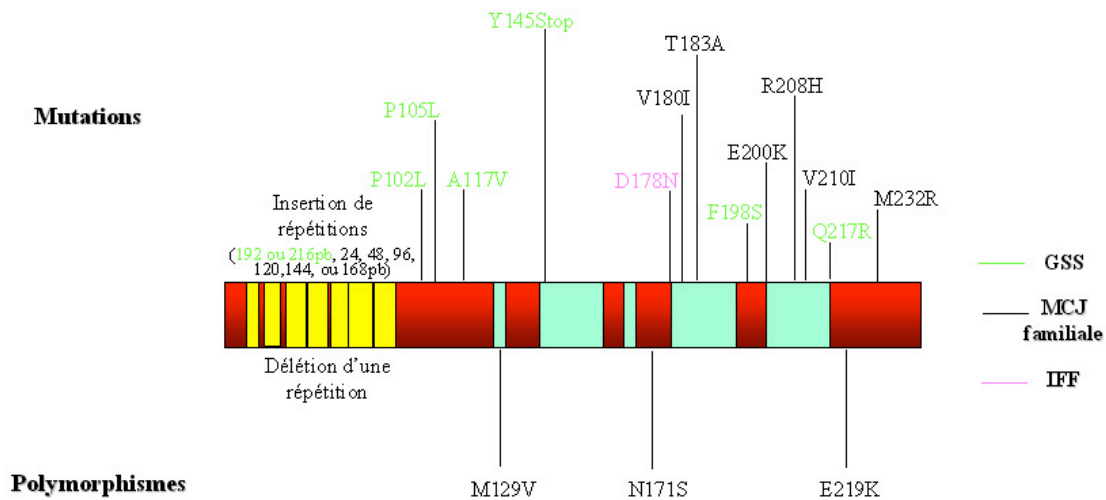


Figure n° 2: Position des différentes mutations et différents polymorphismes au niveau du gène *PRNP* humain (d'après [82] et [372]).

La manière dont des mutations dans le gène *PRNP* peuvent devenir pathogènes pour l'homme n'est pas encore résolue. Ces mutations entraîneraient une conversion spontanée de PrPc en PrPres avec une fréquence suffisante pour causer une ESST. Néanmoins, certains auteurs semblent plus réservés quant à cette hypothèse suggérant que ce phénomène ne peut pas être totalement attribué à une diminution de la stabilité thermodynamique de la PrP mutée [307, 352]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que lorsque l'on créait expérimentalement des mutations dans le gène *PRNP*, cela entraînait une neurodégénérescence sans nécessairement conduire à la présence de PrPSc [249]. Concernant le SGSS, la mutation la plus répandue est située au niveau du codon 102 (P102L) et pour l'IFF, c'est une mutation au niveau du codon 178 associée à une homozygotie pour la méthionine au codon 129.

Chez le mouton, le polymorphisme sur les codons 136 (Ala ou Val), 154 (Arg ou His) et 171 (Arg ou Glu) est aussi associé à une sensibilité ou une résistance plus importante.

III-1.3 Structure de la protéine PrP

Les formes pathologique et normale de la PrP possèdent la même structure primaire, mais diffèrent par leurs structures secondaires et tertiaires.

III-1.3.1 Structure primaire

Le gène *PRNP* code une protéine humaine de 254 acides aminés qui contient plusieurs domaines (figure n°1).

La séquence complète de la structure primaire de la PrP est composée de:

- un peptide signal de 22 acides aminés qui est rapidement clivé au niveau du réticulum endoplasmique dès le début de la traduction.
- une extrémité N-terminale (23-91) : cette région contient des répétitions d'octapeptides et d'hexapeptides qui sont clivées lors de la digestion partielle par la protéinase K. Elle contient aussi à ce niveau les sites de liaison au cuivre ou pour les glycosaminoglycannes (23-35).
- la région 91-135 : elle contient entre les acides aminés 115 et 135 une région hydrophobe très conservée entre les espèces qui comprend la séquence 110-135 correspondant au site d'insertion transmembranaire potentiel de la protéine (TM1). Ce site est précédé d'une séquence d'arrêt de transfert STE (Stop transfert effector) des acides aminés 104 à 112 qui permet l'arrêt de la translocation de la protéine native dans le réticulum endoplasmique avant l'insertion dans la membrane de la partie transmembranaire 110-135. Cette région contient également les acides aminés 106 à 126 dont le peptide correspondant a été fortement étudié en raison de ses propriétés neurotoxiques (pour revue, [116]).
- La région 136-231 : elle contient deux sites de N-glycosylation au niveau des acides aminés 181 et 197, sur lesquels différents N-glycans peuvent se positionner et sont responsables des trois états de glycosylation de la protéine (non glycosylée, mono ou bi-glycosylée). Il existe également plusieurs sites potentiels de O-glycosylation sur les Sérines et les Thréonines, mais à ce jour aucun O-glycan n'a été isolé sur la PrP. Cette région comprend aussi deux cystéines en position 179 et 214 permettant la formation d'un pont di-sulfure. C'est également dans cette région que se trouve le site de liaison (144-179) de la PrP au LRP/LR (Laminin Receptor Precursor) qui semble jouer le rôle de récepteur à la protéine [160] et intervenir dans l'endocytose de la PrP. Enfin, la Sérine en position 231 permet la liaison d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui autorise l'ancrage de la PrP au feuillet extracellulaire de la membrane plasmique [345].
- La région 232-253 : séquence C-terminale hydrophobe clivée lors de la maturation de la protéine qui sert de signal à l'addition du GPI sur la sérine 231.

III-1.3.2 Structures secondaire et tertiaire

Grâce au dichroïsme circulaire et à la spectroscopie infrarouge [65, 320], on a pu déterminer le pourcentage d'hélice α et de feuillet β . Malgré la variation des résultats due au caractère insoluble de la PrPSc, l'analyse a montré que la PrPc contenait une majorité d'hélice α (43%) contre 3% de feuillets β , tandis que la PrPSc et la PrP 27-30 (protéine PrP purifiée résistante à la protéinase K de masse molaire variant de 27 à 30 kDa) sont caractérisées par des taux d'hélices α et de feuillets β similaires (tableau n°1 et figure n°3)

	Hélices α (%)	Feuillets β (%)
PrPc	43	–
PrPSc	20	34
PrP27-30	29	31

Tableau n°1 : Composition en hélices α et feuillets β de la PrP cellulaire et pathologique

La PrP recombinante a été utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle de la partie C-terminale (121-231) de la protéine PrPc [170, 305]. Pour la PrP murine et humaine [306, 398] la structure de la PrPc consiste en 3 hélices α (144-154, 175-193, 200-218) et deux feuillet β antiparallèles (128-131 et 161-164). Près du petit feuillet β , le pont disulfure fait la connexion entre les hélices α 2 et 3. La région entre le feuillet β et l'hélice 2 (166-171) n'a pas pu être déterminée avec précision en raison d'une relative flexibilité. Cette région a pourtant une importance notable. En effet, des études notamment sur des animaux transgéniques avec des mutations dans cette région semblent indiquer que le phénomène de barrière d'espèce se situe dans cette région. La structure tridimensionnelle dépend également de la présence de groupes glycosylés pouvant se lier à la PrP (voir III-5) et la partie N-terminale au niveau des octapeptides peut lier des ions cuivre qui pourraient stabiliser la structure en hélice α [239].

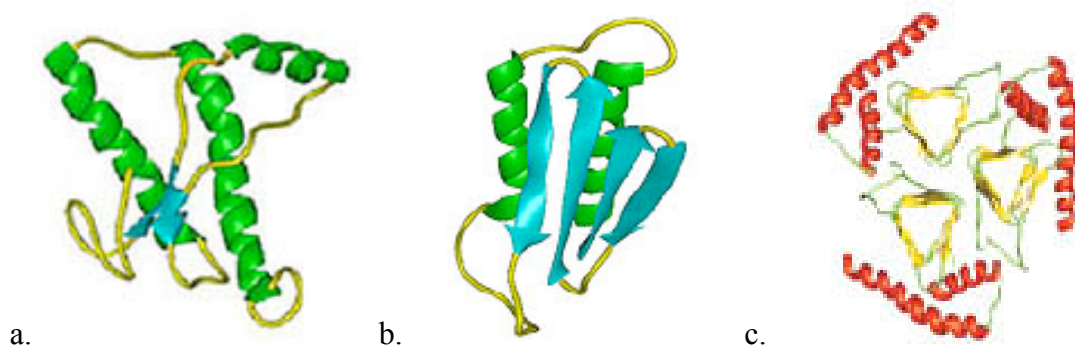


Figure n°3 : Structures tertiaires de la PrPc et PrPSc.

- a. Représentation de la structure tertiaire de la PrPc
- b. Représentation de la structure tertiaire de la PrPSc
- c. Représentation de la formation de trimères de PrPSc selon Govaerts et al [136].

Notons que cette structure tridimensionnelle de la PrPc par RMN est une structure monomérique. Or, plusieurs études ont montré que la PrP pouvait se dimériser par formation de ponts disulfures intramoléculaires ou intermoléculaires [171, 236].

Pour la PrPSc ou PrP 27-30, l'analyse par RMN ou rayons X n'est pas possible en raison de l'insolubilité de cette protéine. Des essais ont été réalisés pour développer un modèle de PrPSc [271]. Des modèles de PrPSc utilisant la structure de la PrPc modifiée (hélices α 2 et 3 sont inchangées. Ces modèles sont toutefois incomplets, puisqu'ils sont établis sur des molécules isolées alors que les PrPSc et 27-30 sont trouvées sous forme agrégées [389]. Les structures disponibles déduites des données de dichroïsme circulaire, de FITR et microscopie électronique indiquent que la PrP pathologique serait constituée de 2 hélices α et de 4 feuillets β [76, 159]. Par ailleurs, plusieurs études indiquent la formation de trimères [308, 389] conduisant à la fibrillation, par la présence d'hélices β selon Govaerts et al. [136].

III-2 Conversion de la PrPc

Les mécanismes qui sous-tendent la conversion de PrP cellulaire en PrP pathologique ne sont pas encore élucidés. Plusieurs hypothèses ont été émises sur la base de différentes observations.

III-2.1 Hypothèse du mécanisme hétérodimère

La propagation des prions s'établirait par interaction directe d'hétérodimères protéine normale/protéine pathologique qui causerait un changement de conformation de la protéine normale [76] (figure n°4). Ainsi, la PrPc, riche en hélice α , qui interagirait avec le prion serait dénaturée et se replierait en formant des feuillets β , donnant alors naissance à une nouvelle molécule de prion. Ce changement de conformation provoquerait alors une réaction en chaîne durant laquelle chaque nouvelle molécule de prion créée convertirait une autre molécule de PrPc. Les prions s'accumuleraient alors lentement dans le cerveau jusqu'à atteindre un point critique correspondant à l'apparition des symptômes caractéristiques des ESST.

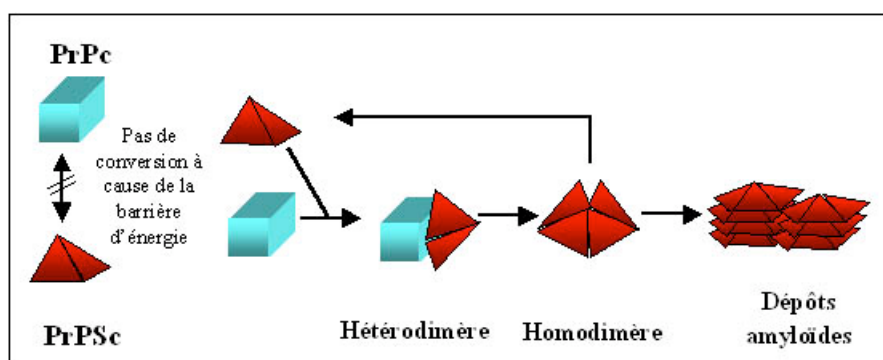


Figure n° 4: Modèle de la conversion conformationnelle par formation d'hétérodimères (d'après Aguzzi[4])

III-2.2. Hypothèse d'une autocatalyse coopérative

Les équipes de Eigen et Laurent ont proposé le mécanisme d'autocatalyse coopérative (figure n°5) durant laquelle un agrégat mixte de PrPres et de PrPsen se convertirait en agrégat de PrPres par des interactions allostériques [202]. Ce mécanisme avait déjà été décrit pour l'agrégation de la flagelline bactérienne [11]. Selon eux, le modèle proposé par Prusiner est trop lent pour arriver à l'état d'équilibre qui correspond à la pathogénèse. Dans ce modèle, la PrPres existerait sous différents états d'énergie libre correspondant à de la PrPres libre ou sous différentes formes d'agrégation.

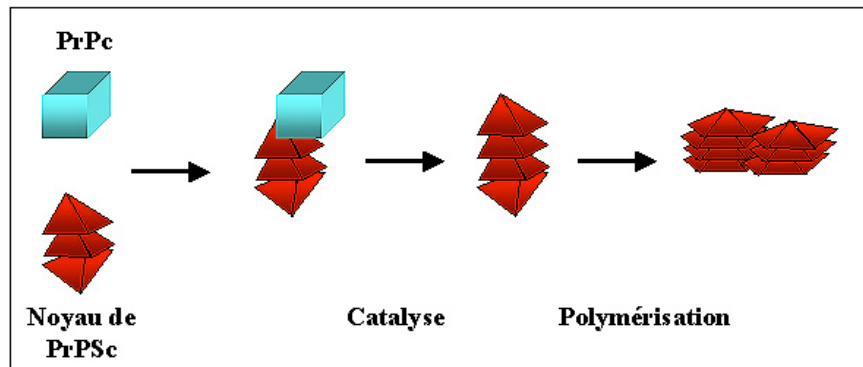


Figure n°5: Modèle de conversion par polymérisation autocatalytique (d'après Van Everbroeck, [366])

III-2.3 Hypothèse d'une polymérisation à partir d'un noyau de

nucléation

Caughey et d'autres groupes ont étudié la cinétique de la réaction de conversion. Ils ont constaté que la croissance exponentielle de la PrPSc présagée par le modèle d'hétérodimère de Prusiner ne pouvait être soutenue [157] et ont proposé le modèle d'une polymérisation à partir d'un noyau de nucléation (figure n°6).

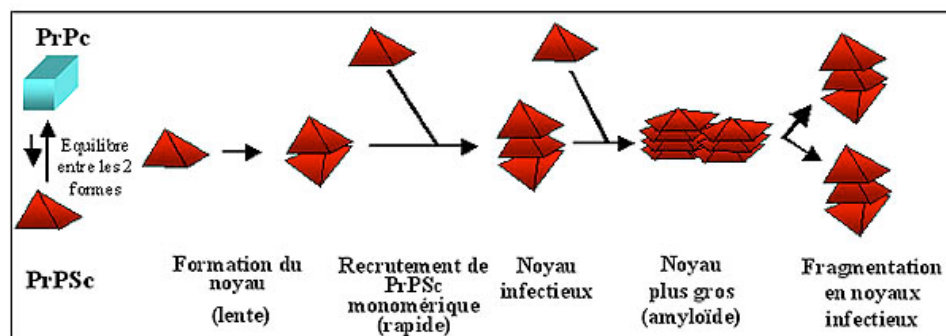


Figure n°6 : Modèle de conversion par la formation d'un noyau de nucléation (d'après Aguzzi[4])

Cette théorie postule que la PrPSc et la PrPc existent en solution dans un équilibre thermodynamique. La PrPSc monomérique est un constituant naturel des cellules alors que l'agent infectieux est multimérique, très ordonné en agrégats de PrPSc qui grossissent par recrutement de PrPSc monomérique environnante. L'infectiosité augmenterait quand les

agrégats de PrP^{Sc} deviendraient si gros qu'ils finiraient par se briser en petit noyaux, chacun d'entre eux étant capable de recruter de nouvelles molécules de PrP^{Sc} et agir comme une unité infectieuse. Les expériences de fragmentation des fibrilles amyloïdes par sonication ont par ailleurs montré que les petits fragments générés pouvaient eux-même augmenter la formation de noyau de nucléation [172]). Il a également été proposé dans un modèle dit non catalytique, que la PrP^c existerait en équilibre avec un intermédiaire thermodynamique de repliement PrP^{*}. Pour certains auteurs, le prion ne serait pas la PrP^{Sc} mais la PrP^{*} [321].

III-2.4 Hypothèse de la dimérisation

Selon Tompa, un point clé de la réplication des prions est la formation des ponts disulfures et la dimérisation. En effet, cet auteur, qui rappelle que le rôle de la dimérisation dans la propagation des prions avait déjà été évoquée très tôt par Dickinson et Outram en 1979 [92], propose un modèle d'après plusieurs études, montrant l'importance de la formation des ponts disulfure dans la genèse de la protéine pathologique [380]. Ce modèle est illustré par la figure n°7. Par ailleurs, les mêmes phénomènes de dimérisation ont été décrits chez les prions de levure [283], et dans la maladie d'Alzheimer [329].

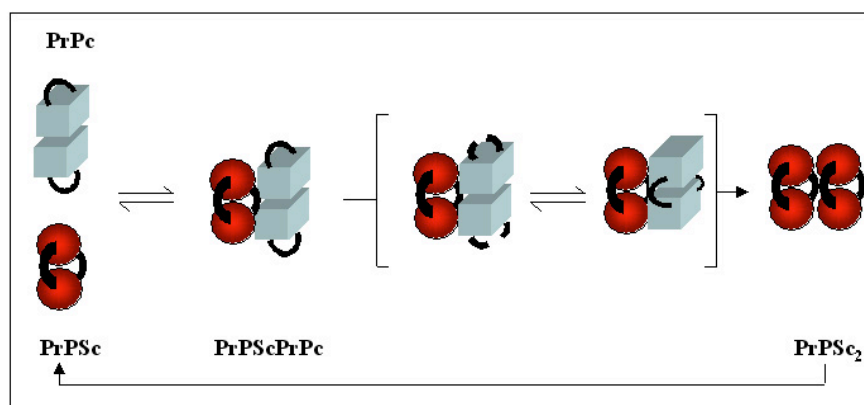


Figure n°7 : Modèle de réplication des ATNC selon P.Tompa basé sur la formation de dimère et du réarrangement des ponts disulfure [363].

III-2.5 Chaperonnes et formation de PrP^{Sc}

Le processus autocatalytique de conversion proposé par Prusiner a été critiqué en regard de la

forte improbabilité d'une interaction directe entre le monomère PrPc et le monomère PrPSc. De plus, les phénomènes qui sous-tendent la capacité ou non pour une souche de prion donnée d'infecter une espèce et pas une autre restent encore très mal connus. Les chaperonnes sont des protéines qui, en se liant à leur substrat, facilitent le repliement de polypeptides durant leur biosynthèse, leur transport dans les organelles et qui empêchent l'agrégation des protéines suite à un stress cellulaire [145]. On les trouve dans divers compartiments cellulaires et notamment dans le réticulum endoplasmique (RE) où se passe une partie du trafic de la PrP. Plusieurs auteurs ont proposé un rôle critique des chaperonnes dans la formation de PrPSc [379]. En 1995, l'équipe de Telling a proposé que le phénomène de barrière d'espèce résulterait d'une macromolécule spécifique d'espèce encore inconnue, désignée « protéine X », participant à la genèse des prions [360]. L'équipe de Kaneko a montré que la facteur X se liait à l'extrémité C terminale de la PrPc [177]. Si ces chaperonnes étaient spécifiques d'un type cellulaire donné, ceci pourrait expliquer la propagation sélective des prions dans des populations neuronales distinctes et certains types de cellules périphériques telles que les cellules du système lymphoréticulaire. La mise en évidence la plus directe de l'intervention des chaperonnes dans la genèse de PrPSc a été donnée par des travaux montrant que la chaperonne de levure Hsp104 et la chaperonne bactérienne GroEL pouvaient stimuler la formation de PrPSc dans un système de conversion *in vitro* acellulaire [70]. En revanche, les chaperonnes Hsp70 et Hsp60 semblent jouer un rôle inhibiteur de l'agrégation des prions. Il reste désormais à déterminer si de telles chaperonnes existent chez les mammifères, si celles-ci peuvent interagir avec la PrP *in vivo* et dès lors, si une altération de ces molécules pourrait affecter la génération de PrPSc.

III-3 Biosynthèse et localisation cellulaire de la PrP

La PrP est localisée à la surface des cellules où elle ancrée dans la membrane plasmique par son extrémité C-terminale liée à une ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositolphosphate) [345]. Comme toutes les autres protéines membranaires et secrétées, la PrPc est dirigée vers le réticulum endoplasmique (RE) par le peptide signal où la protéine subit des modifications post-traductionnelles, par l'addition de glycannes, de l'ancre GPI et de la création d'un pont disulfure [141, 365]. La plupart des molécules de PrPc sont transportées au niveau de la surface des cellules neuronales et non neuronales, où la protéine se localise au niveau de microdomaines résistants aux détergents (DRM) riches en sphingolipides appelés « rafts » [252] domaines décrits comme lieu de conversion de la PrPc en PrPres [175, 357]. Par

ailleurs, il existe deux autres formes transmembranaires de la PrPc, PrP^{Ctm} ou PrP^{Ntm} [149]. PrP^{Ctm} dont le peptide signal n'est pas clivé semble se localiser dans le RE [346] et a été proposée pour intervenir dans les mécanismes de la pathogénèse [149].

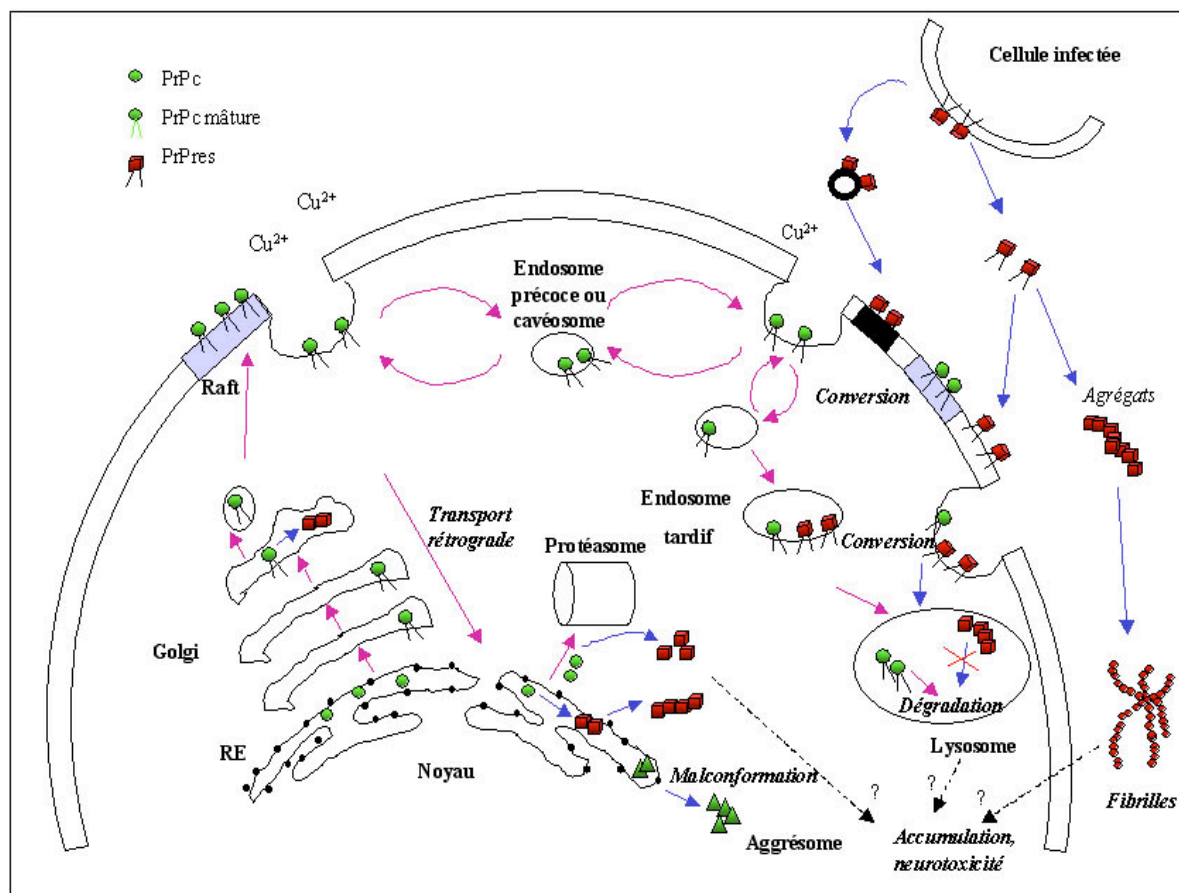


Figure n°8 : Trafic intracellulaire de la PrPc et PrPsc (d'après Collins et al. [82] et Nunziante et al [261])

Une fois à la surface, toutes les molécules de PrP ne restent pas localisées à ce niveau de la cellule (figure n°8). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence le recyclage de la PrP [143] vers un compartiment d'endocytose soit via les vésicules de clathrine [144] soit par l'intermédiaire de structures moins classiques appelées caveoles [284]. En réponse au cuivre, la PrP internalisée est retrouvée au niveau périnucléaire colocalisée avec des marqueurs des endosomes tels que la transferrine, FM4-64 et Rab5 [203, 222]. La partie N-terminale de la PrP est une région essentielle pour l'efficacité de l'endocytose par la clathrine. En effet, la PrP délétée pour cette région s'accumule dans la membrane plasmique et le transfert de la région N-terminale de la PrPc sur la protéine Thy1, une autre protéine à GPI fortement représentée dans les neurones, lui confère la capacité à entrer dans les vésicules de clathrine [349]. Le recrutement des vésicules de clathrine dans l'endocytose de la PrP est étonnant puisque, comme les autres protéines à GPI, la PrP ne possède pas de domaine cytoplasmique

pouvant interagir directement avec la clathrine. L'équipe de Harris a donc postulé l'existence d'un récepteur à la PrPc qui serait une protéine transmembranaire possédant ce signal de localisation dans son domaine cytoplasmique et dont l'extrémité N-terminale interagirait avec la PrPc. Les candidats pourraient être le récepteur à la laminine LRP/LR [124] ou bien la protéine Stp1 [399].

L'internalisation des protéines par l'intermédiaire des caveolae a été suggérée pour orienter les protéines à GPI vers un système différent du système classique endosome/lysosome [7]. Les caveolae sont des invaginations recouvertes d'une protéine appelée caveoline. Certaines protéines à GPI ont été décrites pour « utiliser » des organites endosomaux recouverts de cavéoline (cavésomes) [256]. Cependant, jusqu'à aujourd'hui on n'a jamais pu montrer la présence de cavéoline dans les neurones. Il est donc difficile d'affirmer l'utilisation des caveoles pour l'internalisation de la PrPc dans les cellules neuronales [332].

Il existe encore peu d'informations concernant le mécanisme par lequel la PrPSc est captée par les cellules durant les premières phases de l'infection. La conversion de la PrPc en PrPres pourrait se situer au niveau des DRM [14, 325], du réticulum endoplasmique [169] ou des voies d'endocytose. Les études qui ont permis d'émettre l'idée des rafts comme site de conversion viennent de l'inhibition de la formation de PrPSc après déplétion en cholestérol cellulaire induisant la destruction des rafts [357]. La colocalisation de PrPSc avec des marqueurs des endosomes et des lysosomes dans des cellules ScN2a a conduit à l'hypothèse de la conversion au niveau des voies d'endocytose [10]. Le protéasome et le transport rétrograde de la PrPc à travers le Golgi ont également été proposés pour jouer un rôle dans la pathogénèse. En effet, des protéines incorrectement assemblées ou conformées sont retenues au niveau du RE et soumises à la voie de dégradation appelée ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) incluant une translocation à travers la membrane du RE vers le cytosol puis le protéasome. Lorsqu'on inhibe la fonction du protéasome avec des inhibiteurs spécifiques, la PrP s'accumule dans le cytosol sous forme d'une molécule mal conformée partiellement résistante à la PK, pouvant en plus promouvoir la transconformation de molécules de PrPc nouvellement synthétisées [217, 397]. Ces résultats démontrent que la PrPc à elle seule a la capacité de promouvoir sa propre transconformation.

III-4 Fonctions de la PrPc

Encore aujourd'hui, la ou les fonctions de la PrPc restent encore une énigme. Cette protéine exprimée de façon élevée dans le cerveau et qui est identifiée comme élément clé des maladies à prions ne paraît pourtant pas indispensable ni à la survie ni au développement des souris transgéniques Zurich I (*PrnP* 0/0) et Edinburg (*PrnP*-/-) [225] pour lesquelles l'expression de la protéine PrPc a été invalidée par ablation ou interruption de l'ORF de la PrP [54]. Néanmoins, les études de Weissmann ont montré que les souris Nagasaki PrP knock-out souffraient de dysfonction cérébelleuse et d'une perte des cellules de Purkinje, ceci en raison de la surexpression du gène *Doppel* [378].

Ce sont surtout les études concernant les molécules interagissant avec la PrP qui ont conduit à diverses hypothèses sur les fonctions potentielles de cette protéine.

III-4.1 Signalisation

Plusieurs études ont conduit à l'hypothèse que la PrPc pourrait jouer un rôle dans la transduction de signal en se liant à différents partenaires conduisant ainsi à diverses fonctions, telles que la survie cellulaire, la différenciation ou l'adhésion cellulaire.

III-4.1.1 Survie cellulaire

Le rôle de la PrPc dans la survie cellulaire a été émis en raison de son interaction avec Grb2 [342] impliquée dans l'activation des MAP kinases Erk1,2 [69, 358]. La liaison de la PrPc avec des anticorps, des peptides ligands ou bien le ligand de surface STI-1 (Stress inducible protein) conduit à l'activation à la fois de l'AMPc intracellulaire dépendant de la protéine kinase A et des voies de signalisation Erk [74] conduisant à un effet cytoprotecteur.

La PrPc peut aussi se lier au facteur anti-apoptotique Bcl2 [194] et protéger des neurones primaires humains contre la mort cellulaire induite par Bax à des niveaux équivalents à la fonction neuroprotective de Bcl2 [38]. De la même façon, la plus forte sensibilité à une privation de sérum de neurones primaires isolés de souris *PrnP*0/0 comparativement à des neurones *PrnP*+/+ peut être contournée par la surexpression de Bcl2 ou de PrP [195].

Par ailleurs, la perte de l'activité antioxydante médiée par la PrPc pourrait être en partie impliquée dans les maladies à prions [392]. La PrPc liée au cuivre possède une activité

superoxyde dismutase [43] et des neurones *PrnP0/0* sont plus sensibles au stress oxydatif que des neurones *PrnP+/+* [40]. Néanmoins, la surexpression de PrPc a aussi été décrite pour sensibiliser des cellules à la mort cellulaire induite par la staurosporine et augmenter l'activité de la caspase 3, enzyme impliquée dans la voie apoptotique [269]. De plus, la PrPc cytosolique qui s'accumule anormalement consécutivement à un dysfonctionnement du protéasome montre une plus forte résistance aux protéases et une toxicité accrue [218].

III-4.1.2 Adhésion

Plusieurs données indiquent que la PrPc peut jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire. D'une part, la PrPc est un récepteur à haute affinité pour la laminine [137]. En se liant à ce partenaire, la PrPc affecte à la fois l'adhésion cellulaire neuronale mais aussi la formation de neurite [137] en raison de sa liaison au niveau d'un domaine connu pour médier la croissance des neurites [210]. D'autre part, l'interaction de la PrPc avec la tyrosine kinase p59fyn elle-même impliquée dans la croissance neuritique par l'intermédiaire de N-CAM [247] et l'interaction directe de la PrPc avec N-CAM [327] semblent confirmer un potentiel rôle de la PrPc dans l'adhésion cellulaire. Par ailleurs, le LRP peut se lier à la PrPc présente sur d'autres cellules contribuant ainsi à la communication intercellulaire et à la survie, et peut aussi lier la PrPres ce qui lui confère un rôle dans la propagation de l'infectiosité. Cette interaction entre ces deux partenaires s'établit par l'intermédiaire des GAGs et notamment des héparanes sulfates [160] qui ont été largement décrits pour intervenir dans l'adhésion cellulaire. Il est donc aisé de penser que cette interaction pourrait également jouer un rôle dans l'adhésion (le rôle des GAGs dans les maladies à prions sera développé en III-5).

III-4.2 Fonction synaptique

L'absence de PrPc au niveau des synapses conduit à une altération de la formation des synapses et du rythme circadien. Ces analyses ont permis de suggérer que cette protéine pouvait être impliquée dans le système neurotransmetteur et la modification de l'activité neuronale au niveau du SNC [77, 324]. La capacité de la PrP à activer la protéine kinase fyn [247] trouvée abondamment dans les synaptosomes du cerveau et impliquée dans la potentialisation à long terme [138], semble indiquer que la PrPc pourrait jouer un rôle dans la fonction synaptique.

III-4.3 Transport du cuivre

La PrPc peut interagir avec le cuivre par une faible affinité moléculaire et de manière pH dépendante au niveau N-terminal par l'intermédiaire des histidines présentes dans la région octapeptide PHGGGWGQ répétée 4 fois [370]. Une des observations clé indiquant un rôle potentiel de la PrPc dans le transport du cuivre vient de l'étude montrant que le cuivre stimule fortement l'endocytose de la PrPc [279] retrouvée au niveau des endosomes précoces, une partie du Golgi et probablement d'autres organites [222]. Des souris dénuées de PrPc montrent une concentration 50% plus faible de cuivre dans les fractions synaptosomales et subcellulaires endosomales comparativement à des souris sauvages pour la PrPc [192], une réduction de l'activité superoxyde dismutase liée au cuivre/zinc ainsi qu'une altération des réponses physiologiques en présence d'un excès de cuivre [42].

III-5 Glycosylation et PrP

III-5.1 Glycosylation de la PrP

III-5.1.1 N-Glycosylation

La PrP possède deux sites potentiels de N-glycosylation (Asn181IleThr et Asn197PheThr chez l'homme), plusieurs sites potentiels de O-glycosylation et une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) (figure n°9).

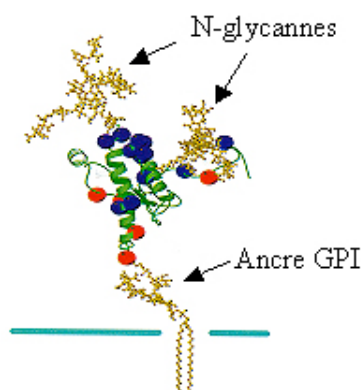


Figure n°9 : Représentation de la position des N-glycannes et de l'ancre GPI sur la PrP (d'après Rudd et al. [314]).

A ce jour, seuls les sites de N-glycosylation ont été décrits comme étant variablement occupés. Alors que plusieurs sites apparaissent comme potentiellement accessibles pour la O-glycosylation (au niveau des sérines (Ser) et des thréonines (Thr) , aucun O-glycan n'a été à ce jour détecté ni dans la PrPc extraite de cerveau de hamster syrien, ni dans de la PrP27-30 isolée de cerveaux de hamsters infectés par l'agent de la tremblante du mouton. Néanmoins, ces résultats n'excluent pas la possibilité d'une population mineure de PrPc O-glycosylée non détectée à ce jour. En effet, l'équipe de Chen a montré que lorsqu'on ajoutait un résidu de N-Acétylgalactosamine O-lié sur la sérine Ser¹³⁵ du peptide 108-144 connu pour intervenir dans le changement conformationnel durant la conversion de la PrP, cela entraînait la suppression de la formation de plaques amyloïdes alors que la même addition sur la sérine Ser¹³² a l'effet inverse [68].

La glycosylation de la PrP s'effectue après clivage du peptide signal dans le RE par l'ajout de N-glycans riches en mannose (Glc3-Man9-GlcNAc2). Dans le même temps, un pont disulfure est formé et une ancre GPI est ajoutée après clivage du peptide signal C-terminal (C-ter 231-254). Les deux sites de N-glycosylation sont variablement occupés [347] laissant place à trois glycoformes de la protéine : non glycosylée, mono-glycosylée (29-30kDa) et bi-glycosylée (33-35kDa). L'étude menée par Monnet et al. [241] a par ailleurs montré que la PrPc était plus ou moins glycosylée selon le type de modèle cellulaire considéré.

Les études concernant la comparaison de la glycosylation de la PrPc et la PrPres ont montré dans le cerveau de hamster syrien infecté, plus de 50 motifs glycaniques sur les deux sites de N-glycosylation, aussi bien sur la PrPc que sur la PrPSc [273, 313]. Ces motifs contiennent du galactose, de la N-acétylglucosamine, du fucose et de l'acide sialique. Un fort taux de sialylation et des structures biantennées typiques ont été décrits sur la PrPc isolée du cerveau, ainsi que des épitopes Lewis X et sialyl Lewis X [347] considérés comme molécules de reconnaissance intercellulaire dans le développement du SNC [310]. Par ailleurs, l'étude de Rudd et al. montre une plus forte proportion de glycannes complexes de type tri et tétraantennés dans la PrPSc comparativement à la PrPc. Cette modification indique une importante perturbation du mécanisme de glycosylation de la PrP en présence de la protéine mal conformée, associée, selon les auteurs, à une diminution de l'activité de l'enzyme GnTIII (N-acétylglucosaminyltransférase III) [313, 347]. Une corrélation entre une perturbation de la machinerie de glycosylation et une pathologie a déjà été montrée dans de nombreuses maladies et notamment dans l'arthrite rhumatoïde [276] lors de laquelle on a également montré une altération de l'activité GnTIII. L'impact de la N-glycosylation sur la PrP est variable : elle peut agir sur la structure, la localisation membranaire et le trafic de la protéine. Elle pourrait intervenir dans la transconformation de la PrPc, dans la propagation de l'agent

infectieux, dans la notion de souche et dans les processus d'interaction entre la PrP, la matrice extracellulaire et d'autres ligands.

III-5.1.2 Glycosylation et repliement de la PrP

Généralement, l'addition de N-glycannes permet un bon repliement des protéines *in vitro* et *in vivo* [166].

Des simulations de la dynamique moléculaire de la région C-terminale de la protéine PrP humaine (90-230) avec ou sans N-glycannes et une ancre GPI ont montré que l'ancre GPI permettait une grande flexibilité de la PrP par rapport à la membrane [402]. Par ailleurs, il a été décrit que la PrPc glycosylée était co-immunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre des protéines telles que la PDI, grp94, la calnexine, la calreticuline, les protéines chaperones associées au RE intervenant dans le repliement, alors que la PrP non glycosylée est retrouvée associée uniquement avec grp94, ce qui semble indiquer que les sucres et les chaperones doivent avoir un rôle dans le repliement conformationnel de la PrP [58].

La N-glycosylation influence la topologie de la PrP, l'inverse est également vrai. En effet, Walmsley a montré que contrairement aux autres formes de PrP, les formes PrP Nterm ou tronquée sans GPI sont non glycosylées, ce qui semble indiquer que l'ancre GPI et l'ancrage Cterm à la membrane sont nécessaires à la N-glycosylation de la PrP [374].

III-5.1.3 Glycosylation et localisation de la PrP

La présence d'un GPI permet l'ancrage de la PrPc à la membrane au niveau de structures semi-organisées appelées « rafts » riches en sphingolipides et stérols [368]. La PrP est rapidement endocytosée, par liaison à un récepteur d'endocytose transmembranaire [334], aux puits recouverts de clathrine [221] ou aux cavéoles [368]. Contrairement à la PrPc, la PrPsc est partiellement résistante aux protéases dans la voie endosomale et s'accumule dans les lysosomes. On a pu montrer qu'une forme mutante de la PrPc non glycosylée était résistante à la dégradation dans les endosomes, ce qui semble suggérer un rôle de la glycosylation dans les processus de dégradation de la protéine [58].

Il a également été rapporté une localisation nucléaire de la PrPc [316] qui interagit avec deux lectines nucléaires, la galectine 3 et CBP70 respectivement spécifiques du galactose et de la N-acétylglucosamine. La PrPc glycosylée nucléaire montre une maturation golgienne ce qui pourrait indiquer un transport rétrograde, transport décrit par l'équipe de Lehmann comme

étant impliqué dans l'accumulation de PrPSc dans les cellules [30]. Depuis la description par l'équipe de Liu de la nécessité du GPI dans le transfert intercellulaire de la PrPc après activation cellulaire [213], le rôle de la glycosylation dans les processus de propagation de l'agent infectieux est proposé, bien qu'il reste encore à déterminer si la PrPSc peut elle aussi être transloquée de cellule à cellule selon un processus similaire.

III-5.1.4 Glycosylation et conversion PrPc/PrPres

En général, la glycosylation augmente la stabilité des protéines [395]. Ceci impliquerait donc que la forme biglycosylée de la PrP soit plus stable que les formes mono et non glycosylées et ainsi l'occupation des 2 sites de N-glycosylation augmenterait la barrière d'énergie libre pour atteindre l'état intermédiaire nécessaire pour la conversion. La forme biglycosylée de la PrPSc extraite du vMCJ est la forme la plus abondante et la forme non glycosylée de la protéine est beaucoup moins présente que toutes les autres souches de MCJ. Ceci pourrait en partie expliquer le caractère exceptionnel de cette variante de la maladie. In vitro, si la N-glycosylation est inhibée, la PrPSc est produite plus rapidement [206]. Le même effet a été obtenu quand les sites de glycosylation de la PrP ont été délétés [188]. Par ailleurs, une mutation du gène entraînant une substitution au codon 183 et inhibant la glycosylation à ce site est liée à une forme familiale de la maladie [260], cependant ces résultats doivent être pris avec précautions puisque l'équipe de Capellari a montré que l'origine de la maladie serait non pas le manque de glycannes lui-même, mais la conséquence des substitutions des acidesaminés [59]. Enfin, les expériences de conversion dans un système acellulaire ont permis de montrer l'influence des carbohydrates sur la conversion puisque l'élimination des N-glycannes de la PrPc a montré une meilleure conversion en PrPres, tandis que la présence de l'ancre GPI semble bénéfique pour la genèse de protéine PrPSc [294]. La différence de sensibilité des souris différemment mutées sur l'un ou l'autre site de N-glycosylation pourrait être liée à une distribution différente des PrP mutées [86]. Chez la souris sensible à l'infection, la PrP mutée au niveau de l'Asn197 est retrouvée dans tous les compartiments neuronaux, alors que la PrP sauvage n'est généralement retrouvée qu'au niveau des dendrites mais pas dans les corps cellulaires. A l'opposé, la PrP mutée au niveau de l'Asn181 qui entraîne une résistance à l'infection, s'accumule dans les corps cellulaires en inhibant ainsi son transport par les cavéoles le long des neurites et des dendrites. L'équipe de Soto a, quant à elle, montré des modifications de la distribution et des glycoformes de la PrP au cours de l'infection de souris par la tremblante [315]. L'étude de Bosques a montré que la N-

glycosylation sur l'Asn 181 permettait de réduire significativement la fibrillation du peptide 175-195 de la PrP humaine [37], ceci en permettant la formation de pont disulfure via la Cystéine 179 qui stabilise la protéine.

III-5.1.5 Glycosylation et typage de souche

La mise en évidence de différences précises et reproductibles dans la période d'incubation, les signes cliniques, la vacuolisation et les dépôts de PrPres dans le cerveau a conduit à la notion de souches de prions [52]. Les souches se distinguent sur gel SDS PAGE par les différences dans les fragments de PrPSc produits après clivage par la PK, qui reflètent eux-mêmes une diversité dans la conformation, le ratio de glycoformes, l'état polymérique et l'association à des ligands [79, 312]. Ce sont les différences de N-glycosylation qui permettent de classer les souches de MCJ selon 4 types [178] (Tableau n°2).

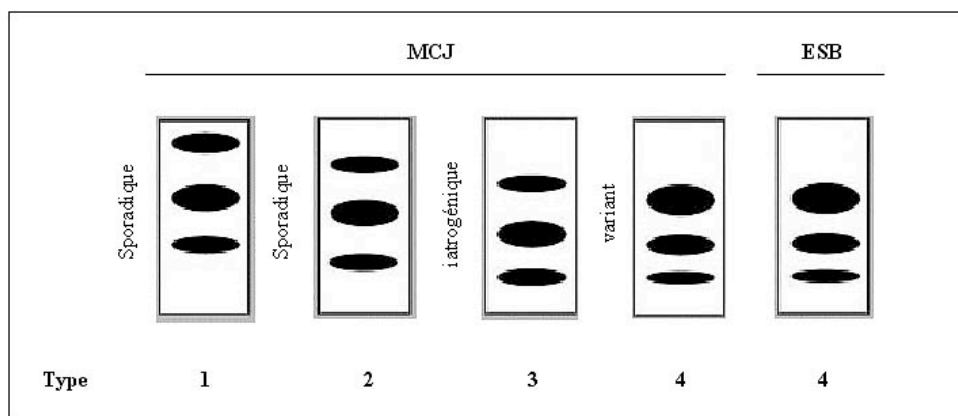


Tableau n°2 : Représentation des profils de migration sur gel des 4 types de souches identifiées dans la MCJ et l'ESB (d'après [104])

Cependant, le profil de glycoformes à l'intérieur d'un type donné, révélé par électrophorèse à une dimension (1D), pourrait posséder des structures plus complexes. Ainsi, l'analyse par gel à deux dimensions a montré qu'à l'intérieur même de la PrPSc extraite de cerveau de patient IFF et MCJ sporadique, qui sont indistinguables par gel 1D (toutes deux du type 2), on détectait deux patterns de N-glycans [272], ce qui a permis de montrer que des différences qualitatives dans les N-glycans étaient à l'origine de souche de prion différentes. C'est aussi ce qui a permis récemment de mettre en évidence une nouvelle souche d'ESB [60]. La très bonne conservation chez chaque espèce des profils de lésion que l'on établit pour chaque souche, semble supporter l'hypothèse qu'une glycosylation associée pour chaque souche doit diriger la PrPSc vers des sous-populations neuronales portant une PrPc possédant un profil de

glycosylation très proche [79]. D'autre part, l'équipe de Priola a montré que la glycosylation de la PrPc pouvait fortement orienter la formation interspèces de PrPSc en influençant la quantité de PrPc liée à la PrSc tandis que la séquence en acides aminés influence la quantité de PrPSc générée durant l'étape de conversion [294].

III-5.2 Interactions de glycanes exogènes avec la PrP

Les glycosaminoglycannes (GAGs), tels que les héparanes sulfates, qui font partie de la matrice extracellulaire [142] et représentent la majorité des GAGs présents dans le cerveau, ont été trouvés associés aux plaques amyloïdes dans les maladies à prions et d'Alzheimer [338]. Plusieurs études ont permis de suggérer que la PrPc devait interagir avec les GAG et que les GAGs devaient intervenir sur le métabolisme des prions. L'administration de glycanes sulfatés permet de prolonger la période d'incubation chez des animaux infectés par la tremblante [102, 181] et leur addition à la fois dans des cultures cellulaires et dans des expériences de conversion permet d'influencer l'accumulation de PrPsc [63, 393]. Récemment, des mimétiques d'héparanes sulfates ont montré une très bonne efficacité vis-à-vis de l'accumulation de PrPres, à la fois *in vitro* et *in vivo* [2]. Le marquage immunohistochimique de cerveaux de patients MCJ et d'animaux infectés montre une colocalisation des GAG avec la PrPSc [339]. Plusieurs sites de liaison à l'héparine et aux héparanes sulfates ont été identifiés dans la PrPc. Les résidus 23-35 contenant les 4 motifs basiques KKRPK représentent un premier site de liaison de la PrP avec les GAGs probablement par l'intermédiaire de charges sulfates négatives, liaison stimulée par le Cu^{2+} et le Zn^{2+} [274]. L'équipe de Warner a permis d'identifier deux autres sites de liaison des GAG sur la PrP recombinante : 53-93 et 110-128 [375]. Cette liaison de la PrP avec les GAGs, qui peuvent induire son internalisation [333], a permis d'émettre l'hypothèse que les glycanes doivent exercer leur activité anti-prion par compétition avec les GAGs endogènes [121]. Les GAGs permettent aussi de réduire le pool de PrPc disponible pour la conversion [333] mais peuvent aussi la stimuler [393].

Comme il a été décrit pour d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et après lésion du SNC [400], on observe dans les maladies à prions une modification de la quantité de GAG dans le cerveau d'animaux infectés par la BSE avec une diminution de 40% de la quantité de GAG comparativement aux animaux sains [275] indiquant une profonde modification de la synthèse ou des processus de dégradation de ces sucres.

IV- LES ENCEPHALOPATHIES SUBAIGUËS SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES ET LEUR MODE DE PROPAGATION

IV-I Les différentes ESST

Les ESST peuvent être classées en ESST animales (tableau n°3) et ESST humaines (tableau n°4).

MALADIES ANIMALES	HOTE	PREMIERE OBSERVATION
Tremblante	Mouton	Vers 1730
Tremblante	Chèvre	?
Encéphalopathie spongiforme du vison	Vison	1947
Maladie du dépérissement chronique	Wapiti et cerf-mulet des Rocheuses	1967
Encéphalopathie Spongiforme Bovine	Bovin	1985
Encéphalopathie Spongiforme des ruminants sauvages en captivité	Nyala	1986
	Gemsbok	1987
	Elan du Cap, oryx d'Arabie, grand Koudou	1989
Encéphalopathie spongiforme féline	Chat	1990
Encéphalopathie Spongiforme	Guépard, puma	1992
Encéphalopathie spongiforme	Mouflon	1992

Tableau n°3 : Les différentes ESST animales et leur première observation (d'après Deslys et Picot[90])

MALADIES HUMAINES	HOTE	PREMIERE OBSERVATION
Kuru Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker (SGSS) Insomnie Fatale Familiale (IFF) Variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ)	Homme	Vers 1900 1920 1926 1992 1996

Tableau n°4 : Les différentes ESST humaines et leur première observation

IV-1.1 Les ESST animales

La tremblante du mouton est l'ESST la plus anciennement connue puisqu'elle a été décrite pour la première fois au Royaume-Uni sous le terme de « scrapie » (du verbe *to scrap* signifiant gratter) en 1732 [278]. Le caractère de transmissibilité des ESST à la fois horizontale et verticale, indiquant la capacité des agents étiologiques de ces maladies à franchir la barrière d'espèce, a par ailleurs été décrit pour la première fois chez la tremblante par les deux vétérinaires Cuillé et Chelle en 1936 [83]. Le polymorphisme du gène *Prnp* ovin au niveau des codons 136 (Ala ou Val), 154 (Arg ou His) et 171 (Gln ou Arg) a conduit à la mise en évidence de marqueurs de susceptibilité suivant que les animaux sont homozygotes ou hétérozygotes pour certains de ces codons.

L'autre ESST animale à laquelle on porte un intérêt tout particulier est l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) qui a touché une grande partie du cheptel bovin en Europe. En effet, cette maladie diagnostiquée pour la première fois en 1986 au Royaume-Uni a vu son nombre de cas évoluer en Grande-Bretagne de 446 en 1987 à plus de 180000 en 2003. Aujourd'hui, bien que l'origine exacte de la contamination ne soit pas encore élucidée, la communauté scientifique, sur la base de nombreuses études épidémiologiques, s'accorde à dire que cette maladie est la conséquence de la consommation de compléments protéiques issus de farines de viandes et d'os contaminés insuffisamment chauffés.

IV-1.2 Les ESST humaines

La première maladie à prions humaine décrite est la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) en 1920. Les MCJ les plus courantes peuvent avoir trois origines différentes : sporadique (aucune cause identifiée) familiale (mutations sur le gène *PRNP*) ou iatrogénique (exposition à l'agent infectieux). Le tableau clinique typique de ces maladies est représenté par une démence progressive rapide suivie d'une myoclonie et d'une ataxie. De façon générale, la mort survient moins d'un an après l'apparition des premiers signes.

- La MCJ sporadique est la plus courante, elle représente plus de 85% des cas de MCJ qui sont homozygotes au codon 129 du gène de la PrP [270], alors que dans la population générale en Europe ce génotype représente un pourcentage moindre (tableau n°5) [80, 250]. Il semblerait donc que les individus homozygotes aient un risque plus élevé de développer une MCJ sporadique que les hétérozygotes.

	Met/Met	Met/Val	Val/Val
Population normale	39%	50%	11%
MCJ sporadique	68%	15%	18%
MCJ reliée à hGH	48%	20%	32%
nvMCJ	100%	-	-

Tableau n° 5: Comparaison des génotypes au codon 129 dans la population normale et pour les différentes MCJ (d'après [388])

- La MCJ familiale représente environ 14% des cas de MCJ [391]. Elle se transmet selon un mode autosomal dominant et elle est associée à des mutations du gène *PRNP*.

- Depuis la première mise en évidence d'une transmission iatrogénique de la MCJ en 1974, par transplantation de cornée, d'autres mécanismes ont été identifiés, tels que la transmission par des instruments chirurgicaux, des électrodes, les hormones pituitaires et les greffes de dure-mère (voir tableau n°6). Toutes ces transmissions résultent d'une contamination croisée avec du matériel provenant de cerveau dont les taux d'infectiosité devaient être élevés.

	Hormones pituitaires	Dure-mère	Cornée	Neurochirurgie
Etats-Unis	26	3	1	–
Royaume-Uni	46	7	–	3
France	100	9	–	–
Allemagne	–	4	1	1
Japon	–	113	(1)	–
Autres	10	24	–	–

Tableau n°6: Répartition mondiale et selon l'origine, du nombre de cas de MCJ iatrogènes (d'après Brown P[51]).

- Jusqu'en 1996, date à laquelle le variant de la MCJ a été identifié, le kuru était le seul exemple d'une ESST humaine acquise par ingestion de tissu infectieux. Cette maladie dont 75% des cas étaient représentés par les femmes, a touché une tribu qui vivait encore à l'âge de pierre dans les années 1950 en Papouasie-Nouvelle-Guinée. C'est Gajdusek qui a identifié l'origine du kuru [123]. Il aurait débuté par un individu mort d'un cas sporadique de MCJ consommé lors de rites cannibals traditionnels, lors desquels, les hommes adultes consommaient les muscles, symbole de force, tandis que les femmes et les enfants ingéraient le cerveau (hautement infectieux) [186].

- C'est en mars 1996 qu'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) a été décrite au Royaume-Uni chez 10 patients âgés de moins de 40 ans [387] qui présentaient plusieurs caractéristiques communes mais atypiques pour des cas classiques de MCJ (tableau n°7): les patients étaient tous anormalement jeunes (29 ans en moyenne), alors que jusqu'à présent toutes les études épidémiologiques avaient montré que la MCJ était une maladie rarissime chez les moins de 40 ans, avec des formes clinique et pathologique inhabituelles. L'examen histopathologique a montré des caractéristiques uniques à ces nouveaux cas : en plus des caractéristiques classiques de MCJ (spongiose, astrogliose, et perte neuronale), tous les patients présentent des plaques dites florides constituées de dépôts de PrPres entourées de vacuoles leur conférant un aspect de marguerite. L'observation de ces plaques n'avait jamais été décrite auparavant pour aucune autre forme de MCJ.

	MCJ sporadique	nvMCJ
Age moyen à la mort (ans)	66	28
Durée moyenne maladie (mois)	4	13
Symptômes psychiatriques au début	Rares	Souvent
Démence progressive rapide	Souvent	Rares
Symptômes sensitifs	Rares	Souvent
EEG	Complexes triphasiques périodiques (66%)	Anormal, non spécifique
Protéine 14.3.3 dans fluide cébrospinal	Elevée (90%)	Elevée (50%)
Distribution PrPSc	SNC	SNC et tissus lymphoïdes
Isotype PrPSc en Western-blot	Plusieurs formes identifiées	Une seule forme avec prédominance de bande biglycosylée

Tableau n°7 : Comparaison de la MCJ sporadique et du vMCJ

Les premières preuves expérimentales de l'ESB comme origine de la variante ont été établies en 1996 par la découverte chez le macaque inoculé par l'agent de l'ESB des mêmes lésions caractéristiques histopathologiques que celles décrites chez les patients atteints de vMCJ : présence de plaques florides, mêmes signaux EEG et même signature biochimique [78, 198]. En 1997, l'équipe de Moira Bruce a donné la preuve finale par l'analyse des profils lésionnels [53]. L'agent responsable des cas de vMCJ chez l'homme était bien le même que celui de l'ESB. L'hypothèse la plus probable de contamination est la transmission de l'ESB à l'homme par l'alimentation et l'exposition à des tissus bovins hautement infectieux (cerveau, moëlle épinière) incorporés dans différentes préparations alimentaires. Depuis l'interdiction des abats à risque pour l'homme en 1989 au Royaume-Uni, depuis 2000 où l'on a observé un pic du nombre de cas de vMCJ (n=28), le nombre de nouveaux cas est en constante baisse (n=9 en 2004) (voir figure n°10).

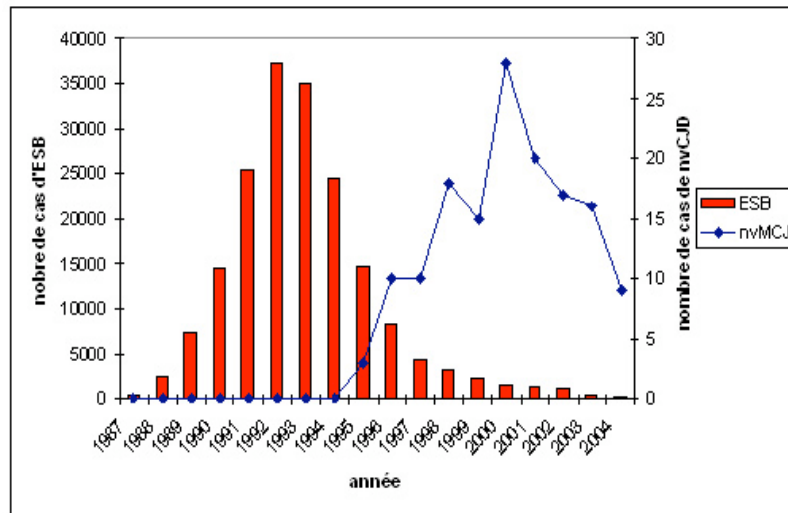


Figure n° 10: Comparaison de l'évolution du nombre de cas par année d'ESB et du vMCJ au Royaume-Uni.

IV-2 Propagation de l'agent infectieux

Les maladies à prions sont des pathologies qui présentent une longue période d'incubation pendant laquelle s'installe la neuroinvasion, étape conduisant à l'invasion du SNC après infection par voie périphérique. Compte tenu des différentes données de la littérature, deux voies de neuroinvasion après infection par voie périphérique ont été proposées: la lympho-invasion passant d'abord par le système lymphoréticulaire puis par les nerfs périphériques et la neuro-invasion directe.

IV-2.1 La lympho invasion

Ce mode d'invasion nécessite le système immunitaire et se compose de plusieurs phases :

- infection des cellules immunitaires associées au site de l'inoculation
- transport de l'agent vers les formations lymphoïdes
- concentration de la PrPSc par les FDC matures
- entrée dans le système nerveux périphérique (SNP)
- transport rétrograde de l'agent par le SNP
- entrée dans le SNC
- invasion du SNC

Après infection par voie orale, le premier site où l'on observe une forte infectiosité se situe au niveau des plaques de Peyer de l'iléon distal [367, 381]. L'agent de l'ESB semble également s'accumuler au niveau des plaques de Peyer qui représentent une voie d'entrée et d'accumulation importante par voie orale [382]. La porte d'entrée des prions par voie muqueuse est représentée par les cellules épithéliales membranaires ou cellules-M [150] qui ont déjà été démontrées comme site clé pour l'entrée de pathogènes par transport transépithélial [254]. Ainsi, les prions exploiteraient la transcytose dépendante des cellules M pour accéder au système immunitaire.

Après infection par la voie intrapéritonéale, la rate représente un autre site important d'accumulation de l'agent infectieux.

Malgré les diverses études montrant que l'infection n'entraîne pas d'immunité humorale, les cellules B ont été montrées nécessaires à la transmission des prions. En effet, l'inoculation à des souris immunodéficientes a révélé que l'absence des lymphocytes B rendait les souris résistantes à l'infection [185]. Il semble que ce soit la présence des cellules B et non l'expression de la protéine PrPc de ces cellules qui soit indispensable pour la pathogénèse par une infection intrapéritonéale puisque des souris déficientes pour les lymphocytes B dans lesquelles on a transféré des cellules B provenant de souris n'exprimant pas la PrPc se sont montrées sensibles à l'infection [3]. Comme l'absence des cellules B est corrélée à une sévère diminution des cellules folliculaires dendritiques (FDC) et que les FDC ont été décrites pour accumuler la PrPSc [173], ce type cellulaire est vite apparu comme pouvant représenter un réservoir de l'accumulation et de la réplication des ATNC en périphérie [184]. Par ailleurs, les FDC sont impliquées dans la maturation des antigènes nécessitant une maturation correcte à la fois des FDC et des cellules B. Cette maturation s'effectue par l'intermédiaire de l'interaction de la lymphotoxine α/β avec son récepteur LT- β R. Or, lorsque l'on bloque l'interaction des FDC avec les cellules B en traitant des souris avec une protéine de fusion LT- β R-Ig, on inhibe l'accumulation de PrPSc dans les centres germinatifs et l'entrée de l'agent dans le SNC [219, 242].

IV-2.2 L'interface neuro-immune

L'accumulation et la réplication dans les organes lymphoréticulaires comme la rate sont requises pour amplifier les titres infectieux après infection par voie périphérique. Par la suite, le transport de l'infectiosité depuis les organes lymphoïdes vers le SNC s'établit par les nerfs périphériques [130, 299]. La neuroinvasion est modulée de façon importante par l'expression

de la PrPc. En effet, la protéine PrPc elle-même peut être transportée depuis les terminaisons axonales par un mécanisme de transport rétrograde [248] et sa surexpression a été décrite comme modulant la neuroinvasion le long des nerfs. Le compartiment du SNC qui semble responsable de la neuroinvasion est représenté par les nerfs sympathiques [111]. En effet, la sympatectomie conduit à un retard dans le transport des prions depuis les organes lymphoïdes vers la moëlle épinière thoracique, site d'entrée des nerfs sympathiques dans le SNC, et au retard de la neuroinvasion [131].

Cependant, certains points demeurent encore obscurs. Nous ne savons pas encore comment les prions sont transférés des FDC vers les terminaisons nerveuses ou si d'autres types cellulaires sont impliqués. De plus, le mode de transport des prions le long des nerfs est encore incertain. En effet, le temps de propagation de la PrPres a été estimé à quelques millimètres par jour [15, 24] alors que le transport axonal antérograde ou rétrograde est de 200 à 400 mm/jour [134] ce qui semble aller à l'encontre du transport rétrograde proposé pour la PrPres. L'hypothèse qui a été émise considère que l'infectiosité se propagerait au niveau du nerf périphérique par un système « domino » [193], mécanisme par lequel la PrPres convertirait la PrPc adjacente conduisant à la propagation spatiale de l'infection, ce qui permettrait d'expliquer la lenteur de l'infection, hypothèse par ailleurs soutenue par Follet et al qui montrent que la propagation de l'infectiosité s'établit par les cellules de Schwann [114]. Les données montrant que même des souris ayant subi une sympatectomie peuvent développer la maladie indiquent soit a) que la sympatectomie est incomplète soit b) une autre voie d'entrée du SNC. Cette voie alternative pourrait être le nerf vague représentant alors la seconde voie de neuroinvasion de façon directe. En effet, l'équipe de Beekes a montré, après inoculation par voie orale de la souche 263K au hamster, l'importance du système nerveux entérique dans la neuroinvasion et la propagation vagale de la PrPres de l'intestin vers le cerveau où la première cible détectée est le noyau moteur dorsal du nerf vague [25, 26].

IV-2.3 Propagation dans le SNC

L'infection oculaire semble représenter le meilleur modèle de propagation de l'agent infectieux dans le SNC, d'une part parce que la rétine fait partie du SNC et d'autre part parce qu'une injection intraoculaire n'entraîne pas de traumatisme physique du cerveau contrairement à une inoculation intracérébrale.

Dans un modèle antérograde pour lequel l'agent de la tremblante est inoculé au niveau de l'œil, l'infectiosité est détectée 68 jours après infection au niveau du colliculus et 100 jours

après au niveau du nerf optique [119]. L'infectiosité apparaît donc plus vite au niveau du site d'inoculation avant sa détection au niveau du nerf.

Dans le SNC, l'expression de la PrPc a également été montrée nécessaire à l'infection puisque chez des souris PrP knock-out inoculées par voie oculaire, sur lesquelles on a pratiqué des neurogreffes PrP^{+/+}, il n'a été détecté aucun signe d'encéphalopathie ni de PrP^{res} au niveau des neurogreffes plus de 66 semaines après l'inoculation, l'absence de réponse immunitaire contre la PrP des neurogreffes ayant été vérifiée [39]. Ceci semble indiquer que la propagation des prions au niveau du SNC nécessite l'expression de la PrPc dans la chaîne conduisant au niveau cérébral. La PrPc ayant été montrée présente au niveau des synapses [118], un transport trans-synaptique pourrait permettre la propagation de l'agent infectieux au niveau central. L'absence de détection de propagation de l'agent infectieux dans les neurogreffes pourrait être le résultat de propriétés synaptiques altérées ou un mécanisme de transport dans le SNC similaire à celui décrit dans le SNP et dépendant de l'expression neuronale de la PrPc [77, 386]. Le travail de Malluci et al. sur des souris auxquelles on a déplété la PrPc endogène après apparition de la neuroinvasion a contribué également à montrer l'importance de la PrPc et de sa conversion plutôt que l'accumulation de PrP^{Sc} dans le développement des ESST [224]. En effet, cette étude a montré que la déplétion de PrPc conduisait non seulement à prolonger la période d'incubation mais que, malgré l'accumulation progressive de PrP^{Sc} dans le cerveau, on observait une réversion des phénomènes de spongiose. En plus de ce phénomène, les caractéristiques typiques des ESST observées sont la perte neuronale et l'activation astrogliale et microgliale. Les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes sont des populations cellulaires qui ont toutes été décrites pour exprimer la PrPc [246]. Cependant, seuls les neurones et les astrocytes sont impliqués dans la réplication de l'agent infectieux [300, 302]. En effet, l'équipe de Prinz a récemment montré que dans des souris transgéniques exprimant la PrP sous le promoteur MBP permettant une expression exclusive de la PrP dans les oligodendrocytes et les cellules de Schwann, les oligodendrocytes n'étaient pas impliqués dans la réplication de l'agent [292]. Néanmoins, l'étude menée par Mallucci et al semble montrer que de la PrP^{Sc} d'origine neuronale pourrait perturber la physiologie des oligodendrocytes [224].

V- THERAPEUTIQUE EXPERIMENTALE

V-1 Généralités

Malgré les importants progrès réalisés sur les traitements expérimentaux des maladies neurodégénératives, aujourd'hui encore, aucune stratégie n'a prouvé véritablement son efficacité contre les ESST, ceci notamment en raison de la nature encore inconnue de l'agent étiologique de ces maladies. Plusieurs essais thérapeutiques ont été tentés chez quelques patients avec la quinacrine et le pentosane polysulfate, cependant les résultats semblent limités, probablement en raison d'un traitement effectué au moment où les signes cliniques sont déjà installés et où le taux de PrP^{sc} accumulée et les lésions du système nerveux sont déjà très importants.

Le traitement thérapeutique peut intervenir à différents niveaux dans les processus de synthèse et d'accumulation de la PrP pathologique (figure n°11):

- inhibition de la synthèse de PrP^c
- stabilisation de la PrP^c en rendant la modification conformationnelle moins favorable
- inhibition de l'interaction PrP^c/PrP^{sc}
- déstabilisation et augmentation de la clearance de la PrP^{sc}
- prévention de la conversion de PrP^c en PrP^{sc}
- inhibition des médiateurs neurotoxiques qui peuvent être synthétisés en réponse à l'accumulation de PrP^{sc}

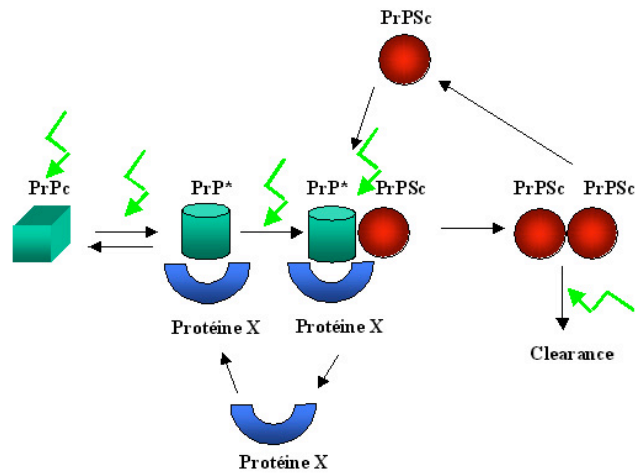


Figure n°11 : Différentes voies d'action thérapeutiques

Plusieurs approches thérapeutiques sont envisageables :

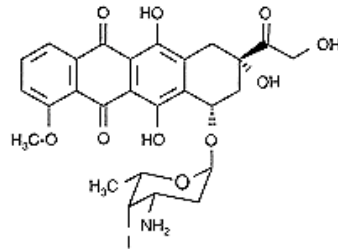
1) Approche curative : traitement de la maladie clinique ou préclinique après neuroinvasion par compensation des dommages neuronaux et gliaux et inhibition de la réplication de l'agent infectieux. Les molécules doivent dans ce cas pouvoir passer la barrière hématoencéphalique. Cependant, compte tenu des nombreuses lésions subies par le cerveau en phase clinique, il est difficile de penser que ces dommages puissent être réversés par un simple traitement pharmacologique. Néanmoins, les travaux de Malucci ont ouvert une nouvelle voie de recherche à ce sujet [224].

2) Traitement de la maladie préclinique avant la neuroinvasion (après exposition périphérique). Les molécules doivent agir au niveau des cellules immunitaires et/ou de l'interface neuro-immune. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire que les molécules passent la barrière hématoencéphalique.

3) Prophylaxie : cette stratégie nécessite l'élicitation d'une réponse immunitaire spécifique ou non qui bloque la réplication de l'agent des ESST au niveau périphérique.

V-2 Les différentes approches thérapeutiques testées

V-2.1 L'iododoxorubicine (IDX)



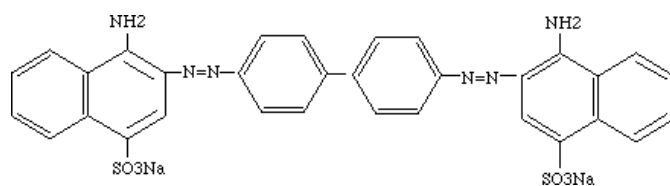
Des études chez des patients chez lesquels on a détecté des amyloïdoses ont montré que le traitement par l'anthracycline 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicine (IDX) entraînait une résorption partielle des dépôts amyloïdes [126]. Des études complémentaires ont montré que l'IDX se liait fortement aux fibrilles amyloïdes de diverses compositions chimiques et réduisait les dépôts amyloïdes dans un modèle murin d'amyloïdose réactive [234]. Des hamsters syriens

inoculés par voie intracérébrale par la souche 263K co-incubée pendant 1h avec de l'IDX ont montré une augmentation significative du temps de survie : 128 jours contre 94 jours pour les animaux infectés par la souche 263K seule [353].

V-2.2 Tétracyclines

En raison de leur homologie structurale avec une partie de l'IDX et de leur capacité à passer la BHE, les tétracyclines ont été évaluées dans le traitement des ESST. Leur capacité à interagir avec les agrégats de PrPSc a été établie en utilisant des fibrilles amyloïdes générés par des peptides synthétiques 106-126 [354]. Ces études ont montré que la tétracycline pouvait prévenir l'agrégation et la résistance aux protéases des peptides synthétiques. Une étude de Forloni a quant à elle montré que lorsque l'on co-incubait les tétracyclines avec l'inoculum, on observait un retard dans l'accumulation de PrPSc dans le SNC et dans l'apparition des symptômes [117].

V-2.3 Le Rouge Congo (CR)



Le Rouge Congo est un pigment couramment utilisé en histopathologie pour marquer les dépôts de protéines amyloïdes. *In vitro*, cette molécule a montré qu'elle inhibait l'accumulation de PrPSc dans des cellules chroniquement infectées. Le Rouge Congo stabiliserait la PrPSc, l'empêchant de se déplier pour atteindre un état intermédiaire nécessaire à la transconformation PrPc-PrPSc [62]. *In vivo*, les résultats sont controversés. Un effet a bien été démontré sur l'allongement de la survie dans le modèle du hamster contaminé par les souches 139A et 263K par voie *i.p* et *i.c*, mais seulement lorsque la molécule est administrée au moment de l'infection [167]. Par ailleurs, pour d'autres combinaisons souche/hôte, aucune efficacité n'a pu être démontrée.

V-2.4 Peptides synthétiques « β -sheet breaker peptides »

Des peptides synthétiques ont montré qu'ils pouvaient interagir avec la PrPc et former un complexe agrégé [176]. Les travaux de Chabry ont montré que des peptides synthétiques composés d'une partie centrale de la séquence de la PrP (PrP106-126, 109-141, 113-141) étaient des inhibiteurs efficaces dans un modèle de conversion acellulaire [67]. Les résultats obtenus avec le peptide 109-141 ont par ailleurs permis de suggérer que des interactions spécifiques entre PrPc et PrPSc s'établissaient par l'intermédiaire de la région centrale de la molécule. Cette idée est soutenue par les études sur des molécules de PrP mutées délétées pour la séquence 114-121 et qui montrent l'absence de conversion en isoforme PK résistante après expression dans des cellules de neuroblastomes infectés [156]. Les acides aminés 113 à 120 semblent requis pour une inhibition maximale tandis que les résidus adjacents de 129 à 141 jouent un rôle plus modéré.

Des peptides présentant une homologie de séquence avec la PrPc et un taux plus élevé en Proline (iPrP13) ont montré qu'ils pouvaient interagir avec la PrPSc et augmenter sa sensibilité aux protéases [341]. De plus, le traitement avec l'iPrP13 (115-122) permet de

retarder les signes cliniques et de diminuer l'infectiosité de 90-95% chez des souris infectées.

V-2.5 Polyanions

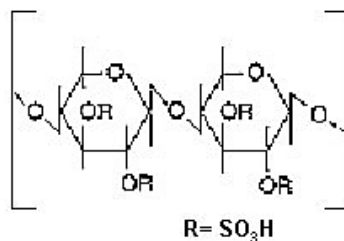
Les polyanions sont des molécules très fortement chargées qui interagissent avec la membrane cellulaire. Ils sont connus pour inhiber l'entrée de certains virus de manière non spécifique. Le dextran sulfate (DS500), le pentosan polysulfate (PPS), la suramine et l'HPA-23 ont montré leur efficacité dans différentes combinaisons souche/hôte.

-Le DS500

Le DS500 (polymère de glucose contenant 2 groupes sulfates par sucre et de poids moléculaire 500kDa) a montré qu'après inoculation par voie intra-péritonéale, une seule injection intrapéritonéale de 250mg pouvait prolonger la période d'incubation chez la souris infectée et réduire la sensibilité à l'infection seulement dans les phases précoces, un mois avant ou 2 semaines après l'infection [102, 109]. Un traitement unique de 40 mg/kg, 2h après inoculation entraîne quant à lui une augmentation du temps de survie de 21% [196].

-Le PPS

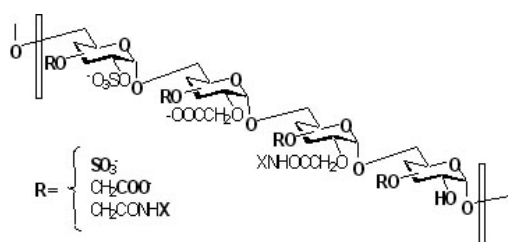
Des études *in vivo* chez la souris semblent indiquer que le DS500 est toxique, alors que le pentosane sulfate (SP54, polymère de xylose de 54kDa) a montré une toxicité moindre [95].



Le pentosane polysulfate (PPS) est un xylose sulfaté (1,4-D-xylopyranoside polysulfaté de poids moléculaire variant de 3500-5000). L'effet *in vivo* du PPS est très dépendant de la dose, la voie d'administration, la souche d'ATNC et le modèle animal considéré. Dans le modèle du hamster syrien infecté par voie intrapéritonéale (i.p) par la souche neurotrope 263K, le PPS ne prolonge la survie des animaux que s'il est administré immédiatement après (2h) l'exposition parentérale [196]. Chez la souris NMRI infectée par la souche 139A en i.p, trois injections de

10 mg de PPS 2 mois avant l'infection, augmentent significativement le temps de survie et réduisent la sensibilité à l'infection d'un facteur d'au moins 100 [95, 109]. En fonction du modèle de souris (C3H, BRVR, VL, CBA, VM, BSC), les résultats peuvent être différents [107]. Une injection unique de PPS à la dose de 1mg 7h après l'infection protège complètement les souris VM contre la souche 22A, tandis que les souris CBA sont protégées contre la souche ME7. Les résultats de Farquhar présentés au Congrès de Munich en 2003 indiquent que des injections répétées de PPS par voie intrapéritonéale et orale sont efficaces: 5 injections par voie intrapéritonéale de 5 mg chaque semaine, 7h après l'infection en i.p. de la souche ME7, augmentent de 40% le temps de survie des animaux et l'administration par voie orale d'une dose forte unique de PPS à des souris inoculées oralement par la souche ME7 augmente significativement la période d'incubation. De plus, des doses répétées de PPS augmentent significativement le temps de survie non seulement de souris infectées par une souche de tremblante oralement ou de façon parentérale, mais aussi chez des souris infectées en ip par une souche d'ESB bovine ou d'une souche d'ESB adaptée à la souris [108]. Compte tenu de l'utilisation du PPS dans le cas de traitement d'autres pathologies, cette molécule a été proposée comme traitement prophylactique potentiel de la MCJ. Au Royaume-Uni un jeune homme de 18 ans présentant des symptômes sévères de vMCJ a été traité avec de faibles doses de PPS par perfusion à long terme au niveau du cerveau et a montré, après 5 mois, une amélioration des symptômes (gain de poids, perte de l'incontinence, réponse à la douleur) [85]. Ces résultats ont été renforcés par une étude récente de Doh-Ura montrant que l'infusion intraventriculaire de PPS à des souris transgéniques Tg7 infectées par la souche 263K prolongeait la période d'incubation [98]. Par ailleurs, cette étude a montré qu'au niveau du site d'infusion du PPS, l'accumulation de PrPres et les lésions neuropathologiques étaient moindres comparativement à l'hémisphère cérébral contralatéral. Ces résultats semblent confirmer le mode d'action du PPS qui pourrait agir directement sur la genèse de PrPres, puisqu'il a déjà été montré que le PPS interférait avec la conversion de PrPc en PrPres par liaison compétitive [63] ou bien par altération de la localisation cellulaire des molécules de PrPc [333].

-Les héparanes mimétiques

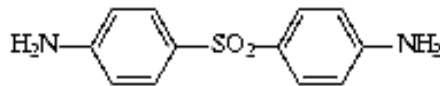


De nouvelles molécules appelées HM (Héparan Mimetics) mimant la structure des glycosaminoglycans (GAGs), et en particulier des héparanes sulfates, initialement synthétisés pour leur capacité de régénération tissulaire (d'où leur autre appellation de RGTA pour Regenerating Agents) [35, 232] ont été testées dans le traitement des maladies à prions. Il a été rapporté que les héparanes sulfates possédaient des fonctions biologiques particulièrement intéressantes, représentant en conséquence de bons candidats thérapeutiques : ces molécules support de l'adhésion et de la prolifération cellulaire [34] peuvent se lier à la PrP au niveau de sites spécifiques [375], jouent un rôle prépondérant dans l'endocytose de la PrP, le métabolisme des prions [28], et agissent comme co-récepteurs pour la liaison de la PrP au LRP/LR [160]. Deux études récentes ont comparé l'efficacité de deux HM et notamment le HM2602 (degré de substitution par unité de sucre : 0,8 CM, 0,2 Bn, 0,5 S) et le HM 5004 (degré de substitution par unité de sucre : 0,5 CM, 1,3 S, pas de Bn). Ces travaux ont permis de montrer que ces 2 HM inhibaient efficacement de façon dose dépendante la PrPres sur différentes lignées cellulaires (ScGT1 et ScN2a) [2, 328]. Cet effet inhibiteur très rapide in vitro (diminution du taux de PrPres après 24h de traitement et élimination totale 96h après) qui se prolonge durant 50 jours, semble agir par la liaison du HM avec la PrPc et en inhibant la conversion de PrPc en PrPres et non par une modification de la synthèse de PrPc, ni la dégradation de PrPres, ni l'association de la PrP avec les rafts. Ils pourraient également agir en bloquant la liaison de la PrP avec le récepteur à la laminine /LRP/LR par compétition avec les HS naturels. Les auteurs semblent opter pour cette dernière hypothèse en raison du rôle essentiel du LRP/LR dans l'endocytose et la conversion de la PrP [125] et de l'inhibition de la synthèse de PrPres après le blocage du LRP/LR par anticorps [207]. In vivo, les travaux menés ont montré que seul un traitement avec le HM2602 (25mg/kg/semaine en i.p.) était efficace sur l'accumulation de PrPres dans la rate 30 jours après inoculation chez la souris et prolongeait la survie de hamsters infectés de 14%. Ces résultats ont permis de montrer qu'un degré de sulfatation important semble corrélé avec une meilleure efficacité et compte tenu de l'effet plus important du HM2602 comparativement au HM5004, la présence d'un groupement hydrophobe benzylamide augmente l'effet inhibiteur. Cette particularité chimique rejoint les travaux qui ont montré que la conversion de PrPc en PrPres était caractérisée par une exposition des résidus hydrophobes [322] et ceux montrant l'existence d'interactions hydrophobes entre la PrPres et des molécules telles que le Rouge Congo et l'IDX [234, 353].

V-2.6 La suramine

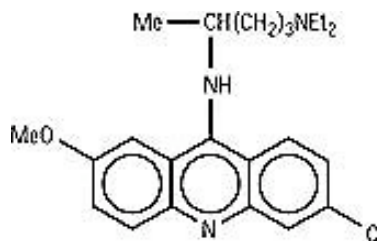
La suramine est un composé polysulfoné utilisé depuis longtemps dans le traitement des trypanosomioses. Lorsque des cellules ScN2a et ScGT1 sont traitées avec ce composé, la synthèse de novo de PrPSc est totalement inhibée même après plusieurs passages sans traitement [129]. La suramine est connue pour interférer avec l'agrégation et l'expression à la surface de certaines protéines et dans le cas de la PrP, cette molécule induit la formation d'agrégats de PrP insolubles sensibles à la PK. L'administration intrapéritonéale de suramine à des souris au moment de l'infection a permis de prolonger significativement la période d'incubation.

V-2.7 La dapsons



C'est une phénylsulfone prescrite habituellement comme antibactérien ou antiparasitaire qui peut passer la BHE et qui a été utilisée dans le traitement de la lèpre. Après inoculation de rats par voie ic avec une souche qui dérive de la souche cricétidienne SY, elle même dérivée de la MCJ, l'administration par voie orale de dapsons à 2mg/kg dès le début de la contamination et poursuivie pendant toute la période d'incubation et la phase clinique, entraîne une augmentation du temps de survie de 30% chez les animaux traités [228].

V-2.8 La quinacrine

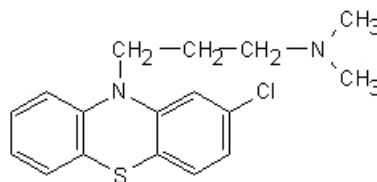


La quinacrine est une molécule qui a longtemps été prescrite dans le traitement du paludisme, des giardioses et du trypanosome. Un traitement unique avec cette molécule a montré que

sur des cultures de neuroblastomes murins ScNB et ScN2a, l'accumulation de PrPres était totalement inhibée [97, 189]. L'analyse comparative de l'équipe de Korth de plusieurs dérivés de la quinacrine a montré que l'atome d'azote en position 9 du composé tricyclique et que la longueur et la composition de la chaîne aliphatique contribuaient à l'effet inhibiteur. La spectroscopie RMN a permis de déterminer que le site de liaison de la quinacrine sur la protéine PrP humaine recombinante est le tripeptide 225-227 de l'hélice α 3 [371] qui est localisé près du site d'interaction avec la protéine X. L'effet de la quinacrine pourrait donc passer par une compétition avec la protéine X pour la liaison à la PrPc. Cette molécule déjà utilisée depuis longtemps en médecine humaine est vite apparue comme la molécule « miracle » pour traiter des patients atteints de MCJ. Cependant, une étude in vivo a montré que le traitement à 10 mg/kg/jour par voie orale 5 jours ou 65 jours après une inoculation intracérébrale à des souris ne permettait pas d'augmenter la survie des animaux [81]. Les effets cytotoxiques de cette molécule en conséquence d'une administration chronique (dysfonctionnement du foie, psychose, cardiomyopathie) ont conduit l'équipe de Prusiner à tester des énantiomères de la quinacrine [317] comme cela avait déjà été fait pour le paludisme [376]. Comparativement à la quinacrine générique et à l'énantiomère (R), l'énantiomère (S) présente une meilleure capacité à éliminer la PrPres dans des cellules ScN2a, avec une cytotoxicité similaire. Néanmoins, ces études ont été évaluées dans des modèles in vitro, et pour l'instant aucune étude ne montre si un énantiomère plus efficace in vitro présente une efficacité in vivo. La même équipe a également testé l'efficacité de composés bis-acridines caractérisés par deux hétérocycles acridines séparés par un linker, en postulant que compte tenu du fait que c'est l'oligomérisation de la PrP qui est le mécanisme central de la formation de PrPSc, des composés dimériques devraient être plus efficaces pour inhiber la multimérisation de la protéine pathologique [229]. Cette étude a mis en évidence 3 composés potentiels non toxiques à une concentration de 500 nM dans un modèle cellulaire. Le mode d'action de ces composés pourrait passer par un possible mécanisme de liaison des hétérocycles à des sites indépendants sur la PrPres. A l'heure actuelle, plusieurs patients aux Etats-Unis, en France, au Royaume-Uni et au Japon sont traités avec la quinacrine. Les données rapportées lors du Congrès à Paris en Juin 2003 indiquent des résultats quelque peu controversés : l'étude suivie par Nakajima au Japon indique une amélioration des mécanismes cognitifs chez les patients après un traitement à 300mg/jour pendant 12 semaines, alors que l'étude menée par Brandel de Août 2001 à Août 2002 sur 39 patients pendant 38 jours, a montré que malgré des signes d'amélioration transitoires pour un seul patient, les résultats observés n'indiquaient aucun effet positif significatif. La pertinence de l'utilisation de cette molécule comme candidat thérapeutique des ESST a fait l'objet d'une partie de ce travail de

thèse (voir Résultats chapitre I).

V-2.9 La chlorpromazine



La chlorpromazine est une phénothiazine connue pour passer la BHE utilisée depuis de nombreuses années dans le traitement antipsychotique. Cette molécule a montré qu'elle pouvait inhiber l'accumulation de PrPSc dans le modèle de neuroblastome murin ScN2a avec une IC₅₀ de 3mM [189].

V-2.10 Les antibiotiques polyéniques

Les antibiotiques polyéniques sont des agents antifongiques dérivés de l'amphotéricine B. Dans le traitement des ESST, l'effet de l'amphotéricine B dépend de la dose utilisée et du moment de son administration [286]. L'utilisation de l'amphotéricine B dans le modèle du hamster syrien infecté par la souche 263K a montré qu'elle induisait une réduction de l'accumulation de PrPres [231] ainsi qu'un prolongement du temps de survie des animaux [288].

Le développement d'un dérivé moins toxique de cette molécule, le MS-8209 a montré que ce nouveau composé administré à différents modèles animaux permettait d'augmenter significativement le temps de survie des animaux, pouvant aller jusqu'à 100% d'augmentation chez le hamster [88]. L'effet le plus remarquable de cette molécule est son efficacité même lorsqu'elle est administrée à des stades tardifs de la maladie [1, 89], contrairement à toutes les autres molécules testées qui n'ont montré une efficacité qu'au début de l'infection.

L'effet thérapeutique des antibiotiques polyéniques semblerait passer par un retard de l'accumulation de PrPSc dans le cerveau. Ce mécanisme s'établirait par l'inhibition de la synthèse de PrPSc en modifiant la composition chimique et physique des microdomaines de la membrane cellulaire (rafts) riches en cholestérol où la PrPc se trouve préférentiellement [135] et où on suppose qu'elle est convertie en PrPSc [356, 368]. D'autres données

expérimentales semblent indiquer que les antibiotiques polyéniques agiraient sur l'interface neuroimmune et diminueraient les processus de neuroinvasion [31].

V-2.11 Porphyrines tétrapyrroles

Les tétrapyrroles représentent des inhibiteurs potentiellement efficaces dans le sens où elles ont été décrites pour se lier fortement et de façon sélective aux protéines et changer leur conformation [161]. Plusieurs porphyrines tétrasubstituées, deuteroporphyrines (DT) substituées (sulfonates ou glycol) et des phtalocyanines tétrasulfonate (PcTSs) ont montré un effet inhibiteur sur la formation de PrPres dans le modèle cellulaire de neuroblastomes ScNB [66]. Ces molécules, et en particulier PcTS-Fe³⁺, qui possèdent une structure similaire à celle du Rouge Congo en raison des 4 noyaux pyrroles qu'elles portent, sont 10 fois plus efficaces sur la conversion de PrP de hamster *in vitro* dans un modèle acellulaire, cependant elles possèdent une efficacité 100 fois moins importante que le Rouge Congo dans les cellules ScNB. De façon surprenante, contrairement à ce qui avait été décrit pour le Rouge Congo et d'autres inhibiteurs polyanioniques qui sont sulfonés ou sulfatés, les groupes sulfonés et anioniques portés par les porphyrines ne semblent pas être responsables de l'activité inhibitrice. Il semblerait que ce soit la combinaison et les interactions des structures du noyau et des substituants qui déterminent l'efficacité des tétrapyrroles. Le traitement de hamster infectés avec la souche 263K avec différents composés tétrapyrroles a montré que parmi la PcTS, le TMPP (meso-tetra(4-N-methylpyridyl)-Fe³⁺) et la deuteroporphyrine DPG2-Fe³⁺, la PcTS administrée en i.p. à raison de 12 traitements sur 4 semaines dès le début de l'infection était le composé le plus actif *in vivo* prolongeant la survie des animaux de 50% [293].

V-2.12 Polyamines branchées

Les polyamines branchées telles que le polyéthylèneimine (PEI) et les polyamidoamides (PAMAM) ont été décrites pour inhiber totalement l'accumulation de PrPSc dans des cellules ScN2a [350]. Ces composés se lieraient directement à la PrPSc et stimuleraient la protéolyse de la PrPSc dans les endolysosomes dans les 3h qui suivent l'administration. La capacité des polyamines branchées à dénaturer la PrPSc dépend de plusieurs caractéristiques moléculaires telles que les branchements et la forte densité de surface des amines terminales.

V-2.13 Acides ribonucléiques

La transfection de petits ARN appelés RNAi dirigés contre l'ARNm de la PrPc ovine dans des cellules RK13 (rabbit kidney epithelial cells) transfectées avec un vecteur exprimant les gènes *Prnp* murin et ovin et dans des cellules Rov9 exprimant des taux élevés de PrPc ovine, a montré une inhibition significative de l'expression de la PrP ovine dans les 2 types cellulaires [362]. Par ailleurs, D. Proske a isolé des petits acides ribonucléiques appelés aptamères qui se lient à la PrPc humaine au niveau des acides aminés 90-129 et qui permettent de réduire la synthèse de PrPSc de novo en 16h dans une lignée cellulaire de neuroblastome (3F4-ScN2a), qui exprime de façon stable la PrP murine endogène et une PrP chimérique souris-hamster-souris (MHM2) [295]. Selon les auteurs, le mode d'action de ces aptamères passerait par une inhibition de la conversion de la PrPc en PrPSc dans le modèle de polymérisation par noyau de nucléation en se liant initialement à la PrPc.

V-2.14 Modulateurs de la mort neuronale

Plusieurs stratégies ont été développées afin de prévenir ou compenser la perte neuronale caractéristique de la pathogénèse. La majorité de la mort neuronale qui survient est reliée à un mécanisme d'apoptose, elle-même liée à un dépôt de protéines ou de médiateurs neurotoxiques sécrétés par les cellules gliales. Des drogues anti-apoptotiques telles que la flupirtine et la mémantine ont montré un effet cytoprotecteur dans des modèles expérimentaux mettant en jeu des cellules neuronales exposées au peptide 106-126 connu pour ses propriétés neurotoxiques in vitro et in vivo [115, 282]. La flupirtine, dérivé de puridine, augmenterait l'expression de Bcl2 qui est une molécule anti-apoptotique et agirait comme antagoniste des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate).

V-2.15 Intervention immunothérapeutique

Bien qu'aucune réponse immunitaire spécifique chez les individus infectés n'a pu être détectée, plusieurs essais thérapeutiques passant par une intervention immunitaire ont été évalués.

Les FDC qui se trouvent dans les tissus lymphoïdes jouent un rôle important au niveau du système immunitaire durant une infection périphérique. In vivo, ces cellules accumulent la

PrPres dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires et se localisent près des terminaisons nerveuses sympathiques [12]. Le blocage de l'interaction médiée par la lymphotoxine b entre les FDC et les cellules conduit à une diminution de la maturation des FDC et de l'accumulation de PrPres dans les centres germinatifs et à un retard significatif de l'apparition des symptômes [219, 242, 291].

Par ailleurs, les composants du complément qui permettent la captation des antigènes par les FDC [257] pourraient jouer un rôle dans la propagation des ATNC et la pathogénèse dans les premiers jours de l'infection. Le traitement de souris avec un inhibiteur du C3 avant l'inoculation intrapéritonéale prolonge significativement le temps de survie de 24 jours [220] et des souris qui ne possèdent pas le gène codant pour C1q développent des signes cliniques plus tard (374 ± 9 jours) que des souris sauvages (288 ± 7 jours) [220].

L'utilisation d'anticorps reconnaissant plusieurs régions de la PrP ont montré une efficacité vis-à-vis de la réplication des ATNC in vitro dans des modèles cellulaires et acellulaires et in vivo en bloquant la neuroinvasion [103, 151, 336]. L'effet inhibiteur des anticorps s'établirait par leur liaison spécifique à la PrPc et/ou PrPres ce qui conduirait au blocage ou à la modification de la conversion de la PrPc en PrPres [335, 336]. L'étude de White et al. qui a montré un effet remarquable in vivo de l'anticorps ICSM18 dirigé contre les résidus 146-159 rejoint les études précédentes qui montraient que l'hélice 1 est impliquée dans la réplication des ATNC.

L'administration d'oligodeoxynucléotides CpG, motifs apparaissant à une forte fréquence dans l'ADN bactérien et stimulant le système immunitaire inné [373] a permis d'augmenter très significativement la période d'incubation de souris infectées [330]. Cet effet pourrait être le résultat d'un effet adjuvant des CpG conduisant à la production d'anticorps ou bien d'une modification de l'architecture de la rate en raison des traitements répétés, ce qui pourrait conduire à une surstimulation des cellules immunitaires et une déplétion fonctionnelle des FDC.

Résultats

I- RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES

I-1 Avant-propos

A l'heure actuelle, de nombreuses stratégies ont été évaluées dans le traitement des maladies à prions. Cependant, aucune d'entre elles, à ce jour, ne montre une réelle satisfaction compte tenu du manque d'efficacité lorsque le système nerveux central est déjà atteint et de leur effet variable selon la souche d'ATNC, la voie d'inoculation ou bien le modèle utilisé. Les données encore fragmentaires sur l'agent lui-même et son mode de propagation contribuent également à la difficulté de développer une thérapeutique efficace. Il semble encore aujourd'hui difficile de concevoir le traitement des patients au moment même où la neurodégénérescence a débuté, cependant les derniers travaux de Malluci et al. décrivant une réversion des phénomènes de spongiose après l'installation des premiers signes de neurodégénérescence laissent entrevoir une nouvelle voie de recherche à ce stade de la maladie. En attendant de confirmer ces résultats et de développer des stratégies efficaces au moment où la neurodégénérescence est installée, le développement de molécules dans le cadre d'un traitement prophylactique en cas de contamination accidentelle ou avant que le SNC ne soit atteint représente un axe de recherche à explorer, non seulement d'un point de vue curatif, mais aussi afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-tendant la propagation de l'agent.

Par ce travail, nous nous sommes tout d'abord attachés à évaluer l'efficacité et la pertinence de l'utilisation de la quinacrine, molécule utilisée depuis longtemps dans le traitement du paludisme, chez des patients atteints de MCJ. En effet, l'étude menée par l'équipe de Prusiner [189] a montré que sur le modèle de neuroblastomes ScN2a, la quinacrine était significativement efficace. La présence sur le marché de cette molécule a conduit très rapidement à la proposition de cette molécule comme traitement compassionnel des patients atteints de MCJ. Cependant, ce traitement a été proposé sur la seule base de son efficacité dans un modèle cellulaire unique sans aucune étude préalable dirigée chez l'animal. Nous avons donc voulu évaluer la pertinence d'un tel traitement dans différents modèles in vitro et dans un modèle in vivo. Cette étude publiée en 2003 sera développée dans le premier chapitre (Article 1) et fait l'objet de commentaires supplémentaires.

Un deuxième volet de ce chapitre a porté sur l'étude in vitro et in vivo du potentiel thérapeutique de diverses classes de molécules. En effet, à ce jour, un grand nombre de composés ont été testés, cependant beaucoup d'entre eux, bien qu'efficaces in vitro, ont montré une efficacité limitée in vivo essentiellement lorsque la phase de neuroinvasion s'est installée. Nous avons donc testé l'efficacité de nouveaux héparanes mimétiques et porphyrines dont la synthèse a été modifiée de façon fine afin de déterminer si une structure particulière possédait une fonction particulière lui conférant un effet plus important in vivo. Cette étude nous a conduits, d'une part à mettre en évidence deux nouvelles molécules et d'autre part, à émettre diverses conclusions concernant leur efficacité et leur utilisation dans le traitement des ESST.

I-2 Article n°1

“Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases”

Barret et al, 2003, Journal of Virology, Vol.77, N°15, p. 8462-8469

Evaluation of Quinacrine Treatment for Prion Diseases

A. Barret,¹ F. Tagliavini,² G. Forloni,³ C. Bate,⁴ M. Salmona,³ L. Colombo,³ A. De Luigi,³
L. Limido,² S. Suardi,² G. Rossi,² F. Auvré,¹ K. T. Adjou,⁵ N. Salès,¹
A. Williams,⁴ C. Lasmézas,¹ and J. P. Deslys^{1*}

Commissariat à l'Énergie Atomique, 92265 Fontenay-aux-Roses,¹ and Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort Cedex,³ France; Istituto Nazionale Neurologico "Carlo Besta," 20133 Milan,² and Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri," 20157 Milan,³ Italy; and Institute of Comparative Medicine, University of Glasgow Veterinary School, Glasgow, United Kingdom⁴

Received 13 December 2002/Accepted 14 April 2003

Based on in vitro observations in scrapie-infected neuroblastoma cells, quinacrine has recently been proposed as a treatment for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), including a new variant CJD which is linked to contamination of food by the bovine spongiform encephalopathy (BSE) agent. The present study investigated possible mechanisms of action of quinacrine on prions. The ability of quinacrine to interact with and to reduce the protease resistance of PrP peptide aggregates and PrPres of human and animal origin were analyzed, together with its ability to inhibit the in vitro conversion of the normal prion protein (PrPc) to the abnormal form (PrPres). Furthermore, the efficiencies of quinacrine and chlorpromazine, another tricyclic compound, were examined in different in vitro models and in an experimental murine model of BSE. Quinacrine efficiently hampered de novo generation of fibrillogenic prion protein and PrPres accumulation in ScN2a cells. However, it was unable to affect the protease resistance of preexisting PrP fibrils and PrPres from brain homogenates, and a "curing" effect was obtained in ScGT1 cells only after lengthy treatment. In vivo, no detectable effect was observed in the animal model used, consistent with other recent studies and preliminary observations in humans. Despite its ability to cross the blood-brain barrier, the use of quinacrine for the treatment of CJD is questionable, at least as a monotherapy. The multistep experimental approach employed here could be used to test new therapeutic regimes before their use in human trials.

Transmissible spongiform encephalopathies are a group of neurodegenerative disorders including sporadic, genetic, and acquired forms of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, scrapie in sheep, and spongiform encephalopathy in cattle (bovine spongiform encephalopathy [BSE]). These diseases are characterized by the accumulation of a pathological form of the cellular prion protein (PrPc), called scrapie prion protein (PrPres), in the central nervous system and, in many instances, in the lymphoreticular system. PrPres shows several differences from PrPc: a high percentage of β -sheet secondary structure, resistance to proteolysis, insolubility in detergents, and a propensity to polymerize into amyloid-like fibrils (4, 27, 28). The disease-related form of PrPc, PrPres, is the only specific molecular marker of the infection, and the inhibition of its accumulation is often used to evaluate the efficacy of therapeutic drugs.

To date, several compounds have been described which decrease the PrPres concentration in different scrapie-infected cell lines or prolong the incubation period in animal models. These drugs belong to different classes, including sulfated polyanions (13, 17, 19; C. Farquhar, A. Dickinson, and M. Bruce, *Lancet* **353**:117, 1999; C. Farquhar, I. McConnell, J. Graham, S. Cumming, R. Prescott, A. Boyle, G. R. Barclay, D. S. Pepper, M. L. Turner, and M. E. Bruce, presented at the International Conference on Transmissible Spon-

giform Encephalopathies, Edinburgh, United Kingdom, 2002), amphotericin B derivatives (1, 25), Congo red (5, 9), tetracyclic compounds (15, 35), tetrapyrroles (7, 26), branched polyamines (32, 33), and β -sheet breakers derived from PrP peptides (31). Nevertheless, none of them is effective when given around the time of the clinical phase, thereby restricting an evidence-based rationale for their use in the treatment of human disease. Recently, quinacrine, chlorpromazine, and some tricyclic derivatives with an aliphatic side chain were described as efficient inhibitors of PrPres formation in murine neuroblastoma cells chronically infected with the Chandler scrapie isolate (12, 18). Since these two compounds have been used in human medicine for many years (quinacrine as an antimalarial and chlorpromazine as an antipsychotic drug) and are able to cross the blood-brain barrier, they appeared to be interesting candidates for prion disease therapy. Consequently, quinacrine has been proposed for compassionate treatment of CJD, in particular for the new variant CJD causally linked to BSE, even though no data were available in experimental models to support its efficacy in the treatment of transmissible spongiform encephalopathies.

In this study, we used several complementary methods to extend our knowledge of the effect of quinacrine on prion replication in order to document the relevance of this therapeutic approach. Using biochemical and biophysical techniques, we examined the ability of the compound to interact with and to affect the protease resistance of synthetic PrP peptide aggregates and of PrPres from different brain homogenates. In addition, we investigated the ability of quinacrine to

* Corresponding author. Mailing address: Commissariat à l'Énergie Atomique, DSV/DRM/GIDTIP, 18 Route du Panorama, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. Phone: 33 (0)1 465 48279. Fax: 33 (0)1 465 49319. E-mail: jpdelsys@cea.fr.

hinder the *in vitro* conversion of PrPc to PrPres. We also analyzed the effects of quinacrine and chlorpromazine on PrPres accumulation in three different models of chronically infected cells. Finally, we investigated their therapeutic effects in BSE-infected mice. In agreement with previous reports, the results obtained showed that quinacrine was effective against *de novo* generation of fibrillogenic prion protein and against PrPres accumulation in ScN2a cells. However, the compound was less efficient with ScGT1 cells, another chronically scrapie-infected murine neuronal cell line, which could be cured only after lengthy treatment. It was also less efficient in disrupting preexisting aggregated PrP fibrils and PrPres from different brain homogenates. *In vivo*, not only did quinacrine and chlorpromazine not efficiently inhibit the accumulation of PrPres, but a paradoxical increase in PrPres was observed. Moreover, preliminary results in treating mice that developed clinical signs have not shown evidence of clinical efficiency. We therefore propose that quinacrine can interact with PrP to inhibit PrPres formation but that it is unable to significantly disrupt preformed aggregates and therefore has a limited role in therapeutic interventions during the late stages of prion diseases.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Quinacrine, chlorpromazine, tetracycline hydrochloride, Congo red, and thioflavin T were purchased from Sigma Aldrich, and dextran sulfate 500 was purchased from Pharmacia. Amphotericin B derivatives, such as MS-8209 and MS-1191, were generous gifts from Mayoly-Spindler Laboratories. The drugs were diluted in a sterile 5% (wt/vol) glucose solution.

Peptide synthesis and purification. The peptides PrP106-126 (KTNMKH MAGAAAAGAVVGGGLG) and PrP82-146 (GOPHGGGWGQGGGTHSQ WNKPSKPKTNMKAGAAAAGAAVVGGGLGGYMLGSAMSRPIIHFG SDYE), based on the human PrP amino acid sequence, were synthesized by solid-phase chemistry on an Applied Biosystems 430A synthesizer as described previously (14, 36). The peptides were cleaved from the resin with phenol-thioanisole-trifluoroacetic acid, precipitated, washed several times with cold diethylether, and purified by preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) (model 243; Beckman Instruments). The purities and identities of peptides were determined by analytical reverse-phase HPLC, capillary electrophoresis (Quanta 4000; Millipore), amino acid sequencing (6600 Prosequencer; Milligen), and mass spectrometry using a single quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray interface (Hewlett-Packard). The purities of the peptides were >95%.

Fluorescence microscopy. To generate amyloid fibrils, the peptides PrP106-126 and PrP82-146 were dissolved in deionized water at a concentration of 2 mM, and the same volume of 200 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, was added. The samples were incubated for 1 week at 37°C. An aqueous solution of quinacrine, tetracycline hydrochloride, or the amyloid-binding fluorochrome thioflavin T was added to suspensions of peptide aggregates to a final concentration of 1 mM. After 2 h of incubation at room temperature, the samples were centrifuged at 16,000 × g for 5 min, and the pellet was washed several times with Tris-HCl buffer to remove any free dye in solution and then applied to gelatin-coated slides. Appropriate controls (solutions of gentamicin as a negative control, thioflavin T plus scrambled peptide, peptides in the absence of thioflavin T, and a solution of thioflavin T only) were used to avoid artifacts. The samples were then examined by fluorescence microscopy using selective filters (Zeiss).

Proteinase K digestion of synthetic peptides. The synthetic peptides PrP106-126 and PrP82-146 were dissolved at a concentration of 1 mM in water-acetonitrile (1:1), and 30-μl aliquots were lyophilized. The samples were dissolved in 15 μl of deionized water alone or with either quinacrine or tetracycline, and the same volume of 200 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM CaCl₂ was added. The final PrP106-126- to- compound ratios were 1:1, 1:4, and 1:8, and the ratio of PrP82-146 to compound was equimolar. The samples of PrP106-126 and PrP82-146 were incubated at 37°C for 48 h and then digested with proteinase K (37°C for 15 min) at 20 (PrP106-126) or 16 (PrP82-146) μg/ml (the different concentrations of proteinase K used reflected the relative sensitivities of the two peptides to proteolysis). Proteolysis was blocked by the addition of EGTA (5 mM

final concentration). After centrifugation at 16,000 × g for 5 min, the supernatant was removed, the pellet was dissolved in 30 μl of 10% formic acid containing 0.1% trifluoroacetic acid, and 20 μl was analyzed by reverse-phase HPLC. Parallel samples were run in the absence of quinacrine or tetracycline and analyzed as specified above with or without proteinase K digestion. The extent of proteolysis was calculated as the percentage of peptide present in the pellet compared to the total amount originally present.

Effects of quinacrine on protease resistance of PrPres. PrPres was partially purified from brain tissue of patients with sporadic and variant CJD, 263K-infected hamsters, and 139A-infected mice following a procedure described previously (6). Sample aliquots containing ~2 ng of PrPres were incubated at 37°C for 48 h either in the absence or in the presence of quinacrine or tetracycline (0.02, 0.2, and 2 mM concentrations) and then treated with proteinase K (50 μg/ml; 37°C; 1 h). The amount of PrP remaining after proteolysis was assessed by Western blot analysis using the monoclonal antibody (MAb) 3F4 (1:50,000) for CJD- and 263K-infected hamsters and the rabbit antiserum PrP95-108 (1:15,000) for 139A-infected mice (24).

Effects of quinacrine on cyclic amplification of PrPres. Brains from healthy hamsters and 263K scrapie-infected hamsters at the terminal stage of disease were homogenized in 9 volumes of conversion buffer (phosphate-buffered saline [PBS], pH 7.4, containing 0.5% Triton X-100, 0.05% sodium dodecyl sulfate [SDS], and a complete cocktail of protease inhibitors from Boehringer Mannheim). The homogenates were clarified by centrifugation at 300 × g for 30 s and diluted 1:1 in conversion buffer. The scrapie brain homogenate was then diluted 1:300 in healthy brain homogenate; 20 μl of serial dilutions of quinacrine, melatonin, or tetracycline in TBSB (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% SB3-14) was then added to 40-μl sample aliquots to obtain final drug concentrations of 2, 5, and 10 mM. The samples were incubated at 37°C with agitation for 5 h and subjected to a cycle of sonication every hour as described previously (30). The samples were then digested with proteinase K (100 μg/ml; 37°C; 1 h) and analyzed by Western blotting using the antibody 3F4 (1:50,000).

Cell cultures. Three cell lines were used in the present studies.

ScGT1 is an immortalized cell line from murine hypothalamus neurons kindly provided by S. Lehmann (Montpellier, France). These cells have been infected with the scrapie Chandler isolate and persistently express PrPres. The cells were grown at 37°C in Opti-Modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 5% fetal horse serum, 1% penicillin-streptomycin, and 1% sodium pyruvate.

N2a58/22L cells are derived from the mouse neuroblastoma cell line N2a transfected with wild-type mouse Prnp cDNA (clone 58) infected with the mouse-adapted scrapie strain 22L (kindly provided by S. Lehmann) (23). The cells were grown at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 250 μg of geneticin (G418)/ml.

In addition, ScN2a cells, similar to those used in previous PrPres-quinacrine studies (18), were grown in Ham's F-12 medium supplemented with penicillin, streptomycin, glutamine, and 2% FCS. The cells were plated at 2 × 10⁴ per well in microtiter plates. In some studies, microglia obtained from newborn mice were added to quinacrine-treated and untreated ScN2a cells as previously described (2). Uninfected N2a cells acted as controls.

PrPres assay inhibition in the three cultured cellular models. (i) ScGT1 cells. Three different treatment protocols were tested. First, 8 × 10⁵ ScGT1 cells were grown in a 75-cm² flask over 2 days. On the third day, when the cells were sufficiently adherent, different concentrations of drugs were added to the medium. The cells were incubated for 3 days in the presence of the drug. In the second protocol, 8 × 10⁵ ScGT1 cells grown in a 75-cm² flask were treated with the drugs for 6 days, with the medium and the drug changed every second day. In the last protocol, 3 × 10⁵ ScGT1 cells grown in a 75-cm² flask were treated with quinacrine daily for 3 weeks. PrPres accumulation was evaluated at the end of each type of treatment. The cytotoxic effects of quinacrine on ScGT1 cells were monitored using an MTT assay (2).

(ii) N2a58/22L cells. N2a58/22L cells were grown in 12-well plates (10⁵ cells/well) for 48 h. On the third day, quinacrine (0.2 to 0.4 μM) and Congo red (7.5 μM) were freshly dissolved in vehicle (PBS) and added to the culture every 24 h for 72 h. The cytotoxic effects of quinacrine on N2a58/22L cells were determined by microscopic examination and by an MTT assay (2).

(iii) ScN2a cells. Quinacrine was added to ScN2a cells for 6 days, with the medium and the drug changed every second day, after which the amount of PrPres was determined. An MTT assay (2) was used to monitor the cytotoxic effects of quinacrine during this protocol. In further studies, the effects of quinacrine treatment on the ability of microglia to recognize and kill scrapie-infected cells was examined by adding 5 × 10³ cell microglia per well containing ScN2a cells (i.e., to give a neurone/microglia ratio of ~10:1) that were either untreated or had

been preincubated with 0.1 mg of quinacrine/ml for 24 h. Cell survival was then assessed 24 h after the addition of the microglia using a standard MTT assay (2).

Analysis of PrPres in treated cells. (i) ScGT1 cells. At the end of the treatment, the ScGT1 cells were washed in PBS and lysed in 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate) for 10 min at 4°C. The samples were submitted to a 10-min cycle of sonication at 4°C. After removal of insoluble debris by centrifugation at $20,000 \times g$ for 1 min, the total protein concentration was measured by the bicinchoninic acid protein assay (Pierce). The samples were diluted in lysis buffer to normalize the protein concentration among them and then digested with proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) for 30 min at 37°C. Digestion was blocked by 4 mM Pefabloc, and the samples were centrifuged at $20,000 \times g$ for 90 min at 4°C. The supernatant was removed, and the pellet was dissolved in 40 μl of Laemmli buffer (Bio-Rad). The samples were boiled for 5 min at 100°C. Fifteen microliters of each sample was subjected to 12% polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane in a buffer containing 0.15% Tris–0.6% glycine–10% isopropanol overnight at 22 V and 160 mA. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS–0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature. PrPres was detected by incubation with the antibody SAF83 (a generous gift of J. Grassi, CEA, Saclay, France) recognizing the 126-164 PrP epitope for 1 h at room temperature. After three washes of 5 min each, the first antibody was revealed with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 30 min at room temperature. The immunodetection was carried out by enhanced chemiluminescence (Amersham). The effect of the drug was determined by quantitating the PrPres signals of the treated cells and by comparison with a dilution scale of ScGT1 cells using Quantity One software (Bio-Rad).

(ii) N2a58/22L cells. After 72 h of incubation, the N2a58/22L cells were washed twice with PBS and lysed in 0.5 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Na-deoxycholate, 0.5% Triton X-100, 2 mM EDTA) containing protease inhibitors (leupeptin and pepstatin [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]) for 30 min at 4°C. After centrifugation (2 min at $10,000 \times g$), the supernatant was collected and the total protein concentration was measured. Protein (176 μg) was digested with 2.5 μg of proteinase K for 60 min at 37°C. The digestion was stopped by phenylmethylsulfonyl fluoride (10 mg/ml) at 4°C, and the proteins were then methanol precipitated. The samples were centrifuged (20 min at $10,000 \times g$), and the pellet was resuspended in SDS loading buffer and subjected to SDS–12% polyacrylamide gel electrophoresis just after being boiled (2 h at 120 V in 25 mM Tris–192 mM glycine–0.1% SDS). The proteins were transferred onto an Immobilon-P membrane (1 h at 100 V in 10 mM CAPS–10% methanol). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20), and mouse PrP^{Sc} was detected by immunoblotting with the antibody SAF75 (a generous gift from J. Grassi) in conjunction with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody. The blot was developed by the use of enhanced chemiluminescence.

(iii) ScN2a cells. ScN2a cells were incubated with 0.2 μM quinacrine for 6 days, after which the cells were washed three times in PBS, lysed, treated with extraction buffer, and then treated with proteinase K (protein from 2×10^7 cells per ml digested with 1 μg of proteinase K per ml for 1 h at 37°C; this is 10 times the concentration required to digest PrPc in this system). The reaction was stopped with phenylmethylsulfonyl fluoride, and the amount of PrPres present was determined using an enzyme immunoassay with a polyclonal antibody as the capture antibody (R528.7; a gift from J. Langeveld, Pepsan System BV, Lelystad, The Netherlands) and the MAb SAF83 (from J. Grassi) and an alkaline phosphatase kit as the detection system. PrPres immunodetection was carried out by optic densitometry measured at 414 nm. Recombinant murine PrP (Prionics) was used to calibrate the amounts of PrPres present in the treated and untreated ScN2a cells.

Infection of animals. C57BL6 mice (age, 8 weeks; weight, 20 g) were obtained from Harlan (Gannat, France). The animals received water and food ad libitum. The mice were injected intraperitoneally with the 6PB1 mouse-adapted BSE strain. One hundred microliters of a 2% (wt/vol) brain homogenate (titrated as $10^{7.2}$ 50% lethal doses/ml) were injected intraperitoneally. Ten mice were inoculated with 100 μl of negative mouse brain homogenate as a control group.

Treatment of animals. The protocol applied here allows a rapid estimation of the peripheral accumulation of PrPres during the incubation period. Animals were treated with the different drugs (5 animals/group) by the intraperitoneal route for 3 weeks starting the day following the day of inoculation. The drugs used were quinacrine (10 mg/kg), chlorpromazine (5 mg/kg), the two drugs in combination, and the amphotericin B derivatives MS-8209 (25 mg/kg) and MS-1191 (10 mg/kg). The mice in the treatment control group (10 mice) were treated with a sterile glucose solution (5% [wt/vol]). The mice were sacrificed 30 days after infection, the time when spleen PrPres reaches a plateau in untreated animals (3).

Protein analysis (enzyme immunoassay). Mice were killed by cervical disruption 30 days after inoculation. The spleens were frozen immediately in liquid nitrogen and kept at -80°C until they were used. The spleen homogenates were suspended at 10% (wt/vol) in a 5% glucose solution. PrPres purification was performed with the BSE purification kit (Bio-Rad) (11) adapted to the murine spleen. Four-hundred-microliter aliquots were digested with a final concentration of 20 μg of proteinase K/ml for 10 min at 37°C. One-hundred-microliter aliquots (representing one-third of the resuspended pellet and 6.67 mg of spleen equivalent) were added to duplicate wells on enzyme immunoassay plates (CEA) coated with the mouse-specific MAb SAF53 (16). The plates were incubated for 1 h at room temperature in the dark and washed three times, 100 μl of MAb 11C6-G4 (10) was added, and the plates were incubated for 1 h. After several washes, 100 μl of Ellman solution (CEA) (29) was added, and the plates were incubated for at least 30 min. PrPres immunodetection was carried out by optic densitometry measured at 414 nm.

RESULTS

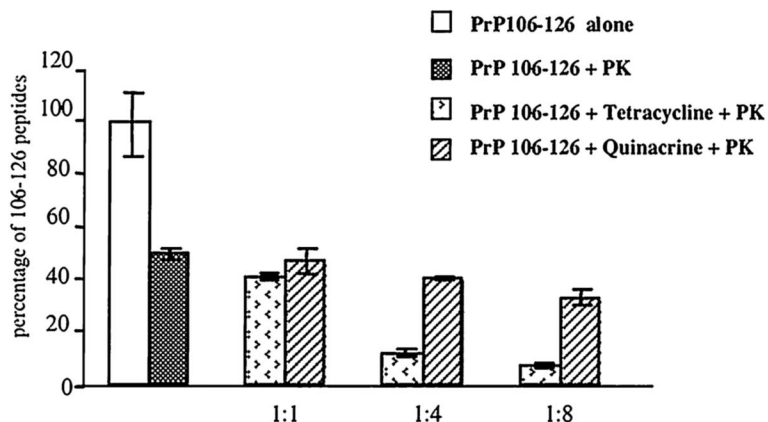
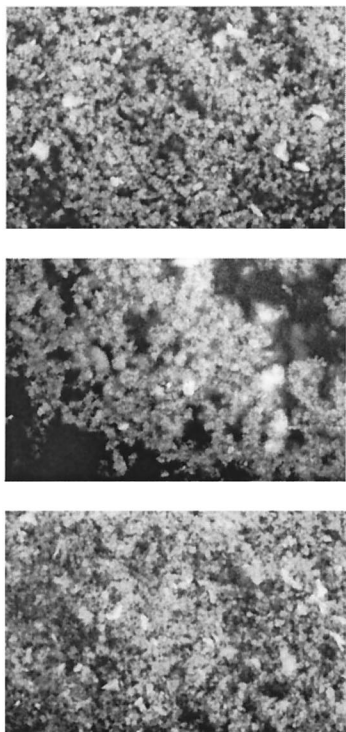
Quinacrine binds to PrP peptides. The ability of quinacrine to interact with PrP aggregates was investigated using synthetic peptides homologous to residues 82 to 146 and 106 to 126 of human PrP that have a high propensity to adopt a β -sheet secondary structure and to form amyloid fibrils (14, 36). The intrinsic fluorescence of quinacrine and tetracycline allowed us to directly observe their binding capacities by coincubation with the amyloid fibrils. Thioflavin T, an amyloid-binding fluorochrome, was used as a positive control. As shown in Fig. 1, fluorescence microscopy revealed identical labeling with quinacrine, tetracycline, and thioflavin T. These results indicate that quinacrine has the ability to interact with the PrP106-126 peptide (Fig. 1A, top) and the PrP 82-146 peptide (Fig. 1B, top).

Quinacrine does not modify the proteinase K resistance properties of PrP peptides. Once synthetic PrP peptides are allowed to polymerize into amyloid fibrils, they are characterized by high resistance to proteinase K. As quinacrine has been shown to bind to PrP peptides, we investigated whether it could affect the proteinase K resistance properties of the peptides. The results shown in the graphs in Fig. 1 indicated that the addition of quinacrine to the peptides up to a ratio of 8 to 1 had no significant effect on their proteinase K resistance. In contrast, tetracycline reduced the protease resistances of both the PrP106-126 and PrP82-146 peptides in a dose-dependent manner (34). These results probably reflect the inability of quinacrine to disaggregate the fibrils of synthetic peptides once they are formed.

Quinacrine cannot reverse the protease resistance of PrPres. To test the ability of quinacrine to affect the protease resistance of disease-specific PrP, PrPres was partially extracted from brain tissue of sporadic- and variant-CJD patients, 263K-infected hamsters, and 139A-infected mice and incubated with 20 μM to 2 mM quinacrine or tetracycline for 48 h prior to proteinase K digestion. While treatment of the samples with tetracycline resulted in a decrease in PrPres to an extent which was dependent on the drug concentration, as described previously (15, 34), quinacrine had no effect (Fig. 2). Again, this was a reflection of the inability of quinacrine to disaggregate bona fide PrPres from infectious brains.

Quinacrine reduces cyclic amplification of PrPres. It has been reported that PrPres can be amplified in the presence of an excess of PrPc by cycles of incubation and sonication (30). To verify whether PrPc-to-PrPres conversion was affected by quinacrine, the compound was added to the reaction mixture

A.



B.

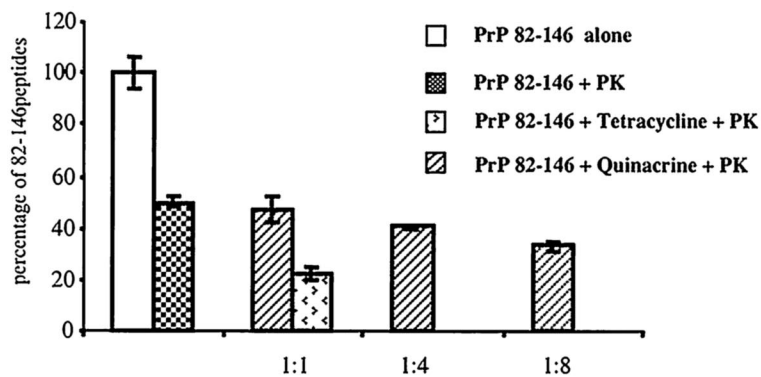
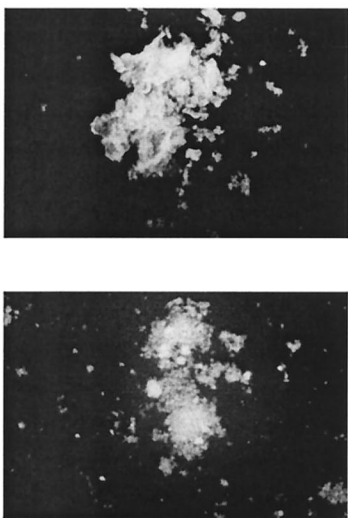


FIG. 1. Binding of quinacrine, tetracycline, and thioflavin T to PrP106-126 and PrP82-146 peptides and their effects on proteinase K (PK) resistance of these peptides. (A) Fluorescence microscopy of PrP106-126 aggregates incubated with quinacrine (top), tetracycline (middle), or thioflavin T (bottom) and effects of quinacrine and tetracycline on proteinase K resistance of the peptide (graph). (B) Fluorescence microscopy of PrP82-146 aggregates incubated with quinacrine (top) or tetracycline (bottom) and effects of quinacrine and tetracycline on proteinase K resistance of the peptide (graph). The extents of proteolysis of PrP106-126 (A) and PrP82-146 (B) in the absence or presence of quinacrine or tetracycline were calculated as the percentage of peptide present in the pellet compared to the total amount originally present.

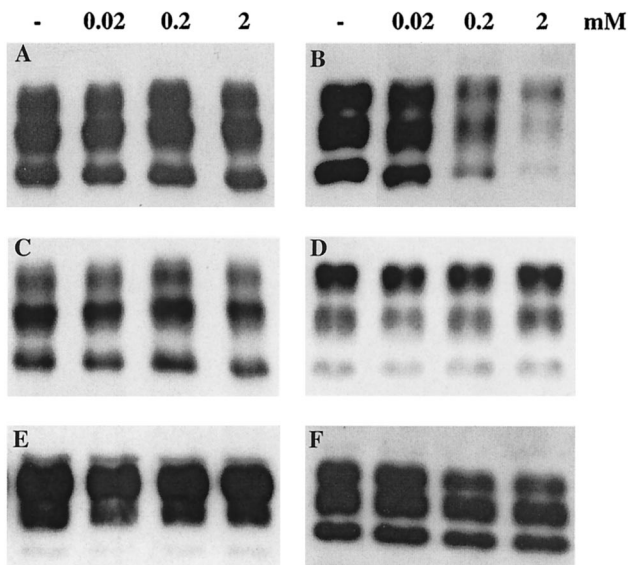


FIG. 2. Effects of quinacrine (A and C to F) and tetracycline (B) on the protease resistance of a variety of PrPres isoforms. Partially purified PrPres was incubated with increasing concentrations of the compounds (indicated at the top; -, absence of treatment) and then digested with proteinase K. (A and B) Sporadic CJD with type 1 PrPres; (C) sporadic CJD with type 2 PrPres; (D) variant CJD; (E) 263K-infected hamster; (F) 139A-infected mouse. The immunoblot analysis was carried out using the MAb 3F4 (A to E), and the polyclonal antibody PrP95-108 (F).

(i.e., a 1:300 dilution of 263K scrapie-infected hamster brain homogenate in normal hamster brain homogenate) at concentrations ranging from 2 to 10 mM before cycling. Control experiments were carried out using tetracycline (as a molecule that interacts with and affects the physicochemical properties of PrPres) and melatonin (as a molecule binding to an amyloid protein that is irrelevant here, namely, Aβ of Alzheimer's

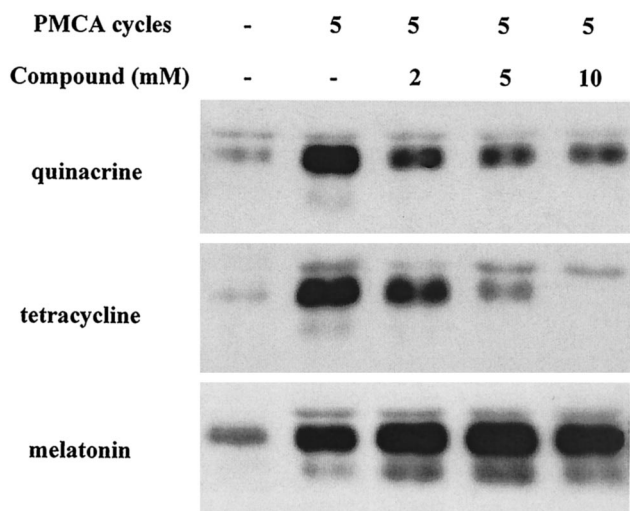


FIG. 3. Effects of quinacrine, tetracycline, and melatonin on cyclic amplification of PrPres from scrapie-infected hamster brain. The number of cycles of incubation-sonication and the concentrations of the compounds are indicated. -, none; PMCA, protein misfolding cyclic amplification.

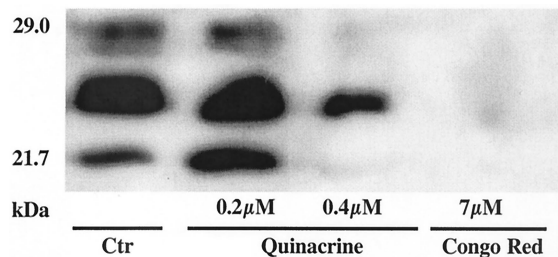


FIG. 4. Quinacrine inhibits PrPres accumulation in N2a58/22L cells. Anti-PrP immunoblots with SAF75 of N2a58/22L cells that were incubated with quinacrine and Congo red (three administrations) for 3 days are shown. Control (Ctr) corresponds to the absence of treatment.

disease). Quinacrine reduced and tetracycline inhibited PrPres amplification. By contrast, melatonin had no effect (Fig. 3).

Quinacrine inhibits PrPres accumulation in N2a58/22L and ScN2a cells. The inefficiency of quinacrine in disrupting PrP aggregates and reverting the protease resistance phenotype led us to investigate its ability to inhibit PrPres accumulation in cellular models. When scrapie-infected cells were treated once a day for 3 days with quinacrine at 0.4 μM concentration, the PrPres signal decreased significantly without any toxicity (Fig. 4) (cytotoxicity was tested from 0.02 to 200 μM and began at 1 μM [data not shown]). Congo red (7 μM), used as a positive control, completely abolished the PrPres signal (22). Similar data were obtained using conventional ScN2a cells (data not shown).

Quinacrine reduces microglia-mediated killing of ScN2a cells. Previous studies showed that microglia selectively kill neuroblastoma cells actively producing PrPres (2). In this assay, microglia cells were cocultured with either ScN2a cells or the uninfected N2a control cells in the presence or absence of 0.2 μM quinacrine. The number of microglia added was not sufficient to reduce the survival of N2a cells. In contrast, microglia reduced the survival of ScN2a cells, an effect that was partially blocked by the presence of quinacrine (Fig. 5).

Quinacrine is less efficient in inhibiting PrPres accumulation in ScGT1 cells. (i) **Single treatment lasting 3 days.** In ScGT1 cells, quinacrine did not entirely inhibit the accumulation of PrPres, even at 4 μM (2 μg/ml), which corresponds to the threshold of cytotoxicity (Fig. 6b). At this concentration, a twofold decrease in the PrPres signal was observed compared to that in untreated cells. When the concentration was in-

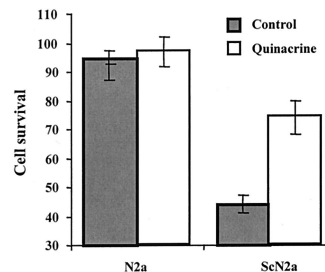


FIG. 5. Quinacrine protects ScN2a cells against microglia-mediated killing. The survival of prion-infected (ScN2a) and uninfected (N2a) neuroblastoma cells cocultured with microglia in the presence (open bars) or absence (shaded bars) of 0.2 μM quinacrine is illustrated. The values given are the means ± standard deviations of triplicate experiments repeated twice (six observations).

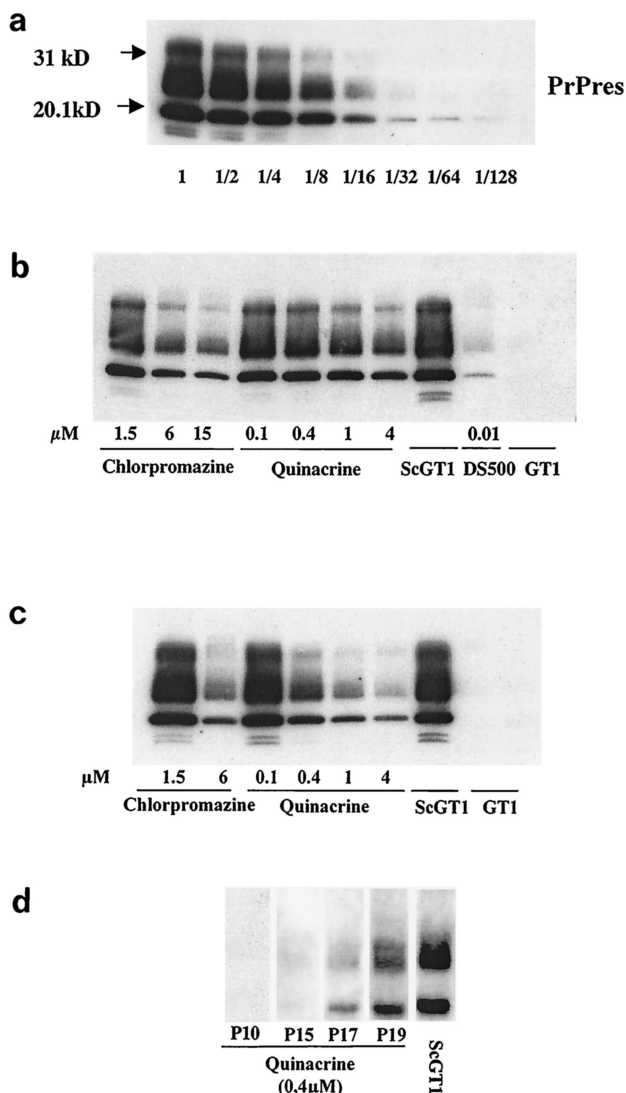


FIG. 6. In vitro evaluation by Western blotting (with SAF83) of the efficacy of treatment with quinacrine, chlorpromazine, and DS500 on PrPres accumulation in ScGT1 cells. (a) Dilution scale of ScGT1 cells (lane 1 corresponds to 300 μg of total protein). (b) Effects of a range of quinacrine and chlorpromazine concentrations and of DS500 (0.01 μM) after a unique 4-day treatment. (c) Same doses of chlorpromazine, quinacrine, and DS500 applied three times in 6 days. (d) Effects of 0.4 μM quinacrine treatment every day for 3 weeks and at several passages (P) after treatment was stopped.

creased to 10 μM, to try to achieve a more efficient PrPres inhibition as described by Korth et al. (18), complete cytotoxicity was observed. Chlorpromazine at 15 μM (5 μg/ml) induced a higher (threefold) PrPres signal decrease with limited toxicity. As a comparison, a 10-fold decrease in the PrPres signal was observed in the absence of toxicity with high-molecular-weight dextran sulfate (DS500 at 0.01 μM, or 5 μg/ml), used here as a positive treatment control.

(ii) Three treatments over 6 days. With repeated treatments, a 16-fold decrease in the PrPres signal was observed with a 4 μM quinacrine treatment, whereas a 0.4 μM treatment decreased the signal 8-fold (Fig. 6c). The maximum concentration of chlorpromazine used in this treatment regimen was 6

μM, which decreased PrPres accumulation 10-fold. Repeated administration of DS500 was cytotoxic—effects on cell adherence were observed even at 0.01 μM; therefore, it could not be used to evaluate PrPres accumulation.

(iii) Long-term treatment. ScGT1 cells were treated with 0.4 μM quinacrine every day for 3 weeks (21 doses). With this treatment, PrPres accumulation was entirely inhibited over 12 passages posttreatment (i.e., 12 weeks) but reappeared after 15 passages (Fig. 6d).

Quinacrine and chlorpromazine do not inhibit PrPres accumulation in vivo. A rapid model based on the detection of PrPres accumulation in the spleens of intraperitoneally scrapie-infected mice was used as previously described (3). The choice of the quinacrine concentration administered (10 mg/kg of body weight) was based on the doses given to humans in compassionate CJD treatment (300 mg/day). It corresponded to a two-fold dose administered to humans. No curative effect of quinacrine was observed at 10 mg/kg/day, and indeed, a slightly increased PrPres signal in the spleen was seen in animals infected with an experimental mouse-adapted BSE strain (6PB1) (Fig. 7). This was confirmed by immunohistochemistry, where at this early stage of infection (30 days postinfection), PrPres aggregates were detected in the spleens of quinacrine-treated animals and not in infected untreated controls (data not shown).

The dose of chlorpromazine administered by the intraperitoneal route was limited to 5 mg/kg because of toxicity, and no effect on PrPres was observed.

We also sought to determine whether a synergic effect of quinacrine and chlorpromazine could be obtained by combining the two drugs, but even in association, quinacrine did not induce any decrease in the PrPres signal.

In contrast, a ≥3-fold decrease in the PrPres signal was

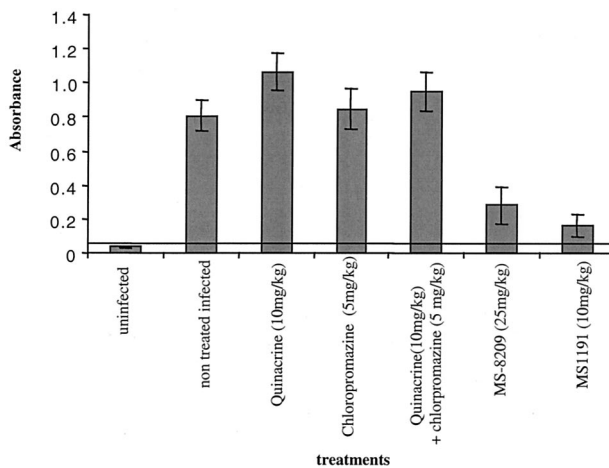


FIG. 7. Evaluation by enzyme immunoassay of the efficacies of different drugs in reducing PrPres accumulation in the spleens of scrapie-infected mice. Mice infected intraperitoneally with the 6PB1 strain were treated intraperitoneally each day for 3 weeks with quinacrine alone (10 mg/kg), chlorpromazine alone (5 mg/kg), both drugs, and MS-8209 (25 mg/kg) or MS1191 (10 mg/kg). The PrPres concentrations in the spleens of the animals after 30 days were evaluated by optical densitometry. Day 30 is the time when the scrapie PrP concentration reaches a plateau in this organ (3). The horizontal line at an absorbance of 0.08 corresponds to the cutoff, calculated as 2.5 times the mean absorbance of the negative controls.

observed with a daily intraperitoneal administration of the polyene antibiotics MS-8209 (25 mg/kg) and MS-1191 (10 mg/kg), used as a positive treatment control and for which clinical efficiency had been previously reported in several *in vivo* models (1). Moreover, preliminary experiments on a limited number of mice infected by the experimental BSE strain and treated at the beginning of the clinical phase (three animals per group) did not show any clinical improvement or increase in survival time with quinacrine and chlorpromazine used either alone or in association (data not shown).

DISCUSSION

To date, there is no effective therapy for prion diseases. Recently, Korth et al. presented quinacrine as a potentially good candidate for human treatment based on its ability to efficiently inhibit PrPres accumulation in ScN2a cells. The published results indicated that quinacrine "cured" the cells (i.e., it abolished the PrPres signal) at 0.4 μ M (0.2 μ g/ml) with three repeat treatments (18). Previous studies had shown similar results with ScNB cells, another scrapie-infected neuroblastoma cell line; the efficient concentration with a unique treatment was 2 μ M (1 μ g/ml) (12). The use of this molecule for the treatment of unrelated human disorders and its ability to penetrate the blood-brain barrier have led to its use for human CJD treatment (20). Twenty patients clinically affected with CJD have been included in the French human quinacrine treatment cohort since August 2001, but no significant improvement in clinical status could be observed for any of them (A. Alperovitch, personal communication).

We have investigated the possible mechanism of action of quinacrine on prion replication to assess the relevance of such treatment by using different experimental models. The efficiency of quinacrine was tested in cell-free systems (PrP binding, proteinase K resistance, and PrPres amplification), in different cellular models (ScN2a and ScGT1 cells), and *in vivo*. On the whole, both *in vitro* and *in vivo* studies led to a reassessment of the efficiency described both for this drug and for chlorpromazine, a drug also proposed for compassionate treatment but rapidly abandoned because of its adverse effects (i.e., it leads to a therapeutic coma). In ScN2a cells, we reproduced the data described by Doh-Ura et al. and by Korth et al. (12, 18). Moreover, we observed potentially important indirect effects of quinacrine, namely, that neuroblastoma cells treated with high concentrations of quinacrine were resistant to the toxicity of PrP peptides (data not shown) and increased survival of quinacrine-treated ScN2a cells cocultured with microglia (Fig. 5); the latter suggested that quinacrine treatment and inhibition of PrPres formation reversed the infection-induced changes in the cell membrane that are recognized by microglia. Conversely, in ScGT1 cells, only subtoxic doses of quinacrine (4 μ M, i.e., 10 times higher than the dose described as being effective in ScN2a cells [18]) and chlorpromazine efficiently decreased PrPres accumulation after a single treatment over 3 days, or even with repeated treatments over 6 days, in contrast with other molecules, such as DS500 and MS8209, which were effective with a single treatment at nontoxic doses. Nevertheless, ScGT1 cells could be cured without toxicity by a long treatment (every day for 3 weeks) with 0.4 μ M quinacrine, but this effect was not permanent, as PrPres reappeared 4 months

after the treatment was stopped. Following these different results in the various tissue culture models, we wanted to investigate in detail the mechanism by which this molecule could interfere with prion replication, and in particular its binding to, and interaction with, PrP. We showed that this molecule, as opposed to controls, exhibits binding to peptides qualitatively similar to that observed with tetracycline or thioflavin T. Thus, we expected an effect of quinacrine on the protease resistance of PrP aggregates. However, it did not display any defibrillogenic effect on preformed synthetic peptide fibrils, nor did it reduce PrPres proteinase K resistance in different brain tissues taken from CJD patients or experimentally infected rodents. This suggests that if quinacrine cannot disrupt preformed PrPres aggregates, its effects during the course of the disease may be weak, as degradation is very slow in the brain, where the aggregates cause neuronal damage. However, using the protein misfolding cyclic amplification method, we found that quinacrine decreased *de novo* PrPres synthesis. In this regard, we noted that this effect could not be previously detected with a one-step PrPres *in vitro* conversion (12), which is in line with the necessity of repeated *in vitro* treatments to observe a curing effect. Thus, once aggregates exist, quinacrine would have no effect, although it would decrease *de novo* formation of PrPres.

We then investigated the relevance of a quinacrine treatment in an experimental infected-animal model. We first investigated its efficiency in decreasing PrPres replication in the lymphoreticular system by using a rapid *in vivo* model. Following such studies, we also wanted to know if we could prevent PrPres propagation to the central nervous system. The absence of efficiency in reducing the accumulation of PrPres in the spleens of mice after a 3-week treatment was consistent with the *in vitro* results obtained in ScGT1 cells. Furthermore, our preliminary results treating mice in early stages of clinical disease with 10 mg of quinacrine/kg were consistent with recent data which indicated that oral treatment of a murine model of CJD with quinacrine (also at 10 mg/kg/day) after intracerebral inoculation did not lead to any increased survival compared to controls (8). The dose of 10 mg/kg, twice the dose currently used in humans that leads to hepatotoxicity and cessation of treatment in some patients, appeared to be tolerated by mice in this study. In the present studies, not only did we fail to find a curative effect of this drug on PrPres accumulation in the lymphoreticular system, but the accumulation even increased somewhat. This suggests that quinacrine induces an imbalance between the synthesis and catabolism of PrPres. Quinacrine is known to have a tropism for lysosomes, which are suspected to play a role in the synthesis and/or accumulation of PrPres (21). However, the complexity of intercellular relations between different cell populations of the spleen and the distribution of the drug might explain the discrepancy between our *in vitro* and *in vivo* data. Moreover, the existence of different physical states of PrPres in cultured cells and in the organs could also explain in part these divergent observations. Our investigations confirmed the capacity of quinacrine to interfere with PrPres formation, with varying efficiencies in different cell lines. The drug did not affect resistance to proteinase K digestion of PrP peptides and PrPres from various sources and failed to show an effect on PrPres accumulation in the spleens of scrapie-inoculated mice. Taken together, these

data do not support the potential therapeutic efficiency of quinacrine and underline the urgency of developing new therapeutic approaches with a mechanistic analysis and the necessity to test potential antiprion drugs in animal models once they have been screened *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the European Community (QLK3-2001-00283 and BMH4-CT98-6011) and the Department of Social Services, Italian Ministry of Health (RF 2001-96).

We are grateful to S. Lehmann for N2a58/22L and ScGT1 cells, to J. Grassi for the antibodies SAF75, SAF53, and SAF83, and to J. Langeveld for the antibody R528.7.

REFERENCES

- Adjou, K. T., N. Privat, S. Demart, J. P. Deslys, M. Seman, J. J. Hauw, and D. Dormont. 2000. MS-8209, an amphotericin B analogue, delays the appearance of spongiosis, astrogliosis and PrPres accumulation in the brain of scrapie-infected hamsters. *J. Comp. Pathol.* **122**:3–8.
- Bate, C., S. Reid, and A. Williams. 2001. Killing of prion-damaged neurones by microglia. *Neuroreport* **12**:2589–2594.
- Beringue, V., F. Lamoury, K. T. Adjou, T. Maignien, M. Demoy, P. Couvreur, and D. Dormont. 2000. Pharmacological manipulation of early PrPres accumulation in the spleen of scrapie-infected mice. *Arch. Virol. Suppl.* **16**:39–56.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**:1309–1311.
- Caughey, B., D. Ernst, and R. E. Race. 1993. Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J. Virol.* **67**:6270–6272.
- Caughey, B., G. J. Raymond, D. A. Kocisko, and P. T. Lansbury, Jr. 1997. Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.* **71**:4107–4110.
- Caughey, W. S., L. D. Raymond, M. Horiuchi, and B. Caughey. 1998. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12117–12122.
- Collins, S. J., V. Lewis, M. Brazier, A. F. Hill, A. Fletcher, and C. L. Masters. 2002. Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann. Neurol.* **52**:503–506.
- Demaimay, R., J. Harper, H. Gordon, D. Weaver, B. Chesebro, and B. Caughey. 1998. Structural aspects of Congo red as an inhibitor of protease-resistant prion protein formation. *J. Neurochem.* **71**:2534–2541.
- Demart, S., J. G. Fournier, C. Creminon, Y. Frobert, F. Lamoury, D. Marce, C. Lasmezas, D. Dormont, J. Grassi, and J. P. Deslys. 1999. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**:652–657.
- Deslys, J. P., E. Comoy, S. Hawkins, S. Simon, H. Schimmel, G. Wells, J. Grassi, and J. Moynagh. 2001. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* **409**:476–478.
- Doh-Ura, K., T. Iwaki, and B. Caughey. 2000. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. Virol.* **74**:4894–4897.
- Farquhar, C. F., and A. G. Dickinson. 1986. Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J. Gen. Virol.* **67**:463–473.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, and F. Tagliavini. 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**:543–546.
- Forloni, G., S. Iussich, T. Awan, L. Colombo, N. Angeretti, L. Girola, I. Bertani, G. Poli, M. Caramelli, M. G. Bruzzone, L. Farina, L. Limido, G. Rossi, G. Giaccone, J. W. Ironside, O. Bugiani, M. Salmona, and F. Tagliavini. 2002. Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:10849–10854.
- Grassi, J., C. Creminon, Y. Frobert, P. Fretier, I. Turbica, H. Rezaei, G. Hunsmann, E. Comoy, and J. P. Deslys. 2000. Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch. Virol. Suppl.* **16**:197–205.
- Kimberlin, R. H., and C. A. Walker. 1986. Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:409–413.
- Korth, C., B. C. May, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 2001. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9836–9841.
- Ladogana, A., P. Casaccia, L. Ingrosso, M. Cibati, M. Salvatore, Y. G. Xi, C. Masullo, and M. Pocchiari. 1992. Sulphate polyions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J. Gen. Virol.* **73**:661–665.
- Love, R. 2001. Old drugs to treat new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **358**:563.
- Lullmann-Rauch, R., R. Pods, and B. von Witzendorff. 1996. The antimalarials quinacrine and chloroquine induce weak lysosomal storage of sulphated glycosaminoglycans in cell culture and *in vivo*. *Toxicology* **110**:27–37.
- Milhavet, O., A. Mange, D. Casanova, and S. Lehmann. 2000. Effect of Congo red on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells. *J. Neurochem.* **74**:222–230.
- Nishida, N., D. A. Harris, D. Vilette, H. Laude, Y. Frobert, J. Grassi, D. Casanova, O. Milhavet, and S. Lehmann. 2000. Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J. Virol.* **74**:320–325.
- Piccardo, P., J. P. Langeveld, A. F. Hill, S. R. Dlouhy, K. Young, G. Giaccone, G. Rossi, M. Bugiani, O. Bugiani, R. H. Melen, J. Collinge, F. Tagliavini, and B. Ghetti. 1998. An antibody raised against a conserved sequence of the prion protein recognizes pathological isoforms in human and animal prion diseases, including Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Am. J. Pathol.* **152**:1415–1420.
- Pocchiari, M., S. Schmittinger, and C. Masullo. 1987. Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J. Gen. Virol.* **68**:219–223.
- Priola, S. A., A. Raines, and W. S. Caughey. 2000. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**:1503–1506.
- Prusiner, S. B. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**:1515–1522.
- Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth, and G. Glenner. 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**:349–358.
- Rodolfo, K., R. Hassig, K. L. Moya, Y. Frobert, J. Grassi, and L. Di Giambardino. 1999. A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport. *Neuroreport* **10**:3639–3644.
- Saborio, G. P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**:810–813.
- Soto, C., R. J. Kascsak, G. P. Saborio, P. Aucouturier, T. Wisniewski, F. Prelli, R. Kascsak, E. Mendez, D. A. Harris, J. Ironside, F. Tagliavini, R. I. Carp, and B. Frangione. 2000. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* **355**:192–197.
- Supattapone, S., H. O. Nguyen, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, and M. R. Scott. 1999. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14529–14534.
- Supattapone, S., H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F. C. Szoka, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, and M. R. Scott. 2001. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J. Virol.* **75**:3453–3461.
- Tagliavini, F., G. Forloni, L. Colombo, G. Rossi, L. Girola, B. Canciani, N. Angeretti, L. Giampaolo, E. Peressini, T. Awan, L. De Gioia, E. Ragg, O. Bugiani, and M. Salmona. 2000. Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **300**:1309–1322.
- Tagliavini, F., R. A. McArthur, B. Canciani, G. Giaccone, M. Porro, M. Bugiani, P. M. Lievens, O. Bugiani, E. Peri, P. Dall'Ara, M. Rocchi, G. Poli, G. Forloni, T. Bandiera, M. Varasi, A. Suarato, P. Cassutti, M. A. Cervini, J. Larsen, M. Salmona, and C. Post. 1997. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* **276**:1119–1122.
- Tagliavini, F., F. Prelli, L. Verga, G. Giaccone, R. Sarma, P. Gorevic, B. Ghetti, F. Passerini, E. Ghibaudi, G. Forloni, et al. 1993. Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106–147 form amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9678–9682.

Par cette étude, nous avons pu observer que les effets de la quinacrine étaient variables et dépendaient du modèle d'étude considéré. Cette molécule a par la suite fait l'objet d'autres études par l'équipe de Prusiner qui a montré qu'elle pouvait être efficace *in vivo* à des concentrations plus élevées (Paris Lutécia, Décembre 2003, congres.igh.cnrs.fr/Prion-Therapeutics-2002). Les résultats de cette équipe semblaient donc impliquer une éventuelle sous-estimation de la dose injectable aux animaux dans notre travail. Afin de répondre à ces questionnements, nous avons déterminé, que la dose maximale injectable n'entraînant aucune toxicité hépatique par voie intrapéritonéale au modèle souris C57Bl6, était de 60 mg/kg/jour pendant 10 jours (pour mimer les 10 traitements lors de l'étude d'efficacité après inoculation). L'injection intrapéritonéale de quinacrine à 60mg/kg 2 fois par semaine a montré que 30 jours après inoculation, elle était plus efficace qu'à la dose de 10mg/kg tous les jours, puisqu'elle réduisait de moitié l'accumulation de PrPres dans la rate comparativement à des animaux non traités. Cependant, en regard de l'efficacité des héparanes mimétiques, HM2602 [2] ou bien du pentosan polysulfate, administrés aux animaux durant la même étude qui permettent d'inhiber totalement l'accumulation de PrPres, l'efficacité de la quinacrine semble faible. Néanmoins, la capacité de la quinacrine à se lier à la PrPc, à diminuer sa conversion et le développement de nouveaux dérivés qui semblent agir sur la multimérisation de la PrPSc, laissent présumer qu'une étude approfondie de ce composé pourrait permettre de potentialiser son effet .

I-2 Evaluation d'autres molécules

I-2.1 Les Héparanes Mimétiques

Les HM (ou RGTA : Regenerating Agents), développés tout d'abord pour leur capacité de régénération tissulaire et de cicatrisation [232] sont des polymères de dextran possédant des analogies structurales et fonctionnelles avec les héparanes sulfates naturels et ont montré une très bonne efficacité vis-à-vis de l'accumulation de la PrPres à la fois *in vitro* et *in vivo* [2, 328]. Cependant, le HM2602 dont l'efficacité a été démontrée dans deux publications, contient un groupement benzénique qui pourrait entraîner un effet potentiellement cancérogène. Nous avons testé une nouvelle génération de molécules dont la composition chimique varie selon le pourcentage de groupes SO^{3-} , benzylamide, COO^- amine et autres groupements.

I-2.1.1 Matériel et Méthodes

I-2.1.1.1 Analyse de l'efficacité des molécules in vitro

Les héparanes mimétiques (HM) (Pr D.Barritault, University of Paris XII, France) ont été obtenus par substitution chimique contrôlée du Dextran Sulfate T40 avec des taux définis de carboxyméthyl (CM), sulfate (S) groupes hydrophobes comme le benzylamide (Bn) ou la phénylalanine.

L'efficacité in vitro a été testée sur des cellules ScGT1 par la mesure de l'inhibition de l'accumulation de la PrPres aux concentrations de 2 et 10 $\mu\text{g/mL}$ durant 3 jours et analysée par Western Blot selon des méthodes identiques à celles décrites dans la première partie de ce chapitre.

I-2.1.1.2 Analyse de l'efficacité des molécules in vivo

La molécule qui a montré la meilleure efficacité in vitro a été évaluée in vivo dans le modèle dit « rapide » de souris chez lequel 35 jours après inoculation, la PrPres atteint un plateau d'accumulation dans la rate [33]. Les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 100 μl d'homogénat à 2% de cerveau de souris atteinte de tremblante C506M3 et les souris contrôles ont été inoculées avec la même quantité d'homogénat de cerveau sain à 2%. Le lendemain de l'inoculation, les souris ont été traitées à raison de 25mg/kg/jour de la molécule d'intérêt ou du HM2602. Le cut-off calculé par 0,9 fois la moyenne des échantillons négatifs représente le seuil au-dessus duquel on considère les animaux positifs pour la PrPres.

I-2.1.2 Résultats

I-2.1.2.1 Analyse de l'efficacité in vitro

L'analyse de l'efficacité de la nouvelle génération d'héparanes mimétiques a montré qu'une seule molécule (encadrée dans le tableau n°8) ne montrait comme pour le HM2602 aucune toxicité à la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ et une efficacité significative à la fois à 2 et 10 $\mu\text{g/mL}$. Concernant les autres molécules, toutes possèdent une efficacité à 10 $\mu\text{g/mL}$ mais semblent conduire à une légère toxicité vis-à-vis des cellules à cette concentration.

Structuralement, si l'on compare cette molécule au composé de référence HM2602 (indiqué en rouge dans le tableau), on note la présence des groupes carboxyméthyl et sulfate mais pas de groupements amine ni benzénique, ce qui la rend plus hydrophile et a priori moins

cancérigène.

Structure moléculaire	Toxicité à 10µg/ml	Efficacité (inhibition PrPres)	
		2 µg/ml	10µg/ml
HM2602 (CMDAS)	-	+	+
CMDA-t-octyl-S	-	-	+
CMDA-n-octyl-S	+/-	+/-	+
CMDA-isobutyl-S	+/-	+/-	+
CMDA-éthylexyl-S	+	+/-	+
CMDA-phénylalanine-Méthylsulfate	+/-	+/-	+
CMDA-phénylalanine-terbutylsulfate	+/-	+/-	+
CMDS	-	+	+
CMC	+/-	+	+
CMC-phénylalanine-méthylsulfate	+/-	+/-	+
B glycane carboxyméthylé moins sulfaté que CMDS	+/-	+/-	+
CMD-O-benzyléthersulfate	+/-	+	+

CMDAS: Carboxy Méthyl Dextran Amine Sulfate

CMC: CarboxyMéthyl Cellulose

Tableau n°8: Détermination de l'efficacité (+) et de la toxicité (+) des différents HM testés.

La structure des autres composés et l'étude de leur efficacité rend difficile l'interprétation quant à un lien entre la structure du composé et son efficacité vis-à-vis de la réplication de l'agent infectieux, puisque tous étant efficaces in vitro à 10µg/mL, ils pourraient être potentiellement efficaces in vivo. Néanmoins, le composé CMDS qui montre la meilleure efficacité in vitro est aussi celui qui dans des études de régénération tissulaire a montré le meilleur potentiel (données fournies par l'équipe de D.Barrिताult). Compte tenu de ces données et de l'absence de toxicité sur les cellules de cette molécule à 10µg/mL, nous avons pris la décision d'approfondir notre étude sur les HM avec ce composé.

I-2.1.2.1.2 Analyse de l'efficacité des molécules in vivo

Compte tenu des résultats obtenus in vitro et du caractère plus hydrophile de la molécule CMDS qui pourrait lui conférer une plus grande capacité à passer la barrière

hématoencéphalique, nous avons testé son efficacité in vivo chez la souris C57Bl6 sur la réplication en périphérie de la PrPSc.

Les résultats obtenus dans la rate (figure n°12) 35 jours après inoculation montrent une efficacité similaire de la nouvelle molécule d'HM à celle du HM2602.

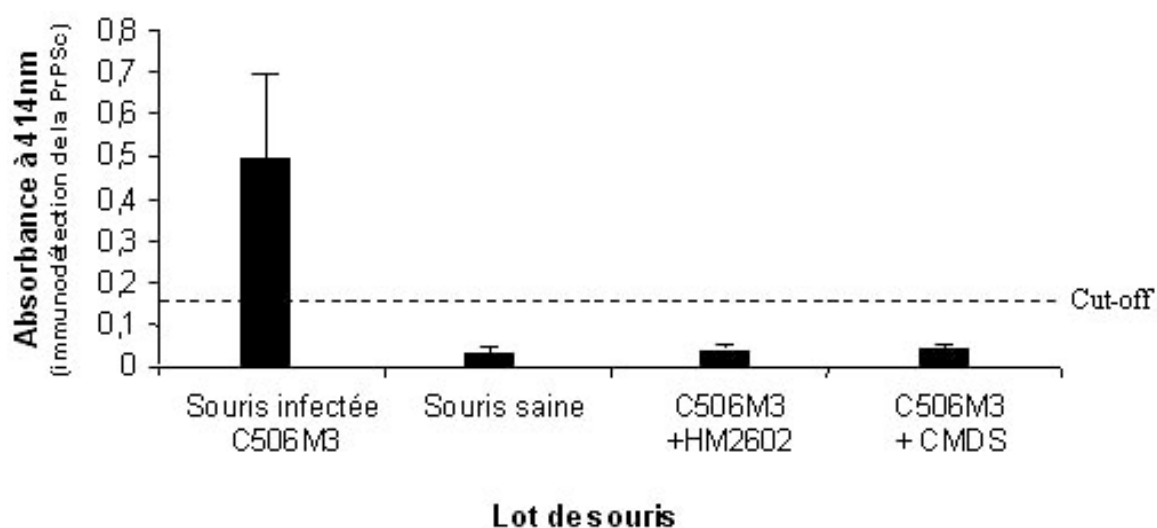


Figure n° 12: Effet du CMDS comparativement au HM2602 sur l'accumulation de la PrPSc dans la rate de souris infectées par la souche de tremblante C506M3.

I-2.2 Les porphyrines

Les porphyrines ont montré une bonne efficacité in vitro et in vivo [66]. Leur capacité à se lier et surtout à induire un changement de conformation des protéines donne à ces molécules un intérêt tout particulier compte tenu du mode de conversion de la PrPc en PrPres passant par une modification de conformation [99]. Nous avons dans un premier temps testé l'efficacité dans notre modèle cellulaire des porphyrines qui avaient montré une capacité significative à inhiber l'accumulation de PrPres dans d'autres modèles. Puis, nous nous sommes attachés à tester de nouveaux dérivés contenant des polarités différentes et des métalloporphyrines contenant des ions centraux variables (base libre, zinc, manganèse, ou fer) compte tenu de la littérature indiquant un rôle potentiel des métaux dans les processus de pathogénèse. Pour certains composés, des ions fluor ont été rajoutés afin d'augmenter la pénétration des porphyrines.

I-2.2.1 Matériel et méthodes

L'efficacité des molécules in vitro a été évaluée dans le modèle des cellules ScGT1 à raison de 2, 10 ou 30 μ M après 4 jours de culture en présence de la drogue. L'analyse par Western Blot a été réalisée suivant le même protocole que celui décrit pour l'évaluation des héparanes mimétiques.

I-2.2.2 Résultats

Les résultats indiqués dans le tableau n°9 montrent que pour obtenir une bonne efficacité des porphyrines, il est nécessaire de les appliquer sur les cellules à la concentration de 30 μ M, concentration qui peut se montrer plus ou moins toxique. Les deux seules molécules qui montrent une très bonne efficacité à 30 μ M et qui permettent de diminuer l'accumulation de PrPres totalement à 30 μ M et partiellement à 10 μ M et qui montrent une faible toxicité à 30 μ M sont les métalloporphyrines P17 et P23. P17 est une molécule précédemment décrite dans la littérature et P23 est un nouveau dérivé.

Porphyrines	Toxicité à 30 μ M	Efficacité (inhibition accumulation de PrPSc)	
		10 μ M	30 μ M
<u>Déjà publiées</u>			
P1=Fe(TDCmSO ₃ HPP)Cl	±	-	+
P7= Fe(T-N-Me-4-PyP)Cl ₅	++++	+	+
P10= Mn(TDCmSO ₃ HPCl ₈ P)Cl	±	-	+
P12=Fe PhtSO ₃ H	±	-	+
P17=Fe(T-4-SO ₃ H-PP)Cl	±	±	+
<u>Nouveaux dérivés</u>			
P15=H ₂ [T-F4-pNH(CH ₂) ₃ PO ₃ H ₂ PP]	-	-	-
P16=H ₂ [T-F4-pNH(CH ₂) ₃ PO(OCH ₂ H ₃) ₂ PP]	-	-	-
P18=Mn[T-F4-pNH(CH ₂) ₃ PO ₃ H ₂ PP]Cl	-	-	-
P19= Fe[T-F4-p(SCH ₂ COOH)PP]Cl	+	-	-
P23=Zn[T-F4-pNH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂ PP]	±	±	+

Tableau n°9: Evaluation de la toxicité (+) et de l'efficacité (+) des différentes porphyrines testées

Parmi tous les nouveaux dérivés testés (n=6), seule la P23 est efficace à 30 μ M. Si l'on

compare la structure de P17 et P23 sur la figure n°13, on constate qu'elles possèdent le même noyau aromatique mais différent par le type de métal qu'elles portent (zinc pour P23 et Fer pour P17) et la porphyrine P23 présente de plus longues chaînes substituées (NH(CH₂)₃-N(CH₃)₂, à la place du groupement SO₃H pour la porphyrine P17). Si l'on compare la métalloporphyrine avec tous les autres nouveaux dérivés, on observe que c'est la seule à posséder un atome de zinc, la présence de l'atome de zinc semble donc être plus importante que la longueur et la nature des chaînes ajoutées au noyaux aromatiques centraux. Par ailleurs, si l'on compare la métalloporphyrine P18 avec la P10 qui portent toutes deux un atome de manganèse, on constate que ce n'est pas la présence de l'atome de manganèse qui est importante pour l'effet vis-à-vis de l'accumulation de PrPres mais plutôt les chaînes substituants le noyau central. Il en est de même si l'on compare la métalloporphyrine P19 qui porte un atome de Fer central avec les métalloporphyrines P7, P12 et P17. Compte tenu de nos résultats et de ceux décrits dans des précédentes études, il semblerait donc que ce soit une association fine entre le métal central et les groupements substituants qui influence l'efficacité des porphyrines vis-à-vis de l'accumulation de PrPres.

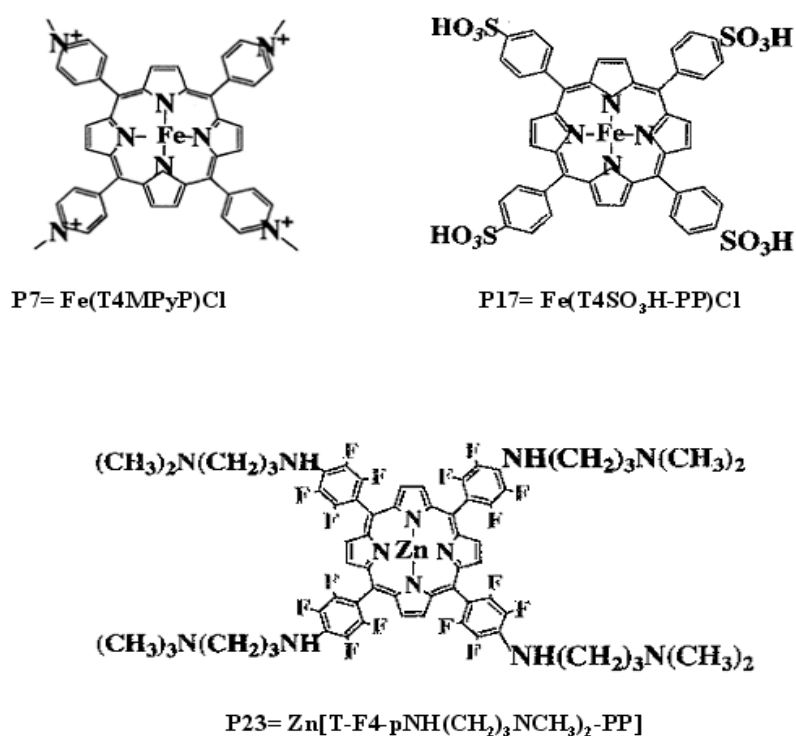


Figure n° 13: Structure des métalloporphyrines P7 et P17 testées par Caughey et le nouveau composé P23

Cette étude a donc permis de mettre en évidence une nouvelle métalloporphyrine qui pourrait posséder des propriétés intéressantes sur l'accumulation de la PrPres d'une part d'après son

efficacité in vitro et la présence d'ion fluor et d'autre part d'après des études réalisées en parallèle sur la décontamination de surface qui ont montré que seule cette métalloporphyrine était efficace dans cette fonction (communication personnelle du laboratoire).

L'administration de cette porphyrine à la souris infectée soit par la souche de tremblante C506M3 soit par la souche d'ESB adaptée à la souris 6PB1 a conduit à une très forte toxicité du produit chez l'animal entraînant des événements fibrotiques et une hypertrophie de la rate probablement en raison de la très mauvaise solubilité du produit qui devait être repris dans un solvant composé pour partie de DMSO et d'acide formique puis dilué en glucosé.

Conclusions

Les études effectuées sur le développement de nouvelles molécules thérapeutiques montrent que de nouveaux composés de classe thérapeutique différente ont été mis en évidence. De nouveaux HM dont la molécule de référence HM2602 avait montré de très bons résultats montrent que des molécules de type hydrophile contrairement à ce qui avait été décrit dans le papier de Adjou et al. peuvent avoir une très bonne efficacité, effet que l'on peut attribuer à la dose administrée puisque les animaux ont été traités tous les jours avec cette molécule tandis que dans la précédente étude réalisée sur le HM2602, le traitement consistait à traiter les animaux 2 fois par semaine à la même concentration. Malgré les très bons résultats obtenus pour cette molécule, de nouveaux composés ont été synthétisés avec une composition différant du HM2602 et du CMDS par la présence d'un noyau phénylalanine. Les résultats obtenus sur cette troisième génération de composés ont montré une très bonne efficacité *in vitro* sur des cellules ScGT1 avec une très faible toxicité et *in vivo*, dans un modèle de réplication périphérique précoce de l'agent (35 jours après inoculation). La très faible toxicité de ce nouveau composé permet de l'utiliser *in vivo* à de très fortes concentrations sans entraîner de dommages pour l'animal. Les résultats préliminaires montrant que ce nouveau composé permet de prolonger la survie des animaux de plus de 50% (au moment de l'écriture du manuscrit) indiquent que 10 injections intrapéritonéales du composé de faible poids moléculaire (40kDa) administrées au moment de l'inoculation permettraient de retarder ou même d'empêcher la propagation de l'agent infectieux depuis la périphérie vers le SNC. L'ensemble des résultats obtenus sur les HM et les données de plus en plus étoffées sur le rôle des glycosaminoglycans dans les maladies à prions semblent donc indiquer que le nouvel axe de recherche s'intéressant à cette nouvelle classe de molécules doit être poursuivi.

La mise en évidence d'une nouvelle métalloporphyrine portant un ion zinc efficace à la fois dans un modèle cellulaire et dans un modèle de décontamination de surface permet d'espérer pouvoir mettre au point de nouveaux composés potentiellement efficaces *in vivo*. Les perspectives envisagées pour ce nouveau composé sont d'une part la mise en place d'un nouveau procédé de synthèse de la métalloporphyrine P23 afin de la rendre soluble dans l'eau et d'éviter ainsi toute toxicité *in vivo*, ce qui par ailleurs permettrait éventuellement l'administration d'une dose plus forte *in vivo* pour envisager une meilleure efficacité. D'autre part, compte tenu des dernières données de la littérature indiquant un rôle du cuivre dans les maladies à prions [128], la substitution de cette porphyrine par un ion cuivre est à l'étude.

II- GENES INTERVENANT DANS LES MECANISMES DE LA GLYCOSYLATION ET NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

II- 1 Avant propos

La recherche d'un traitement efficace contre les ESST nécessite d'éclairer nos connaissances sur les mécanismes de pathogénèse de ces maladies. A ce jour, les récentes études tendent à montrer que ces affections sont la conséquence d'une protéine infectieuse malconformée qui s'accumule dans le SNC dans les stades tardifs entraînant un pronostic fatal dès les premiers signes de neurodégénérescence apparus. Cependant, la complexité de ces maladies réside dans l'existence de formes à la fois génétique, sporadique et infectieuses, de leur transmissibilité et de différentes souches plus ou moins transmissibles suivant les espèces donneuses et l'hôte receveur. L'étude de la glycosylation de la protéine semble indiquer que ce mécanisme post-traductionnel pourrait être impliqué dans ces différents phénomènes. Par ailleurs, le rôle des glycosaminoglycannes sur l'accumulation de la PrPres et sur le métabolisme de ces agents tend à montrer une fonction prépondérante de ces molécules lors du processus d'infection. Aujourd'hui, de nombreuses études s'intéressent aux différences de glycosylation entre les états normaux ou pathologiques, mais peu de données sont disponibles concernant les mécanismes qui régulent la glycosylation durant l'infection. Or, la glycosylation et plus précisément les enzymes impliquées dans ce processus ont déjà été décrites comme responsables des désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) qui forment un groupe de maladies hétérogènes entraînant un retard du développement et des anomalies hématologiques. Dans les maladies à prions, une étude a également suspecté que l'activité d'une enzyme spécifique devait être fortement dérégulée dans un modèle de hamster infecté par une souche de tremblante [313, 347]. Par ailleurs, récemment, la dérégulation du niveau de glycosylation du récepteur à l'insuline (IR) dans un modèle de neuroblastome murin infecté par l'agent de la tremblante (ScN2a) [258] a été constatée. Il semble donc évident que les mécanismes régulant la glycosylation peuvent être à l'origine de pathologies importantes et que ces phénomènes pourraient intervenir dans les processus de pathogénèse survenant dans les maladies à prions.

Nous avons donc étudié l'impact de la présence et de l'accumulation de la PrPres dans le modèle des cellules neuronales murines ScGT1 sur l'expression d'environ 200 gènes impliqués dans les mécanismes de la glycosylation afin d'évaluer les dérégulations potentielles de gènes survenant lors de l'infection (Article 2). Une seconde partie de ce chapitre a été consacrée brièvement aux dérégulations des gènes mis en évidence dans la précédente étude, dans un autre modèle cellulaire. L'ensemble de ces résultats pourraient dès lors éventuellement nous permettre de déterminer si les mécanismes sous-tendant la glycosylation peuvent représenter un nouvel axe de recherche, tant dans la compréhension des processus inhérents à la maladie que dans le développement d'un traitement efficace.

II-2 Article 2

“Glycosylation-related gene expression in prion diseases:

PrPSc accumulation in scrapie infected GT1 cells depends on β 1,4-linked GalNAc-4-SO₄ hyposulfation.”

Agnès Barret et al, January 4 2004, Journal of Biological Chemistry

**GLYCOSYLATION-RELATED GENE EXPRESSION IN PRION DISEASES.
PrP^{Sc} ACCUMULATION IN SCRAPIE INFECTED GT1 CELLS DEPENDS ON
 β 1, 4-LINKED GalNAc-4-SO₄ HYPOSULFATION***

**Agnès Barret^{1,2}, Lionel Forestier², Jean-Philippe Deslys¹,
Raymond Julien² and Paul François Gallet²**

1: Commissariat à l'Energie Atomique, Groupe d'Innovation Diagnostique et Thérapeutique des Infections à Prions, 18 route du Panorama, 92265, Fontenay-aux-Roses, France

2 UMR-INRA 1061, Génétique Moléculaire Animale, Institut des Sciences de la Vie et de la Santé, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

Corresponding authors: rjulien@unilim.fr, francois.gallet@unilim.fr

Running Title: 4-O-GalNAc hyposulfation in prion diseases

Several lines of evidence indicate that some glycoconjugates are efficient effectors of the cellular prion protein (PrP^C) conversion into its pathogenic (PrP^{Sc}) isoform. To assess how glycoconjugate glycan moieties participate in the biogenesis of PrP^{Sc}, an exhaustive comparative analysis of the expression of about 200 glycosylation-related genes was performed on prion-infected or not, hypothalamus-derived GT1 cells by hybridization of DNA microarrays, semi-quantitative RT-PCR and biochemical assays.

A significant up- (30 fold) and down- (17 fold) regulation of the expression of the *ChGn1* and *Chst8* genes, respectively, was observed in prion-infected cells. *ChGn1* and *Chst8* are involved in the initiation of the synthesis of chondroitin sulfate and in the 4-O-sulfation of non-reducing *N*-acetylgalactosamine residues, respectively. A possible role for a hyposulfated chondroitin in PrP^{Sc} accumulation was evidenced at the protein level and by determination of chondroitin and heparan sulfate amounts. Treatment of Sc-GT1 cells with an heparan mimetic (HM2602) induced an important reduction of the amount of PrP^{Sc}, associated with a total reversion of the transcription pattern of the *N*-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase 8. It suggests a link between the genetic control of 4-O-sulfation and PrP^{Sc} accumulation.

Prion diseases are characterized by the refolding of a normal cell surface glycoprotein,

the cellular prion protein (PrP^C), into an abnormal β -sheet-enriched form that is insoluble in detergents and called PrPres because it is partially resistant to proteinase K treatment (1-3). The primary structure of PrP^C contains two potential *N*-glycosylation sites on Asn 180 and Asn 196 in rat and mouse, several potential *O*-glycosylation sites and a C-terminal glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (4,5). It also contains specific glycosaminoglycan binding sites (6), including three that bind heparan sulfate proteoglycans which are specific components of the extracellular matrix (7). Glycans directly linked to PrP participate in the strain diversity, in cell to cell transfer of GPI-anchored PrP, allowing the transport of both normal and infectious protein and, as a consequence, the propagation of infection (8,9). Although the putative co-factors involved in the structural trans-conformation of PrP^C into the pathogenic form are not yet identified, glycans and/or glycoconjugates are proper candidates. *N*-glycosylation of PrP which was shown to interfere with PrPres accumulation, participates in the control of the accessibility of PrP determinants involved in its conversion, in relation to prion strain diversity and resistance (10-12). The relative membrane mobility allowed by the GPI anchor, leads the prion protein to confine in "rafts" (sphingolipid and cholesterol rich semi-ordered membrane microdomains), a location which is essential for the conformational conversion of PrP^C into PrP^{Sc} (13-15). The ability of PrP to bind heparan sulfate proteoglycans has evidenced the importance of these glycoconjugates for the

conversion process. Three regions of PrP, residues 23-52, 53-93, and 110-128, were identified as being able to bind heparin and heparan sulfate (7). They can also be involved in the PrP binding to the LRP/LR laminin receptor that leads to PrP endocytosis, thus suggesting that proteoglycans can modulate the sub-cellular trafficking of PrP (16,17). Nevertheless the effect of heparan sulfates seems to be paradoxical as they can stimulate or inhibit PrP^{Sc} formation. Depending on their level of sulfation, a variety of sulfated exogenous glycans such as dextran sulfate, pentosan polysulfate and heparan mimetic can inhibit PrP^{Sc} accumulation in cell cultures (18-23). Inversely, heparan sulfate has been shown to be associated with cerebral prion amyloid plaques and with the more diffuse PrPres deposits that appear in early stages of prion diseases (24,25). Moreover, heparinase III sensitive-heparan sulfate proteoglycans, that are probably hyposulfated, can participate in the metabolism of prions and stimulate the cell-free conversion of PrP^C into PrP^{Sc} (26-28). While the function of the complex formed by PrP and sulfated glycans has still to be determined, the molecular interactions between these two partners seem to have a pivotal role in prion diseases especially in the structural conformation of PrP.

In this study, to assess the genetic basis of the intervention of glycoconjugates in prion disorders, we used the derived hypothalamic neuronal GT1 cell line which is a proper model to simulate PrP^{Sc} accumulation that occurs at the late stages of the disease. Based on the use of a DNA micro-array, we examined the expression of genes related to glycosylation and showed that the PrP^{Sc} accumulation depends not only on expression of genes involved in heparan and chondroitin synthesis but probably also on chondroitin sulfation.

Experimental procedures

Chemicals—Heparan mimetic (HM) was purchased from Pr D. Barritault (University of Paris XII, France). It was obtained by controlled chemical substitution of T40 dextran with defined amounts of carboxymethyl (CM), sulfate (S) and hydrophobic groups such as benzylamide (Bn) (29). The molecule used was HM2602 that contains 88% CM, 20% Bn and 50% S substitutions per dextran unit (23).

Cell cultures—GT1-7 cell line derived from immortalized murine hypothalamic GnRH neurons (30). ScGT1 cells correspond to GT1-7 cells infected with the scrapie Chandler isolate. These cells, kindly provided by S. Lehmann (Montpellier, France), persistently express high amounts of PrP^{Sc} (31).

Cell growth was performed at 37°C in Opti-Modified Eagle's Medium supplemented with 5% fetal calf serum, 5% fetal horse serum, 1% penicillin streptomycin and 1% sodium pyruvate, in the presence of 5% CO₂. Cells were grown to confluence and sub-cultured every 3 days.

For cellular proliferation kinetics, 300 000 GT1 and ScGT1 cells were inoculated per plate with 15 mL of the above described growing medium. Cell proliferation was monitored every day until they reached the required confluence state. For harvesting the cells, they were washed with 5 mL of PBS, incubated 10 min with 2 mL PBS-10 mM EDTA, recovered and counted after Trypan Blue staining.

Histochemical procedures—C57Bl6 mice (8 weeks old; weight 20g) were obtained from Harlan (Gannat, France). The animals received water and food *ad libitum*. Mice were sacrificed, the brain was recovered, immersed overnight in Carnoy's fluid fixative and paraffin embedded. Sagittal sections (5 µm-thick) were hydrated and pre-treated with H₂O₂ to block endogenous peroxidases and with 20% normal horse serum to reduce non-specific staining. PBS containing 0.1% (v/v) Triton X100 was used in all the steps. The slides were incubated with the primary antiserum diluted 1/50 for 15 min at room temperature. The labeled sites were detected with peroxidase-catalyzed signal amplification system (CSA, rabbit link, ref. K 1498, Dako®), revealed with Novared (Dako®), and counterstaining with light haemalum. Controls were made by replacing the primary antibody with similarly diluted pre-immune serum.

Heparan mimetic treatment and analysis of PrP^{Sc} accumulation—GT1 and ScGT1 cells were treated for 6 days (two passages) with 10µg of HM2602 per mL of medium. As a control, a set of GT1 and ScGT1 cells were grown without HM for the same time. PrP^{Sc}

accumulation analysis was carried out as previously described (32).

RNA extraction—Total RNAs were isolated using the RNeasy protocol (Qiagen Inc., Hilden, Germany). RNA concentration was measured using the Agilent device (Agilent 2100 Bioanalyzer).

DNA micro-array analysis—DNA micro-arrays were prepared by ourselves on polylysine slides (CML, Menzel-glasses). They contained 165 hybridization units (each DNA fragment was about 450 bp) specific of the main murine glycosylation-related genes, that belong to the glycosyltransferases (111 units), glycosidases (30 units), glycosyltranslocase (1 unit), lectins (3 units) and sulfotransferases (20 units) gene families. The slides also contained 23 controls units corresponding to 10 normalization units (*Arabidopsis* genes), 7 elongation units and 1 positive and 5 negative controls. Each unit was present in triplicate.

Labelled cDNA synthesis and microarray hybridizations were performed as described in the MICROMAX™ TSA™ Labeling and Detection Kit (NEN, Perkin-Elmer). Equal amounts of biotin-labeled cDNA (corresponding to 10 µg of total RNA from GT1 cells) and fluorescein-labeled cDNA (corresponding to 10 µg of total RNA from ScGT1 cells) were hybridized on the slide. Various amounts (1 to 100 pg) of control RNAs (*Arabidopsis* RNAs, SpotReport-10 Array Validation System from Stratagene) were added to each batch of RNA samples for normalization. Hybridizations were carried out overnight at 65°C in a hybridization chamber (Corning, USA).

After washings, biotin-labeled cDNA were revealed by streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) and Cy5-tyramide. Fluorescein-labeled cDNAs were revealed using an anti-fluorescein-HRP antibody and Cy3-tyramide. Cy3 and Cy5 fluorescence signals were measured using a GMS 418 Array Scanner (MWG, Germany). The raw data were analyzed using the Array-Pro Analyser software.

Hybridizations were repeated three times with biotin-labeled cDNA generated from RNAs from GT1 cells and fluorescein-labeled cDNA generated from RNAs from ScGT1 cells. Three other hybridizations were made with reversed Cy3 and Cy5 labeling.

Data were reported as the mean fold transcript level increase or decrease in the ScGT1 compared to GT1 cells. The fold change in relative transcript level (RTL) between ScGT1 and GT1 cells must be ≥ 2 or ≤ 2 for being taken into account.

Real-time PCR analysis—Semi-quantitative RT-PCR analyses were carried out in triplicate on the ABI Prism™ 5700 sequence detection system (PE Applied Biosystems). Reactions were performed in 25 µL that includes 12.5 µL of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). After each of the 40 cycles (made of 15 sec of denaturation at 95°C and 1 min of annealing/extension at 60°C), change in SYBR Green dye fluorescence, allowed the determination of a threshold cycle (Ct).

cDNAs used as template were obtained by reverse transcription of total RNA using 0.5 µg oligo-d(T) primers and the Superscript II RNase H reverse transcriptase (Life Technologies). The final volume was of 20 µL, the incubation was performed at 42°C for 50 min and the inactivation at 70°C for 15 min.

Specific primers used are listed in Table I. The relative amount of PCR products between ScGT1 and GT1 cells was determined based on the C_T value. Measurement of the level of TFIID transcription factor-encoding mRNA was used to normalize the samples (33).

Glycosaminoglycans quantification—GT1 and ScGT1 cell cultures, at three levels of confluence, were washed in PBS and lysed in 400 µL of K₂HPO₄ 100 mM pH8.0, Triton X100 0.5% buffer. The protein content of a 100 µL aliquot was quantified (Micro BC assay, Amersham) and the remaining 300 µL protein sample was digested at 56°C for 12 h with proteinase K (50 µg/mL final). The enzyme was heat inactivated at 90°C for 10 min and the mixture was centrifuged (10 000xg, 10 min and 20°C) through an Ultrafree 0.2 µm filter (Microcon).

The sulfated glycosaminoglycan (GAGs) amount was determined using the Biocolor assay (Tebu, France) according to Barbosa's procedure (34). Briefly, 1 mL of DimethylMethylene Blue (DMMB) solution was added to an adjusted 100 µL aliquot of digested sample, shaken for 30 min, and centrifuged at 12 000xg for 10 min. After

discarding the supernatant, 1 mL of a DMMB decomplexation solution (4M guanidine hydrochloride in 10% propan-1-ol and acetate tri-hydrate buffer 50mM pH6.8) was added to the pellet. The mixture was shaken for 30 min and its absorbance was measured at 656 nm. The sulfated GAG amount was determined by comparison with a chondroitin sulfate solution curve.

For chondroitin sulfate quantification, a 100 μ L aliquot of proteinase K-digested sample was mixed with 100 mL of sodium nitrite (0.5%) and acetic acid (33%). The reaction was stopped by addition of 100 μ L ammonium sulfamate (12.5%). Remaining chondroitin sulfate was quantified in 100 μ L of nitrous acid reaction mixture as described above.

Western-blotting analysis of ChGn1 and Chst8 encoded enzymes—Antigenic peptides were designed from the *N*-terminal regions of carbohydrate (*N*-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8 (GalNAc-4-ST1; NP_766341) and chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosamine-transferase I (NP_780349) mouse protein sequences. Rabbit antibodies were generated by Eurogentec (Liège, Belgium). Only the CQAPDQPRHPKAAGS peptide belonging to GalNAc-4-ST1 sequence proved to be immunogenic.

For western-blotting, GT1 and ScGT1 cells were washed in PBS, lysed in 300 μ L of Tris-HCl 50mM pH 6.8, Glycerol 10% (p/v) SDS 1% (v/v) buffer and sonicated. The protein amount was determined according to the bicinchonic acid procedure (Sigma). Sixty μ g of total proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel. After transfer (200 mA, 1h30), the nitrocellulose membrane was incubated for 2 h in 10 mL of 1% blocking reagent (Western blocking reagent, Roche). The incubation with the anti-GalNAc-4-ST1 antibodies (1/100 dilution) was carried out overnight at 4°C in 0.5% blocking solution. As a control, an anti-TfIIId western-blotting was also performed (Anti-TfIIId dilution: 1/750 – Santa-Cruz). Detections were performed using a goat anti-rabbit IgG HRP-coupled antibody (Dako). The chemiluminescent reaction (Roche) was revealed by an Amersham Hyper processor.

RESULTS

Expression analysis of glycosylation-related genes in ScGT1 versus GT1 cells—ScGT1 cells are a proper model to study PrP^{Sc} accumulation. They were established on the basis of a derived hypothalamic neuronal cell line that expresses high amount of PrP^C (eight times more than in the widely used neuroblastoma N2a cell line) and they persistently accumulate high levels of PrP^{Sc} (31,35). The origin of these cells makes them the proper cellular model for studying the process of brain PrP^{Sc} deposition that occurs in prion disorders (36).

Upon the 165 glycosylation-related genes whose relative transcript levels were estimated by hybridization on a DNA micro-array, twelve presented a significant variation in ScGT1 cells as compared with GT1 cells (Table II). These genes belong to the glycosyltransferase (6 genes), glycosidase (3 genes) and carbohydrate sulfotransferase (3 genes) families. Among them, *ChGn1* and *Chst8* genes showed the most important variations in their relative transcript levels (RTL). *ChGn1* which encodes the chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyl-transferase I (CsGalNAcT-I), was 5.55 fold over-expressed in ScGT1 cells. The *Chst8* gene, which encodes the *N*-acetylgalactosamine 4-O sulfotransferase 8 (GalNAc-4-ST1), was 4.87 fold under-expressed in ScGT1 cells (Table II). The CsGalNAcT-I enzyme is directly involved in glycosaminoglycan synthesis, particularly chondroitin sulfate (37,38). The GalNAc-4-ST1 enzyme transfers a SO₄ radical from PAPS donor substrate to the hydroxyl at C4 position of a β 1,4-linked *N*-acetylgalactosamine containing acceptor substrate. When the enzyme is free from the Golgi membrane or experimentally truncated, the SO₄ radical can be transferred on a β 1,4-linked GalNAc residue belonging to a chondroitin glycan (39).

Results from the micro-array were confirmed by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 1A). *ChGn1* was found to be 30.2 fold over-expressed and *Chst8* 17.13 fold under-expressed in ScGT1 cells. Compared to the micro-array data, the semi-quantitative RT-PCR analysis shows for both genes even higher relative transcript level differences, indicating that DNA micro-array technology underestimates changes in mRNA amounts,

particularly for the most highly expressed genes.

To correlate these transcripts levels with protein amounts, specific antibodies towards both polypeptides were designed. An important and reproducible decrease in the amount of GalNAc-4-ST1 was found in ScGT1 cells as compared with GT1 cells (Fig. 1B).

Immunocytochemistry of N-acetylgalactosamine 4-O sulfotransferase 8 in mouse brain—To assess enzyme localization in mouse brain, search for GalNAc-4-ST1 was performed (Fig. 2) using the purified antibody directed against the N-terminal epitope of the enzyme located in its stem region (see experimental procedure). Both occipital cortex and lateral hypothalamus brain regions stained positively. In few cortical neurons, the presence of the enzyme was evidenced in pericellular space and cytoplasmic membrane (Fig. 2A). GalNAc-4-ST1 was also detected as vesicular string in some neurites from other cells (Fig. 2B). A higher number of neurons from lateral hypothalamus showed a positive staining inside their cytoplasm and dendritic cell extensions (Fig. 2C). Altogether, this staining was in good agreement with the presence in neuronal cells of a significant non-golgian enzyme fraction.

Measurement of glycosaminoglycan and chondroitin sulfate amounts—The amount of chondroitin sulfate, which depends on the balance between CsGalNAcT-I and chondroitinase activities, was quantified both in GT1 and ScGT1 cells. To this aim, total GAG and chondroitin sulfate amounts were measured at different levels of cell confluence (low confluence, proliferation phase, high confluence). The amount of total GAG did not significantly change according to the confluence stage (Fig. 3A). Interestingly, a clear difference in the chondroitin sulfate amount was evidenced between the two cell lines at low level of confluence (Fig. 3B). In GT1 cells, chondroitin sulfate amount progressively increased with cell growth (12.2 ± 5.3 ng/ μ g protein at low confluence level corresponding to 37.6 % of total GAG, 27.1 ± 2.0 ng/ μ g of protein at high confluence corresponding to 61% of total GAG). Conversely, high chondroitin sulfate content was measured in ScGT1 cells at low confluence (26.6 ± 1.2 ng/ μ g of protein,

corresponding to 74 % of total GAG) a content that remains identical at high confluence (27.7 ± 2.0 ng/ μ g of protein, corresponding to 67.7 % of total GAG). The high chondroitin sulfate amount observed at low level of confluence correlates well with the higher ScGT1 cells growth rate compared to that of the GT1 cells (data not shown) and with the high level of *ChGn* transcript. Moreover, a lower amount of heparan sulfate compared to that of chondroitin sulfate was detected in GT1 and ScGT1 cells.

Relative transcript levels of glycosylation-related genes involved in heparan and chondroitin sulfate synthesis—Both CsGalNAcT-I transcript and chondroitin sulfate amounts evidenced a deep impairment of heparan and chondroitin sulfate synthesis pathways. To get more information about this phenomenon, the level of expression of all the known glycosylation-related genes involved in this glycosaminoglycan synthesis was investigated. Common to the two pathways, tetrasaccharide linker is first synthesized by the enzymes encoded by *Xylt1*, *Xylt2*, *b4galt7*, *b3galt6*, *b3gat3* genes (Fig. 4). Next, the enzymes encoded by *Ext11/Ext13* and *ChGn1* genes direct the heparan sulfate and chondroitin sulfate synthesis, respectively. At last, heparan and chondroitin sulfate chain elongation depends on the enzymes encoded by *Ext1*, *Ext2*, *Ext11*, *Ext12*, *Ext13* or *CsGalNacT2*, *CsGlcAT*, *ChPF*, *CSS* genes, respectively (Fig. 4).

Most of the genes driving the heparan sulfate pathway (*Ext1*, *Ext2*, *Ext12*, *Ext13*) proved to be under-expressed in ScGT1 (Table III), which correlates well with the lower amount of heparan versus chondroitin sulfate previously observed (Fig. 3). Except for *ChGn1* (RTL: $+30.2 \pm 7.02$), the gene that initiates chondroitin synthesis on the tetrasaccharide linker, expression of all the other genes (*CsGalNacT2*, *CsGlcAT*, *ChPF*) involved in the chondroitin pathway was down regulated or unchanged in ScGT1 cells (Table III).

Heparan mimetic both reverses Chst8 relative transcript levels and induces clearance of PrP^{Sc}—In order to confirm the possible connection between the conversion of PrP^C into PrP^{Sc} and a *Chst8*-related GAG hyposulfation, heparan mimetic (HM) action on the regulation of this gene was assessed.

Indeed, HM have been previously shown to inhibit efficiently PrP^{Sc} accumulation in ScGT1 cells (22,23). The effect of such molecules that mimic endogen sulfated heparan and chondroitin structures on *ChGn1* and *Chst8* transcription levels was investigated. The efficient inhibition of PrP^{Sc} accumulation after one treatment by HM at 10 µg/mL was confirmed (Fig. 5A). Interestingly, no reversion of the *ChGn1* relative transcription level was observed after two HM treatments (data not shown), a progressive down-regulation of the expression of *Chst8* was detected, phenomenon which was complete after two HM treatments (Fig. 5B). No effect of HM treatment was evidenced in GT1 cells (Fig. 5B).

DISCUSSION

Glycosaminoglycans, specially heparan sulfate, have been described as being important actors of prion diseases (6,7,16,28,40). Their function is still under investigation and the role of chondroitin sulfate in these disorders has to be more deeply examined. Heparan sulfates have controversial effects as they can stimulate or inhibit these disorders. By binding on specific PrP^C sites, they are important partners in the interaction between PrP and the laminin receptor LRP/LR (7,16). Heparan sulfates have also been identified as critical factors in Alzheimer amyloidogenesis and they were found to be associated with PrP^{Sc} insoluble aggregates and tissue amyloid prion deposits in the brain of infected animals (24,25,41,42). Furthermore, heparinase III-sensitive, possibly hyposulfated, heparans seem to be involved in PrPres metabolism (26). Pentosan polysulfate and usual heparan sulfate have a stimulating effect on the conversion of PrP^C into PrPres. Inversely, other glycosaminoglycans, such as chondroitin and keratan sulfate, have no effect on this process (27,28,43,44). Interestingly, in scrapie-infected cell culture and in animal models, exogenous heparan and pentosan polysulfate, contrary to their stimulatory effect, are strong inhibitors of PrP^{Sc} accumulation, probably through steric competition, while other glycosaminoglycans were neutral (21,45-48).

Correlation between PrPres and glycosylation-related genes—Using our DNA micro-array technology, the correlation between the

pathologic prion protein accumulation and the expression of numerous glycosylation-related genes was investigated in GT1 cells, cells that derived from the central nervous system. It confirmed the relevance of such a methodology to screen potential changes in glycosylation and demonstrated a profound modification of the expression of some glycosylation-related genes. Modification of the RNA transcript levels of genes involved in glycosaminoglycans synthesis, such as heparan and chondroitin sulfates, or in the 4-O-sulfation of a non-reducing *N*-acetylgalactosamine residue was evidenced. Most of the genes involved in heparan sulfate synthesis were down regulated (Table II), while GAG and chondroitin sulfate levels varied accordingly (Fig. 3). Only the *ChGn1* gene was over-expressed. It encodes the chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase-I (CsGalNAcT-I), an enzyme involved in the initiation of chondroitin sulfate synthesis (37). Other genes encoding enzymes involved in chondroitin sulfate polymerization (*CsGalNAcT-2*, *CSS*, *CHPF* and *CsGlcAT*) were found to be stably or under expressed.

Chondroitin sulfate proteoglycans and prion diseases—The relative increase in the amount of chondroitin sulfate in ScGT1 cells (Fig. 3) suggested a balanced regulation of heparan and chondroitin sulfate synthesis (49) and also a chondroitin sulfate growth-promoting effect in these cells. The changes in the amounts of heparan and chondroitin sulfate in association with PrPres accumulation well correlate with several observations of such modulations after injury of the cerebral nervous system, in Alzheimer's and prion diseases (50-52). Chondroitin sulfate proteoglycans added to cultures of rat hippocampal or cortical neurons have been described to rescue the cells from excitotoxic damage and to attenuate beta-amyloid-induced neurodegeneration (53,54). An up-regulation of chondroitin sulfate proteoglycans after an injury of central nervous system, specifically around the region of the lesion, generally leads to an inhibitory effect towards axonal and neurite outgrowth (55-57). However, a correlation between a high amount of chondroitin sulfate proteoglycan in perineuronal nets surrounding neurons (extracellular matrix materials deposited around synaptic endings and in the space

between neurons) and the protection towards the formation of Alzheimer's disease has been described (58-60).

Importance of N-acetylgalactosamine-4-O-sulfation—As opposed to the *ChGn1* gene overexpression, a deep *Chst8* under-regulation was evidenced and correlated with a strong decrease of the level of GalNAc-4-ST1 (Fig. 1). The GalNAc-4-ST1 enzyme is a member of the HNK-1 sulfotransferase family that includes chondroitin-4-sulfotransferases 1, 2 and 3, dermatan-4-sulfotransferase-1, HNK-1 sulfotransferase (HNK-1 ST) and GalNAc-4-ST2 (61-67). It is a transmembrane type II enzyme localized in the Golgi apparatus, which was first described in the pituitary gland (39). It was shown to be the specific sulfotransferase that catalyzes the transfer of a sulfate group on the 4th carbon of a non reducing terminal GalNAc of the glycoprotein luteinizing hormone (39,67). Sulfated GalNAc is essential for LH neuroendocrine regulating circulatory half-life (68,69). GalNAc-4-SO₄ is of particular importance in endocrine regulation, since several studies described a role for PrP in these physiological functions. Indeed, an alteration of the regulation of the neuroendocrine pancreas has been observed after 139H scrapie strain infection (70). Moreover, a modification of the circadian rhythm in PrP knock-out mice, in Fatal Familial Insomnia patients and in scrapie infected mice (personal communication) supports this observation (71) (for review, (72)). As these neuroendocrine changes originate in the hypothalamus, from which the GT1 cell model derived, we can hypothesize that PrP^C/PrP^{Sc} endocrine changes is related to a specific cerebral localized hyposulfation of glycoprotein hormones.

An interesting feature of GalNAc-4-ST1 enzyme resides in the existence of a non-golgian protein isoform, that accumulates in the cell culture medium (39). Our data on the enzyme immunolocalization confirm the existence of such a non-golgian protein. Indeed, it was present both in the pericellular space and in the cytoplasmic membrane of neurites and dendritic extension and in the whole cytoplasm (Fig. 2). In contrast to the Golgi-linked enzyme, this non-golgian isoform is able to transfer a SO₄ group on non reducing GalNAc moieties of chondroitin and dermatan, suggesting a role for this enzyme in the

regulation of chondroitin sulfation (39,67). The presence of GalNAc-4-ST1 in both fetal brain and in various regions of the central nervous system have suggested the presence on some glycoproteins of N-linked structures ending with β 1,4-linked GalNAc-4-SO₄ (39). Sulfated structures have been described on the carbonic anhydrase VI, the proopiomelanocortin, the Tamm-Horsfall glycoprotein, the urokinase, the sialoadhesin and the tenascin R (TN-R) (73-79). The post-translational modifications of TN-R by three distinct sulfated oligosaccharides, contribute to diverse specific functions for TN-R. For example, the addition of O-linked chondroitin sulfate to TN-R contributes to the inhibition of cell adhesion and neurite outgrowth in vitro (80-85). The GalNAc-4-SO₄ modified TN-R has been described to be predominantly synthesized by neurons and to be selectively localized in various brain regions, including the cortex, the hippocampus, the cerebellum and especially in perineuronal nets (79). Therefore, the expression of GalNAc-4-ST1 in a number of specific tissues and brain regions supports the idea that the tightly regulated synthesis of structures ending with β 1,4-linked GalNAc-4-SO₄ in a number of settings, are used in processes requiring specific recognition.

Possible mechanisms for the involvement of 4-O-hyposulfated chondroitin in the conversion of PrP^C into PrP^{Sc}—The formation of PrP^{Sc} seems to involve a direct molecular interaction between PrP^C and an unknown PrP isoform acting as template (86). GAG could also participate in this interaction by helping to bring PrP^C and template PrP close enough for interaction to occur (27). Interestingly, efficient sulfated GAG binding sites have been identified in the N-terminal region of PrP^C. More generally, it was shown that polymerized GAGs increase PrP^{Sc}, whereas small analogues such as heparan mimetic decrease it (26). Exogenous large chondroitin sulfates, but not small fragments, did not reduce the PrP^{Sc} isoform accumulation in ScN2a cells (26). Ben-Zachen and co-authors suggest that both heparan and chondroitin sulfate can serve as pro-prions cofactors with equal efficiency, but because chondroitin sulfates are poorly present in ScN2a cells, their enzymatic removal by chondroitinase ABC is undetectable in terms of PrP^{Sc} production. Inversely, the chondroitin amount is higher than that of heparan sulfate in

GT1 cells (Fig. 3) and consequently, in these cells, the efficacy of the large chondroitin sulfate GAG to bind PrP isoform could be at least similar to that of heparan sulfate GAG.

The finding that a high *ChGn1* transcript level was found in parallel with a down-regulation of the *Chst8* gene expression, underlines the possible connection between chondroitin synthesis and its sulfation level. Indeed, Kitagawa et al. evidenced that specific sulfation, particularly 4-O-sulfation, can serve as a stop signal that precludes the chondroitin chain elongation (87). In this way, our data showing a possible β 1,4-linked GalNAc-4-SO₄ hyposulfation, suggest the activation of an endogenous enzyme leading to the synthesis of large hyposulfated chondroitin. Hyposulfated

GAG, mainly present in ScGT1 cells, would be highly effective in promoting PrP^{Sc} accumulation by helping to bring PrP^C and template PrP close enough for interaction to occur.

Why do heparan mimetic reverse simultaneously both PrP^{Sc} accumulation and Chst8 transcript levels in ScGT1 cells—One possibility is that endogenous hyposulfated chondroitin derivatives could be components of transcription machinery that controls expression of the genes involved in chondroitin synthesis pathway. In addition to their high efficacy for PrP^{Sc} clearance, free or PrP-bound heparan mimetic would thus compete with hyposulfated chondroitin derivatives, as regulators of the *Chst8* gene transcription.

REFERENCES

1. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-10966
2. Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., and Caughey, W. S. (1991) *Biochemistry* **30**, 7672-7680
3. Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., and Taraboulos, A. (2002) *Biochemistry* **41**, 12868-12875
4. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987) *Cell* **51**, 229-240
5. Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B., and Dwek, R. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 3759-3766
6. Pan, T., Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Petersen, R. B., and Sy, M. S. (2002) *Biochem J* **368**, 81-90
7. Warner, R. G., Hundt, C., Weiss, S., and Turnbull, J. E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 18421-18430
8. Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B., and Gambetti, P. (1996) *Ann Neurol* **39**, 767-778
9. Kuczius, T., Haist, I., and Groschup, M. H. (1998) *J Infect Dis* **178**, 693-699
10. Winklhofer, K. F., Heller, U., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003) *Traffic* **4**, 313-322
11. Lehmann, S., and Harris, D. A. (1997) *J Biol Chem* **272**, 21479-21487
12. Moudjou, M., Treguer, E., Rezaei, H., Sabuncu, E., Neuendorf, E., Groschup, M. H., Grosclaude, J., and Laude, H. (2004) *J Virol* **78**, 9270-9276
13. Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S. B., and Avraham, D. (1995) *J Cell Biol* **129**, 121-132
14. Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., and Taraboulos, A. (1997) *J Biol Chem* **272**, 6324-6331
15. Eberl, H., Tittmann, P., and Glockshuber, R. (2004) *J Biol Chem* **279**, 25058-25065
16. Hundt, C., Peyrin, J. M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M. L., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I., and Weiss, S. (2001) *Embo J* **20**, 5876-5886
17. Shyng, S. L., Lehmann, S., Moulder, K. L., and Harris, D. A. (1995) *J Biol Chem* **270**, 30221-30229
18. Farquhar, C. F., and Dickinson, A. G. (1986) *J Gen Virol* **67 (Pt 3)**, 463-473
19. Ehlers, B., and Diringer, H. (1984) *J Gen Virol* **65 (Pt 8)**, 1325-1330
20. Kimberlin, R. H., and Walker, C. A. (1986) *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 409-413
21. Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R., and Iwaki, T. (2004) *J Virol* **78**, 4999-5006

22. Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barritault, D., and Taraboulos, A. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 473-479
23. Adjou, K. T., Simoneau, S., Sales, N., Lamoury, F., Dormont, D., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Deslys, J. P., and Lasmezas, C. I. (2003) *J Gen Virol* **84**, 2595-2603
24. Snow, A. D., Wight, T. N., Noehlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1990) *Lab Invest* **63**, 601-611
25. McBride, P. A., Wilson, M. I., Eikelenboom, P., Tunstall, A., and Bruce, M. E. (1998) *Exp Neurol* **149**, 447-454
26. Ben-Zaken, O., Tzaban, S., Tal, Y., Horonchik, L., Esko, J. D., Vlodavsky, I., and Taraboulos, A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 40041-40049
27. Wong, C., Xiong, L. W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., and Caughey, B. (2001) *Embo J* **20**, 377-386
28. Supattapone, S. (2004) *J Mol Med* **82**, 348-356
29. Desgranges, P., Barbaud, C., Caruelle, J. P., Barritault, D., and Gautron, J. (1999) *Faseb J* **13**, 761-766
30. Mellon, P. L., Windle, J. J., Goldsmith, P. C., Padula, C. A., Roberts, J. L., and Weiner, R. I. (1990) *Neuron* **5**, 1-10
31. Nishida, N., Harris, D. A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavel, O., and Lehmann, S. (2000) *J Virol* **74**, 320-325
32. Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmona, M., Colombo, L., De Luigi, A., Limido, L., Suardi, S., Rossi, G., Auvre, F., Adjou, K. T., Sales, N., Williams, A., Lasmezas, C., and Deslys, J. P. (2003) *J Virol* **77**, 8462-8469
33. Milhiet, P. E., Vacherot, F., Caruelle, J. P., Barritault, D., Caruelle, D., and Courty, J. (1998) *J Endocrinol* **158**, 389-399
34. Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefiere, V., Caruelle, J. P., Martelly, I., and Papy-Garcia, D. (2003) *Glycobiology* **13**, 647-653
35. Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., Mobley, W. C., and Prusiner, S. B. (1997) *J Virol* **71**, 8821-8831
36. Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Fowler, N., Hope, J., Bruce, M. E., and McBride, P. A. (1996) *Neurodegeneration* **5**, 101-109
37. Sato, T., Gotoh, M., Kiyohara, K., Akashima, T., Iwasaki, H., Kameyama, A., Mochizuki, H., Yada, T., Inaba, N., Togayachi, A., Kudo, T., Asada, M., Watanabe, H., Imamura, T., Kimata, K., and Narimatsu, H. (2003) *J Biol Chem* **278**, 3063-3071
38. Gotoh, M., Yada, T., Sato, T., Akashima, T., Iwasaki, H., Mochizuki, H., Inaba, N., Togayachi, A., Kudo, T., Watanabe, H., Kimata, K., and Narimatsu, H. (2002) *J Biol Chem* **277**, 38179-38188
39. Xia, G., Evers, M. R., Kang, H. G., Schachner, M., and Baenziger, J. U. (2000) *J Biol Chem* **275**, 38402-38409
40. Perez, M., Wandosell, F., Colaco, C., and Avila, J. (1998) *Biochem J* **335** (Pt 2), 369-374
41. Elimova, E., Kisilevsky, R., Szarek, W. A., and Ancsin, J. B. (2004) *Faseb J*
42. Guiroy, D. C., Yanagihara, R., and Gajdusek, D. C. (1991) *Acta Neuropathol (Berl)* **82**, 87-92
43. Shaked, G. M., Meiner, Z., Avraham, I., Taraboulos, A., and Gabizon, R. (2001) *J Biol Chem* **276**, 14324-14328
44. Caughey, B., and Baron, G. S. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 565-569
45. Caughey, B., and Raymond, G. J. (1993) *J Virol* **67**, 643-650
46. Dealler, S., and Rainov, N. G. (2003) *IDrugs* **6**, 470-478
47. Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y. G., Masullo, C., and Pocchiari, M. (1992) *J Gen Virol* **73** (Pt 3), 661-665
48. Priola, S. A., and Caughey, B. (1994) *Mol Neurobiol* **8**, 113-120
49. Bodo, M., Carinci, F., Baroni, T., Becchetti, E., Giammarioli, M., Bellucci, C., Pezzetti, F., Evangelisti, R., and Carinci, P. (1996) *Cytokine* **8**, 772-783
50. Schubert, D., Schroeder, R., LaCorbiere, M., Saitoh, T., and Cole, G. (1988) *Science* **241**, 223-226
51. Snow, A. D., Mar, H., Noehlin, D., Kimata, K., Kato, M., Suzuki, S., Hassell, J., and Wight, T. N. (1988) *Am J Pathol* **133**, 456-463

52. Caceres, J., and Brandan, E. (1997) *J Cell Biochem* **65**, 145-158
53. Okamoto, M., Mori, S., Ichimura, M., and Endo, H. (1994) *Neurosci Lett* **172**, 51-54
54. Woods, A. G., Cribbs, D. H., Whittemore, E. R., and Cotman, C. W. (1995) *Brain Res* **697**, 53-62
55. Morgenstern, D. A., Asher, R. A., and Fawcett, J. W. (2002) *Prog Brain Res* **137**, 313-332
56. Properzi, F., Asher, R. A., and Fawcett, J. W. (2003) *Biochem Soc Trans* **31**, 335-336
57. Canning, D. R., McKeon, R. J., DeWitt, D. A., Perry, G., Wujek, J. R., Frederickson, R. C., and Silver, J. (1993) *Exp Neurol* **124**, 289-298
58. Bruckner, G., Hausen, D., Hartig, W., Drlicek, M., Arendt, T., and Brauer, K. (1999) *Neuroscience* **92**, 791-805
59. Adams, I., Brauer, K., Arelin, C., Hartig, W., Fine, A., Mader, M., Arendt, T., and Bruckner, G. (2001) *Neuroscience* **108**, 285-298
60. Hartig, W., Klein, C., Brauer, K., Schuppel, K. F., Arendt, T., Bigl, V., and Bruckner, G. (2001) *Neurobiol Aging* **22**, 25-33
61. Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T. O., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 20188-20196
62. Yamauchi, S., Mita, S., Matsubara, T., Fukuta, M., Habuchi, H., Kimata, K., and Habuchi, O. (2000) *J Biol Chem* **275**, 8975-8981
63. Kang, H. G., Evers, M. R., Xia, G., Baenziger, J. U., and Schachner, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 34766-34772
64. Evers, M. R., Xia, G., Kang, H. G., Schachner, M., and Baenziger, J. U. (2001) *J Biol Chem* **276**, 36344-36353
65. Ong, E., Yeh, J. C., Ding, Y., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 5190-5195
66. Bakker, H., Friedmann, I., Oka, S., Kawasaki, T., Nifant'ev, N., Schachner, M., and Mantei, N. (1997) *J Biol Chem* **272**, 29942-29946
67. Okuda, T., Sawada, T., Nakano, H., Matsubara, K., Matsuda, Y., Fukuta, M., and Habuchi, O. (2003) *J Biochem (Tokyo)* **134**, 111-120
68. Baenziger, J. U., Kumar, S., Brodbeck, R. M., Smith, P. L., and Beranek, M. C. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 334-338
69. Mi, Y., Shapiro, S. D., and Baenziger, J. U. (2002) *J Clin Invest* **109**, 269-276
70. Ye, X., Scallet, A. C., and Carp, R. I. (1997) *Neurotoxicology* **18**, 533-545
71. Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., and Manson, J. C. (1996) *Nature* **380**, 639-642
72. Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P., and Lugaresi, E. (2003) *Lancet Neurol* **2**, 167-176
73. Hooper, L. V., Hindsgaul, O., and Baenziger, J. U. (1995) *J Biol Chem* **270**, 16327-16332
74. Skelton, T. P., Kumar, S., Smith, P. L., Beranek, M. C., and Baenziger, J. U. (1992) *J Biol Chem* **267**, 12998-13006
75. Siciliano, R. A., Morris, H. R., McDowell, R. A., Azadi, P., Rogers, M. E., Bennett, H. P., and Dell, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 225-239
76. Siciliano, R. A., Morris, H. R., Bennett, H. P., and Dell, A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 910-920
77. Martinez-Pomares, L., Crocker, P. R., Da Silva, R., Holmes, N., Colominas, C., Rudd, P., Dwek, R., and Gordon, S. (1999) *J Biol Chem* **274**, 35211-35218
78. Woodworth, A., Fiete, D., and Baenziger, J. U. (2002) *J Biol Chem* **277**, 50941-50947
79. Woodworth, A., Pesheva, P., Fiete, D., and Baenziger, J. U. (2004) *J Biol Chem* **279**, 10413-10421
80. Pesheva, P., and Probstmeier, R. (2000) *Prog Neurobiol* **61**, 465-493
81. Pesheva, P., Gennarini, G., Goridis, C., and Schachner, M. (1993) *Neuron* **10**, 69-82
82. Xiao, Z. C., Bartsch, U., Margolis, R. K., Rougon, G., Montag, D., and Schachner, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 32092-32101
83. Norenberg, U., Hubert, M., Brummendorf, T., Tarnok, A., and Rathjen, F. G. (1995) *J Cell Biol* **130**, 473-484
84. Probstmeier, R., Braunewell, K., and Pesheva, P. (2000) *Brain Res* **863**, 42-51
85. Probstmeier, R., Stichel, C. C., Muller, H. W., Asou, H., and Pesheva, P. (2000) *J Neurosci Res* **60**, 21-36

86. Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirinda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., and et al. (1990) *Cell* **63**, 673-686
87. Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ujikawa, M., Goto, F., Tamura, J., Neumann, K. W., Ogawa, T., and Sugahara, K. (1997) *Glycobiology* **7**, 531-537

FOOTNOTES

* We thank Dulcé Papy-Garcia and Stéphanie Garcia for help with quantifying cellular GAGs (CREET, Université Paris XII, Créteil, France), Chantal Jayat-Vignolles for help with the analysis of differential gene expression by DNA micro-array (UMR-INRA, Limoges, France) and Nicole Salès and Aurore Charbonnier for help with the immunohistological analysis (CEA, GIDITP, Fontenay-aux-Roses, France). We gratefully acknowledged Jean-Luc Vilotte and Michel Cogné for reading the manuscript. This work was supported by grants from the Conseil Regional du Limousin and the Commissariat à l'Énergie Atomique (to A.B.) and by the GIS "Infections à prions".

The abbreviations used are: PrP^C, the normal prion protein isoform; PrP^{Sc}, proteinase K resistant prion protein isoform; ECM, extracellular matrix; GAG, glycosaminoglycan; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GalNAc-4-SO₄, N-acetylgalactosamine-4-O-sulfate; LH, luteinizing hormone; TN-R, tenascin receptor; GPI, glycosylphosphatidylinositol; LRP/LR, laminin receptor precursor/laminin receptor; CNS, central nervous system; PAPS: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate.

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Expression analysis of the *ChGn1* and *Chst8* genes. *A*: Changes in mRNA levels measured with micro-array (open bars) and RT-PCR (closed bars). Total RNA was extracted from ScGT1 and GT1 cells. The relative transcript level represents the fold change of mRNA levels in ScGT1 versus GT1 cells. Data correspond to the mean value of three independent cell cultures. *B*: Western-blotting analysis. 50 µg of total cell proteins were separated on SDS-PAGE. GalNAc-4-ST1 enzyme was immunodetected (see Materials and Methods). As a control of the amount of protein, an anti-TfIIId western-blot was also performed.

Fig 2. GalNAc-4-ST1 enzyme immunolocalization in mouse brain. *A* and *B*: Sagittal sections of brain cortex showing GalNAc-4-ST1 staining in cytoplasmic membrane, immediate pericellular space (*A*; magnification x100) and neurites (*B*; magnification x40). *C*: Lateral hypothalamus sections showing the labeling of cytoplasm and dendritic extensions (magnification x40). Bars: *A*: 100µm, *B*, *C*: 40µm

Fig 3. Quantification of glycosaminoglycans. Total GAGs (*A*) and chondroitin sulfate (*B*) were measured in GT1 (open bars) and ScGT1 (closed bars) cells, at three growth stages. The sulfated glycosaminoglycans amount was determined using the Biocolor assay after PK treatment of cell extracts. Each data point represents the mean ± S.D. of two independent experiments.

Fig 4. Schematic diagram of heparan and chondroitin sulfates synthesis pathways. Alternative transfer of GlcNAc (for heparan sulfate synthesis) or GalNAc (for chondroitin sulfate synthesis) on GlcA belonging to the tetrasaccharide core is catalyzed respectively by Ext12/Ext13 enzymes and the chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 enzyme (Modified from 37).

Fig 5. Reverse action of heparan mimetic on PrP^{Sc} accumulation and on relative transcript levels of *Chst8* gene. *A*: Western-blotting analysis of PrP^{Sc} accumulation in non-treated and HM 2602-treated ScGT1 cells. ScGT1 cells were incubated for 3 days in medium containing 10 µg of HM 2602 per mL. PrP^{Sc} was purified from cells and analyzed by western blotting using SAF84 antibody. *B*: Relative transcript levels of *Chst8* gene in non-treated and HM 2602-treated ScGT1 cells. Cells were grown with HM2602 (10 µg/mL final concentration) for 72h (one HM 2602 treatment) and 144 hours (two

HM 2602 treatments). A control assay of GT1 cells treated with HM 2602 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration) for 144 hours is also represented.

Table I: Primers used for semi-quantitative RT-PCR analysis.

Gene name	Accession no	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
<i>Xylt1</i>	NM_17564	cccaatgtgaccgtgactgtt	atcaggatatcataggtggctgtaatg	70
<i>Xylt2</i>	NM_145828	gaaatgcgcgccatcag	agtgggcttctcctccagta	65
<i>β4galt7</i>	NM_146045	caggaaacctcaggcctttg	gatgggctggcaactcctt	68
<i>β3galt6</i>	AK033608	taagcatgtggccagtcaatg	cctcagtcaccccgaact	72
<i>β3gat3</i>	NM_024256	ccagccattgaggtgtgatg	cccagtcccacaaggtatgtg	73
<i>Ext1</i>	NM_010162	ccagccagcctgaagaacat	gcagacaccaggaaattcatga	73
<i>Ext2</i>	NM_010163	agtcacagcagagccttgca	atctgtagcccatggcaggtt	54
<i>Extl1</i>	NM_019578	ctgtcctggaactgcactgt	cacctgggaagcaaaaagtc	76
<i>Extl2</i>	NM_021388	gtgtgagcctactctgcatgg	ctgattccttgttcatacaagttaca	79
<i>Extl3</i>	NM_018788	tcgcatgaacttcttctgtct	gcatcgaagagccacctga	76
<i>ChGn1</i>	NM_172753	ggcgtaatctacggccatca	ccctccaaaatcctgtttcct	81
<i>CsGalNacT2</i>	NM_030165	gcctggtacctgtgttctgattg	agtgttctgttccctgtaggagtg	85
<i>CsGlcAT</i>	XM_131919	ccagccattgaggtgtgatg	cccagtcccacaaggtatgtg	83
<i>ChPF</i>	NM_001001566	cagcccactggtccttctgt	aggatggctctagggcatctg	82
<i>Chst8</i>	NM_175140	cccttaagcgcctggataactt	cccggacaagagcatcttg	80
<i>TfIIId</i>	BC012685	ttgacctaaagaccattgcacttc	catgatgactgcagcaaatcg	74

Table II: Relative transcript levels (RTL) of the glycosylation-related genes in ScGT1 versus GT1 cells. RTL values are the mean of 3 to 6 experiments carried out using the 165 glycosylation-related genes DNA micro-array tool described in the Experimental procedures section. RTL is defined as the ratio of Cy3/Cy5 normalized fluorescence. Only genes whose RTL values are up or down the threshold 2 were considered.

Gene name	Encoded protein	Relative transcript level (ScGT1 vs. GT1 cells)
<i>ChGn1</i>	Chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 1	+5.5 ±2.2
<i>Chst8</i>	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 8	-4.9 ±1.7
<i>Mfng</i>	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase manic fringe	-3.5 ±1.7
<i>B3gnt1</i>	Beta-1,3-galactosyltransferase 1	-3.1 ±1.0
<i>Chst1</i>	Chondroitin-6-sulfotransferase	-2.8 ±0.6
<i>Hexa</i>	Beta-hexosaminidase alpha chain	-2.8 ±0.6
<i>Gla</i>	Alpha-galactosidase A	-2.7 ±0.3
<i>Hs6st1</i>	Heparan sulfate 6-sulfotransferase 1	-2.5 ±0.5
<i>ST6GalNacIII</i>	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase III	-2.4 ±0.2
<i>Ogt</i>	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase	-2.4±0.4
<i>Neu1</i>	Neuraminidase 1	-2.3 ±0.3
<i>B4galt6</i>	Beta-1,4-galactosyltransferase 6	-2.2 ±0.2

Table III: Relative expression levels of the main active genes during GAG synthesis in ScGT1/GT1 cells. RTL values are the mean of three semi-quantitative RT-PCR experiments.

Gene name	Encoded protein	Relative transcript level (ScGT1 vs. GT1 cells)
<i>Xylt1</i>	β -D-Xylosyltransferase 1	1.0 \pm 0.2
<i>Xylt2</i>	β -D-Xylosyltransferase 2	-3.2 \pm 0.5
<i>β4galt7</i>	β -1,4-galactosyltransferase 7	0.6 \pm 0.1
<i>β3galt6</i>	β -1,3-galactosyltransferase 6	-1.9 \pm 1.7
<i>β3gat3</i>	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 3	-4.8 \pm 0.3
<i>Ext1</i>	Exostosin 1	-3.9 \pm 0.5
<i>Ext2</i>	Exostosin 2	-9.9 \pm 1.7
<i>Extl1</i>	Exostosin-like 1	-0.6 \pm 1.0
<i>Extl2</i>	Exostosin-like 2	-5.6 \pm 1.0
<i>Extl3</i>	Exostosin-like 3	-9.0 \pm 4.0
<i>ChGn1</i>	Chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase1	+ 30.2 \pm 7.0
<i>CsGalNacT2</i>	Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyltransferase-2	-5.2 \pm 0.7
<i>CsGlcAT</i>	Chondroitin sulphate beta-1,3-glucuronyltransferase	-3.8 \pm 0.3
<i>ChPF</i>	Chondroitin polymerizing factor	0.6 \pm 0.2

Figure 1

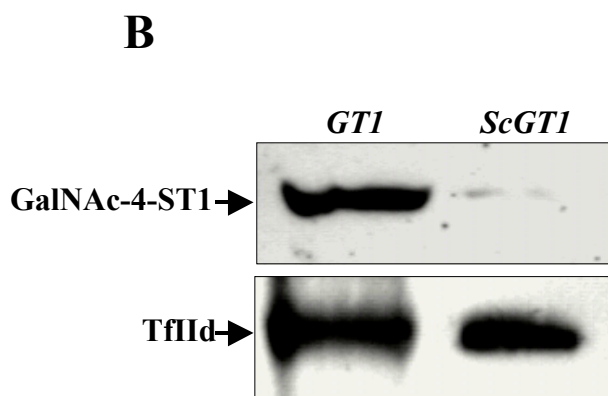
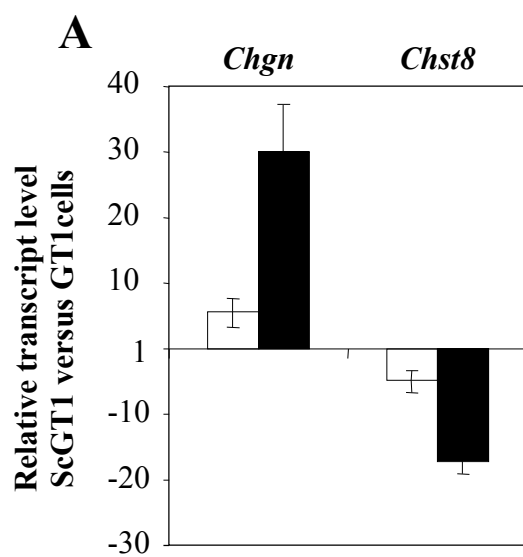


Figure 2

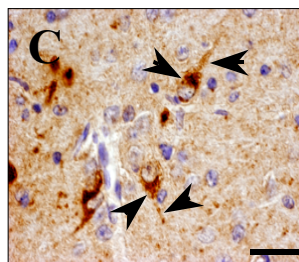
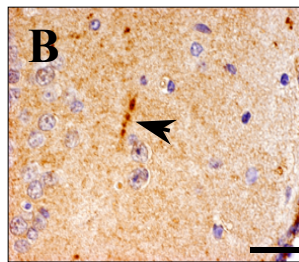
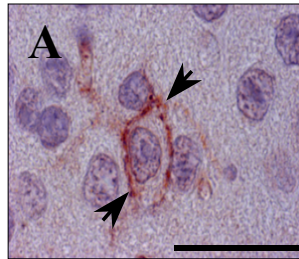
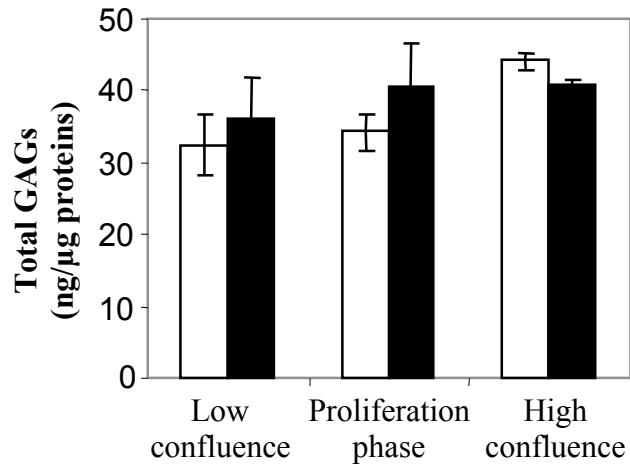


Figure 3

A



B

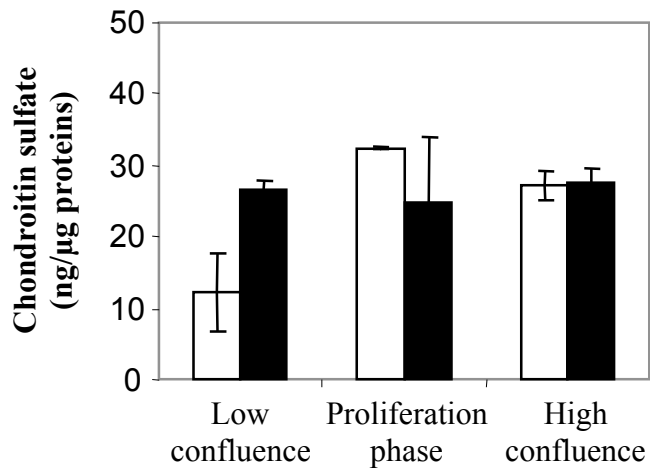


Figure 4

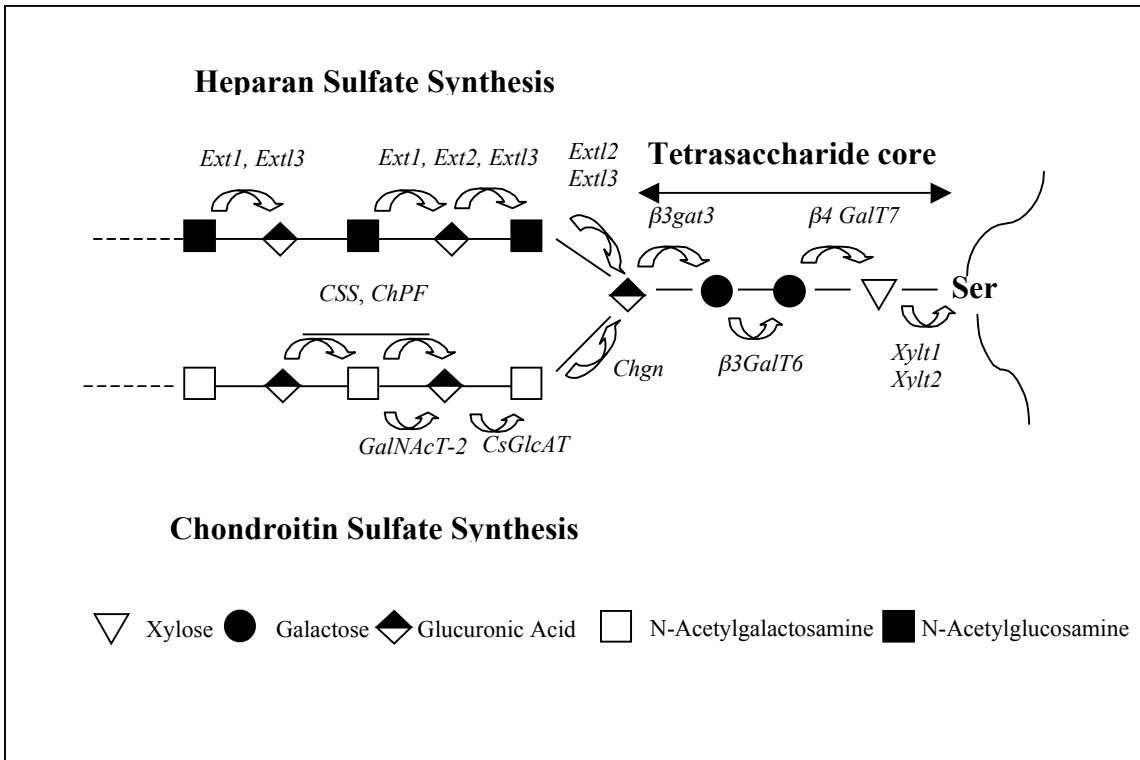
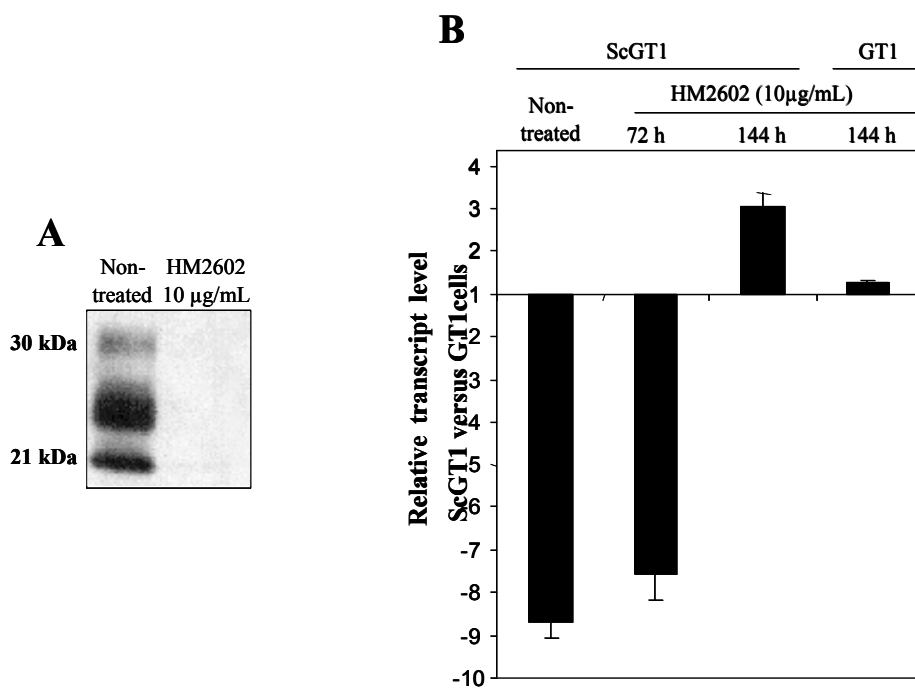


Figure 5



II-3 Expression des gènes *Chst8* et *ChGn1* dans un autre modèle cellulaire

Nous avons recherché si les deux gènes *Chst8* et *ChGn1* auxquels nous nous sommes particulièrement intéressés, présentaient dans une autre lignée cellulaire, la même dérégulation transcriptionnelle que celle observée dans les ScGT1. Cette étude a été réalisée sur le modèle de cellules Mov [9], lignée dérivée de ganglions dorsaux de souris transgéniques exprimant la PrP ovine, possédant des caractéristiques de cellules de Schwann.

II-3.1 Matériel et méthodes

II-3.1.1 Cellules

Les cellules Mov [9], cellules murines d'origine gliale (DRG) exprimant la PrPc ovine nous ont été aimablement fournies par Hubert Laude (INRA, Jouy en Josas, France). Ces cellules infectées stablement avec la souche de tremblante Dawson, accumulent la PrPres et sont appelées ScMov.

Cette lignée cellulaire est cultivée dans un milieu constitué de 3/4 DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) (Gibco) et 1/4 F12 (Gibco) complémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF).

II-3.1.2 Extraction des ARNm totaux et analyse de l'expression des

gènes *Chst8* et *ChGn1* dans les Mov et les ScMov

L'ARN des cellules Mov (4^{ème} passage de culture) et ScMov (25^{ème} passage de culture) a été extrait et analysé par PCR en temps réel suivant un protocole identique à celui décrit dans l'article 2. Les analyses sont le résultat d'une moyenne établie sur un triplicat de culture.

II-3.2 Résultats

L'analyse différentielle des gènes *Chst8* et *ChGn1* a montré, par comparaison avec les cellules Mov non infectées, une sous expression au niveau transcriptionnel du gène *Chst8* dans les cellules Mov infectées d'un facteur $-5 (\pm 0,1)$. En revanche, aucune dérégulation n'a été observée concernant le gène *ChGn1*.

Conclusions

L'analyse de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de la glycosylation a montré que l'accumulation de PrPres entraînait la dérégulation de deux gènes, *ChGn1* (codant l'enzyme responsable de l'initiation vers la voie de synthèse des chondroïtines sulfates) et *Chst8* (codant l'enzyme GalNAc-ST1 responsable de l'ajout d'un groupement SO₄ sur un résidu GalNAc terminal), dans les cellules neuronales ScGT1 et seulement de *Chst8* dans des cellules d'origine gliales infectées par l'agent de la tremblante. Ces résultats semblent donc indiquer que l'accumulation de la forme pathologique de la PrP entraîne des dérégulations des mécanismes de la glycosylation et plus spécifiquement du gène *Chst8*. La description de la sous-expression du gène *Chst8* dans ces deux types cellulaires montre que la dérégulation d'un mécanisme précis de sulfatation se retrouve dans des modèles cellulaires issus à la fois du système nerveux central et du système nerveux périphérique, phénomène qui pourrait impliquer ce mécanisme de sulfatation des GalNAc dans les processus de propagation périphériques et centraux de l'agent infectieux. L'observation que non seulement le gène *Chst8* mais aussi la protéine correspondante, GalNAc-4-ST1, sont dérégulés dans les cellules ScGT1 indique clairement que dans les cellules infectées dans ce modèle, l'accumulation de PrPres peut entraîner une modification spécifique de la sulfatation, puisque sur les 37 gènes intervenant dans ce processus et présents sur la puce, seul *Chst8* est sous-exprimé.

Par ailleurs, la modification de la quantité de GAGs et spécifiquement la modulation de l'équilibre HS/CS dans les cellules ScGT1, semble corrélée à l'augmentation de l'expression du gène *ChGn1* et la diminution de l'expression des gènes intervenant dans la voie de synthèse des héparanes sulfates, ainsi qu'avec l'augmentation de la croissance cellulaire.

Les résultats obtenus suite à l'analyse de nombreux gènes intervenant dans les mécanismes de la glycosylation semblent converger vers l'idée d'une profonde altération de la régulation des gènes intervenant dans la synthèse des GAGs, qui pourrait être à l'origine des modifications de quantités de GAGs observés et des processus de pathogénèse. La sous-expression significative de *Chst8* dans plusieurs modèles cellulaires, semble quant à elle, indiquer un rôle prépondérant de l'enzyme GalNAc-4-ST1 et donc de quantités et de natures de charges négatives précises dans les maladies à prions et d'un contrôle sélectif par la PrPres de la transcription de certains gènes liés à la glycosylation .

DISCUSSION

I- RECHERCHES DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES

De nombreux aspects dans les maladies à prions manquent encore de clarté. Nous ne connaissons toujours pas la nature physique précise de l'agent étiologique de ces maladies, les mécanismes moléculaires et biochimiques associés à la neurodégénérescence ou la fonction physiologique de la PrPc. Toutes ces incertitudes sont probablement à l'origine de la difficulté à développer à l'heure actuelle un traitement efficace des ESST à la fois palliatif et curatif. Néanmoins, certaines stratégies étudiées ont montré qu'elles pouvaient interférer avec la réplication des ATNC et pouvaient prolonger la survie des animaux. Compte tenu des diverses études menées sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, on a pu constater que le potentiel thérapeutique d'une stratégie donnée dépendait de son site d'action périphérique et de la phase de l'infection du sujet auquel on administre le produit. L'absence de réponse immunitaire vis-à-vis des ATNC semble suggérer qu'après une contamination par voie périphérique, un traitement précoce dirigé contre les cibles initiales de l'infection ou bien empêchant le transport vers le système nerveux central devrait être potentiellement efficace. Aujourd'hui, en regard de la difficulté à traiter des patients au moment où le système nerveux central est atteint, nous nous sommes attachés plus particulièrement à développer un traitement efficace en périphérie avant que l'agent infectieux n'ait envahi le système lymphoréticulaire. Les données de Malucci et al. montrant la possibilité de réverser la perte neuronale à un stade avancé donné de la maladie pourraient représenter un premier espoir de traiter des patients à des stades tardifs de la maladie, néanmoins ces résultats sont trop précoces pour envisager d'établir un traitement dans ce sens aujourd'hui. Le choix de notre stratégie nous a permis de mettre en évidence de nouvelles molécules, et pourrait nous conduire à mieux appréhender les mécanismes intervenant au stade de réplication périphérique de l'agent infectieux.

I-1 La quinacrine

L'étude que nous avons menée sur la quinacrine nous a permis de mettre en évidence que les conclusions émises sur son efficacité *in vitro* ne sont pas suffisantes pour entraîner un effet notable sur le déroulement de la maladie *in vivo*. Cette molécule qui inhibe l'accumulation de PrPres dans un modèle cellulaire de neuroblastomes s'est montrée beaucoup moins efficace dans un autre modèle exprimant beaucoup plus fortement et stablement la PrPres. Il semblerait par ailleurs intéressant d'évaluer si son efficacité dépend également des conditions de culture et de l'état de croissance cellulaire, compte tenu d'une étude récente montrant la variation de la quantité de PrPres suivant ces paramètres [18]. Néanmoins, les données qui tendaient à montrer que cette molécule avait la capacité, certes faible, à inhiber la conversion de PrPc en PrPres, pouvaient laisser augurer un effet potentiel en périphérie avant que la PrPres ne s'accumule. Les rapide absorption et distribution de la quinacrine dans les organes et les tissus [8] et son élimination semblaient par ailleurs prometteuses, dans la mesure où, compte tenu de l'efficacité variable de la molécule, on souhaitait utiliser de fortes doses du composé. Les résultats obtenus *in vivo* montrent que la localisation cellulaire et sub-cellulaire de la molécule et de la protéine PrP, et la pharmacocinétique de la quinacrine ne sont pas suffisantes pour conduire à une efficacité significative de cette drogue *in vivo*. Les données qui montraient que la quinacrine pouvait se lier aux agrégats du peptide PrP 106-126, qui possède une faculté naturelle à polymériser et qui entraîne une toxicité vis-à-vis de cultures neuronales, et à l'hélice 3 de la partie C-terminale de la PrP humaine, indiquent que, malgré la capacité de cette molécule à se lier à la PrPc et selon Vogtherr, au facteur X [371], et à réduire l'amplification *in vitro* de la PrPc en PrPres, cette molécule ne peut empêcher cette conversion *in vivo*. L'étude réalisée récemment chez des patients atteints d'IFF vient confirmer cette observation puisque, malgré un traitement avec la quinacrine ou bien la chlorpromazine (autre molécule proposée comme candidat thérapeutique potentiel), aucune amélioration de l'état des patients n'est constatée [29].

Le mécanisme d'action de la quinacrine est controversé, cependant, elle possède plusieurs effets anti-inflammatoires et immunologiques : inhibition de la phospholipase A2 (PLA2) effets lysosomaux (augmentation du pH, stabilisation membranaire, inhibition du relargage et de l'activité des enzymes lysosomales), inhibition de la phagocytose, augmentation du pH intracellulaire dans les vacuoles cytoplasmiques ou activité antioxydante [165, 209, 266]. Ainsi, l'effet anti-prion de la quinacrine pourrait s'effectuer par différentes voies :

- La PrPres ayant été décrite pour s'accumuler dans les lysosomes et la quinacrine ayant un tropisme vers ces organites, cette molécule pourrait agir sur la conversion et l'accumulation de la PrPres dans ce compartiment cellulaire.
- L'addition d'inhibiteurs de la PLA2 à des neurones soumis au peptide neurotoxique PrP 106-126 entraîne une résistance à l'effet toxique induit par ce peptide et une réduction de l'activation de la caspase 3 et de la PGE2 [19, 20]. La PrPres ayant été décrite pour induire une réponse neuronale passant notamment par l'activation de la cyclooxygénase conduisant à la production de la prostaglandine PGE2 [17], et des taux de PGE2 élevés ayant été décrits chez des patients atteints de MCJ [237, 238], on peut supposer que le mécanisme d'action de la quinacrine, passe par cette voie d'inhibition de la production de PGE2.
- La séquence hydrophobe de la PrP contenue entre les résidus 113 et 120, riche en alanine (AGAAAAGA) est impliquée dans la capacité des prions à lier et déstabiliser la bicouche lipidique cellulaire. Ces peptides, en plus de leur caractéristique hydrophobe sont chargés positivement, ce qui leur permet d'interagir avec les lipides négativement chargés de la membrane cellulaire [190]. Ces propriétés ont été largement décrites pour induire la formation de canaux ioniques [191, 211]. Les données récentes de l'équipe de Prusiner, mettant en évidence l'oligomérisation de la protéine 27-30 en trimères pouvant former un canal membranaire [136] et celles montrant que la quinacrine a la capacité de bloquer les canaux formés par le peptide PrP106-126 [110], semblent impliquer la quinacrine dans la modification de la structure tridimensionnelle de la PrP et l'homéostasie cellulaire. Cependant, l'encombrement stérique induit par la quinacrine sur la polymérisation de la PrPres observé in vitro semble moindre in vivo. Les nouvelles bis-acridines développées récemment pourraient représenter de bons candidats pour améliorer ce mécanisme.

I-2 Les Héparanes mimétiques

La meilleure efficacité, à ce jour en périphérie, des polyanions et notamment dans notre étude, des HM pourrait résider dans plusieurs domaines. Nous avons pu observer que pour des injections à des doses beaucoup moins élevées, les HM sont beaucoup plus efficaces que la quinacrine. Les HM décrits pour se lier à la PrP, inhiber la conversion in vitro de PrPc en PrPres, tout comme la quinacrine, sont pourtant bien plus efficaces. Cela pourrait résider dans le rôle des héparanes sulfates comme acteurs intrinsèques du processus d'infection. En effet, les glycosaminoglycannes ont été décrits pour permettre l'interaction entre la PrP et le LRP et pour jouer un rôle dans l'endocytose de la PrP [207]. Dès lors, les polyanions et les HM

pourraient agir au niveau cellulaire par encombrement stérique, en raison de leur analogie de structure avec les glycosaminoglycannes, en inhibant la liaison PrP/LRP et l'endocytose de la PrPc, et par voie de conséquence, celle de la PrPres. Il semble donc que l'utilisation de molécules mimant des partenaires essentiels du processus d'infection, induise de fortes modifications dans ce processus. Par ailleurs, les très bons résultats obtenus sur l'inhibition de l'accumulation de la PrPres en périphérie, semblent indiquer que ces nouveaux composés sont très bien absorbés *in vivo* et que leur tropisme se dirige vers les compartiments essentiels à la réplication et à l'accumulation de la PrPres. Les résultats préliminaires obtenus sur des souris traitées avec un nouveau dérivé d'HM par voie intrapéritonéale dès le début de l'infection, qui n'ont montré, à ce jour, aucun signe de neurodégénérescence indiquent clairement le rôle prépondérant de la réplication de l'agent en périphérie et des héparanes sulfates dans le développement de la maladie. L'absence d'accumulation dans la rate, organe du système lymphoréticulaire impliqué fortement dans l'accumulation de PrPres en périphérie, nous montre la nécessité de déterminer les bonnes cibles.

La cinétique d'accumulation de la PrPres dans la rate peut nous permettre de mieux appréhender les mécanismes conduisant à l'inhibition de l'accumulation de PrPres par les HM. En effet, les études menées par Beringue et al. ont montré qu'après inoculation intrapéritonéale d'une souche de tremblante C506M3, la PrPres est détectée dans la rate de 1h à 6 h après inoculation, cette phase étant suivie d'une phase silencieuse comprise entre le 1^{er} et le 4^{ème} jour durant laquelle on ne détecte que de façon exceptionnelle la PrPres, puis à partir du 5^{ème} jour, la PrPres est de nouveau détectée de façon constante pour atteindre un plateau vers le 30^{ème} jour après inoculation [32]. La première phase de détection dans les 6h suivant la contamination correspond à la détection de l'inoculum, la phase silencieuse semble correspondre, selon les auteurs, à une étape de clearance de l'agent infectieux par les cellules immunitaires mais insuffisante, puisque la PrPres réapparaît 5 jours après l'inoculation, étape qui ici correspondrait à la détection de PrPres néosynthétisée à partir de PrPc endogène. Les données fournies par l'étude effectuée sur le dextran 500 préincubé avec l'inoculum avant la contamination indiquent que l'effet de cette molécule dont dérivent les HM, n'est pas spécifique d'une action sur l'inoculum lui-même, mais passe par une clearance de la PrPres progressive, probablement en empêchant l'ATNC de se répliquer dans les cellules cibles. La réapparition de la PrPres plus tard dans la rate indique, soit que l'effet de ce polyanion n'est que transitoire, soit que certaines cellules, réservoirs de l'infectiosité, sont résistantes au traitement par le DS500, soit que d'autres sources de tremblante sont présentes dans d'autres tissus que le système lymphoréticulaire ou bien que l'agent infectieux demeure dans le système à des niveaux encore indétectables. Les données obtenues dans notre étude, qui

restent encore à confirmer, indiquent que les nouveaux HM sont non seulement efficaces quand ils sont administrés 24h après l'inoculation, mais qu'ils permettent de prolonger la survie des animaux de façon remarquable. Ceci pourrait donc indiquer que les HM ont permis d'empêcher la propagation de l'agent infectieux en périphérie et donc d'atteindre le système nerveux central. Il reste désormais à déterminer si l'effet des HM provient d'une clearance très précoce de l'inoculum dans les premiers jours suivant l'inoculation et/ou d'une inhibition de la néosynthèse de PrPres. L'observation d'un prolongement élevé de la survie des animaux indique que la néosynthèse de PrPres devait être à des niveaux soit nuls soit insuffisants pour entraîner la propagation de l'agent.

Afin de mieux appréhender les mécanismes qui conduisent à ces phénomènes, il semblerait particulièrement intéressant d'établir une cinétique précoce de l'effet des HM dans la rate et sur les différentes populations cellulaires faisant partie intégrante de cet organe afin de déterminer si cette classe de molécules pourrait moduler la fonction de certaines d'entre elles. En effet, bien que la plupart des études *in vitro* suggère que l'effet des polyanions et des HM passent par un encombrement stérique conduisant à une inhibition de l'interaction de la PrP avec son récepteur, on peut supposer que l'effet de ces molécules pourrait s'effectuer sur les cellules du système immunitaire elles-mêmes, au moins au niveau de la rate.

En effet, une étude a montré que les HS chez le rat et la souris, sont différenciellement exprimés au niveau de la rate, ce qui pourrait créer un environnement extracellulaire spécifique dans les processus immunitaires [361]. Plus particulièrement, les auteurs ont pu montrer une colocalisation de l'IL-2 et des HS au niveau de la pulpe rouge et de la zone marginale (figure n°14). Le traitement par l'héparinase abolissant totalement la détection de l'IL-2, il semblerait que les structures d'HS soient associées avec la liaison de l'IL-2 et probablement avec d'autres molécules effectrices dans la réponse immunitaire [34, 343]. Par ailleurs, compte tenu de la localisation du sinus marginal près des cellules lymphoïdes de la pulpe blanche, la forte expression des HS dans le sinus marginal pourrait impliquer les HS dans le « homing » des lymphocytes vers la pulpe blanche.

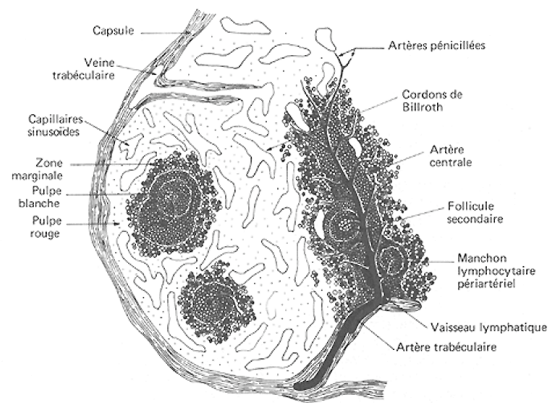
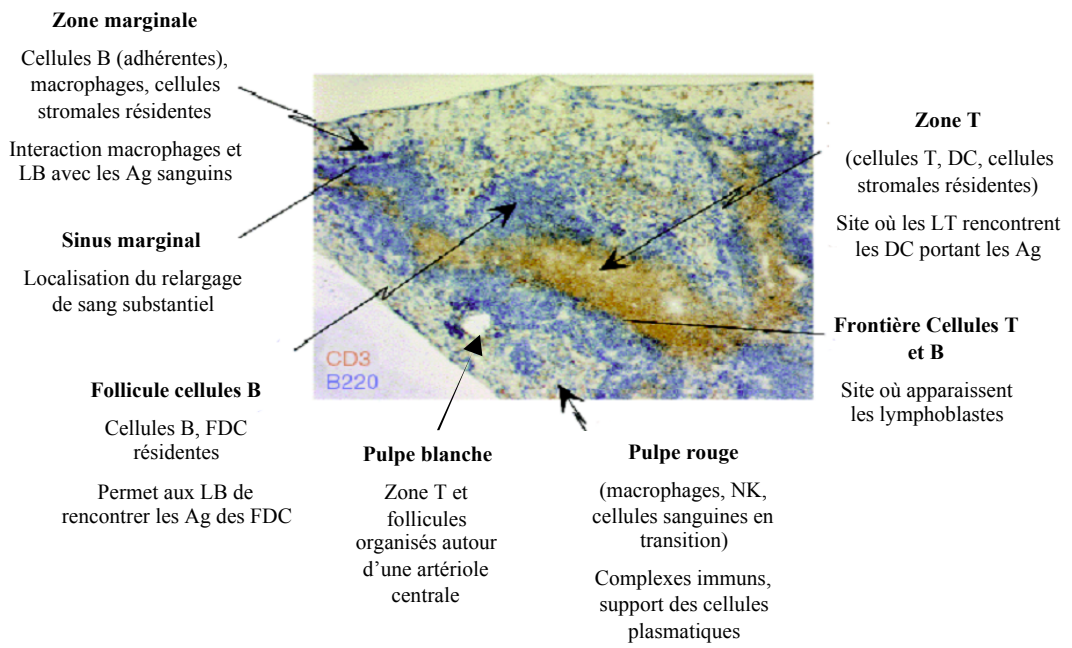


Figure n°14: Anatomie fonctionnelle de la rate d'après Cyster JG [84]

D'autre part, les HS qui se situent à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire, peuvent jouer un rôle important dans la régulation des fonctions vasculaires (figure n°15) (pour revue, [34])

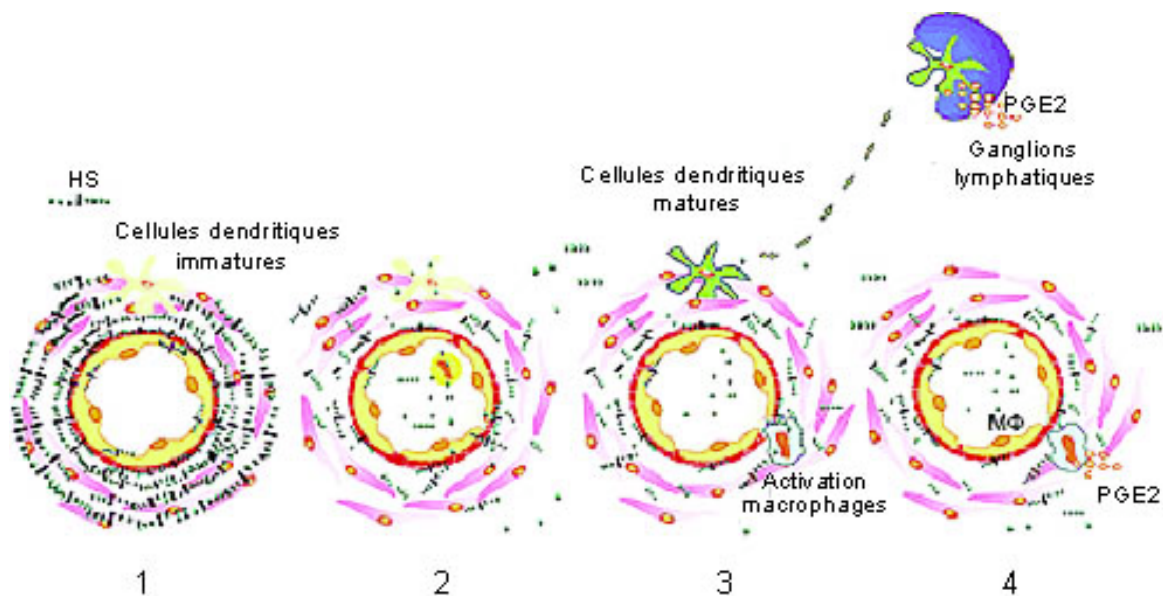


Figure n°15 : Initiation de la réponse immune après métabolisme local des HSPG (d'après [318]).

- 1 : Tissu normal. Les HSPG font partie intégrante de la membrane cellulaire et de la matrice extracellulaire
- 2 : Clivage des HSPG. La lésion tissulaire conduit à un rapide clivage du noyau protéique par des ectoprotéases des cellules endothéliales et par l'élastase relarguée par les neutrophiles et les macrophages. Les chaînes carbohydrates des HSPG sont clivées par l'héparanase libérée par les plaquettes.
- 3 : Activation des cellules présentatrices d'Ag par les fragments d'HS. Les fragments d'HS relargués stimulent la maturation et la migration des DC vers les ganglions lymphatiques.
- 4 : Contrôle de l'immunité par les chaînes d'HS. Le métabolisme des HSPG pourrait être une étape précoce du contrôle de la réponse immune dans les tissus.

Durant la réponse précoce à une lésion tissulaire et une invasion par des microorganismes, l'activation du complément sur les cellules endothéliales conduit à l'expression de protéases qui clivent la protéine des HSPG [164] et l'activation des plaquettes conduit à un relargage d'héparanase, une endoglycosidase qui clive les chaînes d'HS [267], résultant en une perte locale d'HS. Les fragments d'HS générés sont des stimuli importants pour l'initiation de la réponse immune primaire en médiant la maturation et l'activation de cellules présentatrices d'antigènes [163]. On peut supposer que si, comme il a été décrit dans la littérature et comme nous l'avons observé dans le modèle de ScGT1 (voir article n°2), la PrPres conduit à une perte d'HS, la réponse immune est perturbée, et en conséquence, les ATNC trouvent dans ce phénomène une voie pour se propager. Si cette hypothèse se vérifiait, on pourrait comprendre l'effet plus remarquable des HM, comparativement aux autres composés, sur la réplication de l'agent au moins dans les phases précoces au niveau périphérique.

I-3 Les porphyrines

L'étude que nous avons menée sur les porphyrines nous a conduit à identifier une molécule particulièrement intéressante. Parmi les molécules que nous avons en notre possession, nous avons pu constater qu'une seule était véritablement efficace in vitro, la métalloporphyrine P23 qui contient un atome de zinc, de longues chaînes substituées et des atomes de fluor qui devraient permettre une meilleure lipophilicité. Pour comparaison, la molécule P17 qui possède la même efficacité, possède en son cœur non pas un atome de zinc mais un atome de fer et des chaînes substituées moins longues. L'analyse structure/fonction de ces molécules semble pour l'heure difficilement interprétable. Il serait alors intéressant de déterminer plus précisément la cible privilégiée de chacune d'entre elles. En effet, une des fonctions des métalloporphyrines est leur rôle potentiel d'anti-oxydant et mimétique de l'activité superoxyde dismutase sur l'espèce réactive $O_2^{\cdot-}$ (figure n°16) [277]. L'activité SOD potentielle des porphyrines est particulièrement intéressante en raison d'une part, du rôle de la PrPc dans le stress oxydatif, et d'autre part, de l'augmentation des espèces réactives d'oxygène observée en présence de PrPres (pour revue [44]). Dans des souris PrP knock-out, une réduction de l'activité Zn/Cu SOD et une augmentation de la sensibilité aux radicaux libres des neurones et des astrocytes issus de ces souris sont observées [41]. Cette fonction s'exercerait par l'intermédiaire de la liaison au cuivre de la région octapeptide [323] permettant à la PrPc d'initier un signal de transduction conduisant à l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et des niveaux de glutathion [301]. Cependant, il est nécessaire d'être prudent sur la fonction de la PrPc comme SOD puisque Hutter et al. indiquent que sur des souris transgéniques, il n'y a aucune influence du génotype *Prnp* sur le dosage de SOD1 et SOD2 [162].

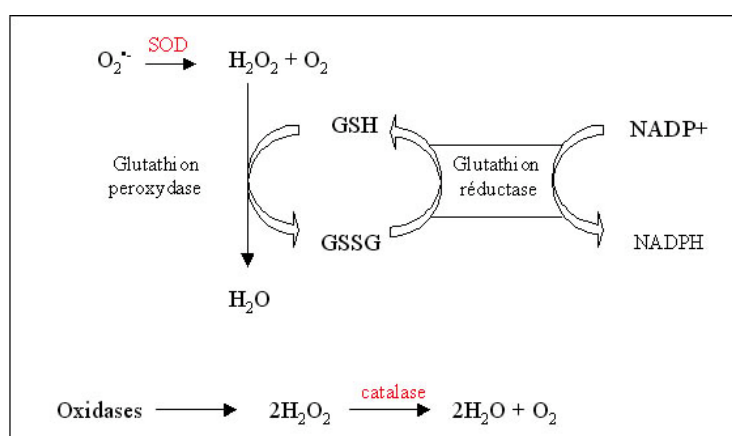


Figure n° 16: Mécanismes de défense antioxydant

Compte tenu de plusieurs études rapportant des degrés variables d'activité SOD, de charge et de caractéristiques pharmacodynamiques, suivant les groupes substituants les molécules, il serait intéressant de déterminer si la variation d'efficacité des métalloporphyrines testées, différant par leur structure, réside dans cette activité [21, 174]. Les données fournies par Okado-Matsumoto et al. permettent d'étayer plus précisément le rôle des structures des métalloporphyrines dans l'activité SOD [264]. Selon eux, les porphyrines cationiques très stables portant un ion Mn, possèdent des charges positives qui peuvent conduire à une meilleure solubilité dans l'eau et une facilitation électrostatique des interactions avec l'espèce $O_2^{\cdot-}$, et le potentiel d'oxydo-réduction du métal central peut être optimisé par l'attachement de substituants. Leur travail a également permis de montrer que les composés qui ont les chaînes les plus longues présentent une plus grande toxicité, probablement par leur activité détergente, et qu'une meilleure lipophilicité est déterminante dans leur efficacité à dismuter le $O_2^{\cdot-}$. Par ailleurs, l'importance de la présence des ions centraux sur les porphyrines dans l'activité SOD a également été démontrée chez E.coli et chez la levure [264]. Dans notre étude, on a pu constater que les porphyrines P10 et P18 qui portent un ion Mn central, ne présentent pas une meilleure efficacité que les porphyrines portant d'autres ions centraux. Compte tenu des données apportées par Okado-Matsumoto et des résultats que nous avons obtenus, on peut supposer que la présence des ions fluor sur la porphyrine P23 conduit à une meilleure lipophilicité, jouant un rôle probable dans l'activité SOD de cette porphyrine. En revanche, la présence de chaînes substituées plus longues que dans la porphyrine P17 ne semble pas affecter sa toxicité sur les cellules, mais pourrait au contraire aider à la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$.

Par leur analogie avec le hème, une autre fonction décrite des porphyrines est leur activité essentiellement inhibitrice sur la hème oxygénase (HO-1), l'enzyme qui catalyse la dégradation du hème, conduisant à la production de fer, de CO et de biliverdine, elle-même réduite en bilirubine (figure n°17) [351].

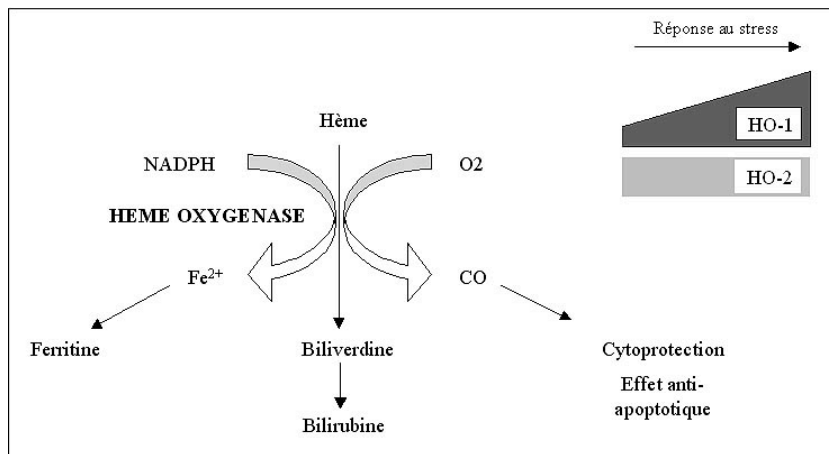


Figure n°17: Activité hème oxygénase dégradant le hème en ferritine, biliverdine et CO

L'induction de l'expression de HO-1 peut avoir des effets contradictoires :

-L'expression de la HO-1 est retrouvée dramatiquement augmentée dans le cerveau en réponse au stress [106]. L'induction des ARNm HO-1 conduit à un effet cytoprotecteur [253] en induisant la synthèse de molécules cytoprotectrices comme la ferritine [13, 369] ou en produisant plus de biliverdine et donc de bilirubine, qui est aussi un scavenger des espèces réactives d'oxygène in vitro [348].

- Cependant, de fortes concentrations en bilirubine dans le cerveau sont toxiques [61]. Suresh et al ont montré qu'en prévenant la formation de bilirubine, les métalloporphyrines avaient le potentiel de réduire les taux de bilirubine non conjuguée chez les nouveaux nés et réduisaient le risque d'encéphalopathie néonatale et les altérations neurodéveloppementales à long terme induites par la toxicité de la bilirubine dans le SNC [351]. L'observation dans la maladie d'Alzheimer de taux élevés de bilirubine en partie dus à une forte concentration en hème dans les tissus [182] et d'une corrélation entre le niveau de protéine HO-1 et la pathologie neurofibrillaire de maladie d'Alzheimer [326], semblent indiquer un rôle délétère de la surexpression de HO-1 dans les maladies neurodégénératives. La description dans des cellules PC12 exposées au peptide neurotoxique 106-126 de l'induction d'un stress cellulaire et d'une accumulation d'ARNm HO-1 [309], et in vivo, de l'augmentation de l'expression de HO-1 dans le neuropile de souris infectées par la souche de prion ME7, montre le rôle de HO-1 dans les maladies à prions. On peut alors supposer, compte tenu de l'effet décrit des métalloporphyrines sur la HO-1 et des caractéristiques décrites dans les maladies neurodégénératives, que l'effet des métalloporphyrines dans les maladies à prions pourrait aussi passer par cette voie de réponse au stress.

I-4 Les populations cellulaires dans le contrôle de la réplication de l'agent infectieux

L'efficacité variable des composés *in vivo* semble montrer la nécessité d'examiner de plus près la fonction des populations cellulaires en périphérie et plus spécifiquement les cellules pouvant être potentiellement responsables du transport de la PrPres vers les organes réservoirs et les cellules de la rate qui accumulent la PrPres. En effet, la rate est un organe composé de diverses populations cellulaires telles que les macrophages, les lymphocytes B et T et les cellules folliculaires dendritiques décrites pour avoir un rôle prépondérant dans l'accumulation de PrPres et l'interface neuro-immune (figure n°14).

Les données obtenues dans une étude parallèle non développée dans ce manuscrit, sur l'accumulation de la PrPres chez des souris sauvages C57Bl/6 de génotype « N » (NIH) ou « J » (Jackson) après inoculation par voie intrapéritonéale d'une souche de tremblante adaptée (C506M3), rejoignent l'idée d'examiner de plus près la constitution des cellules de la rate et de leur expression en PrPc. En effet, la cinétique que nous avons effectuée a montré que la PrPres s'accumulait différemment suivant le génotype murin, à la fois en terme de quantité et de temps. Les souris de génotype « J » qui montrent une quantité de PrPc basale splénique plus faible que les souris de génotype « N », montrent que même 56 jours après inoculation, le plateau n'est toujours pas atteint, tandis que pour les souris de génotype « N », on observe un plateau d'accumulation de PrPres dans la rate, 35 jours après inoculation intrapéritonéale. Ce phénomène qui pourrait être dû à une dérive génétique vient d'une part confirmer l'importance de l'expression de la PrPc dans l'accumulation de PrPres mais pourrait également révéler que les acteurs cellulaires mis en jeu lors de l'infection seraient ou interviendraient de manière différente. Les données fournies par un autre laboratoire travaillant sur la radiosensibilité de ces animaux semblent corroborer notre hypothèse (communication personnelle). En effet, d'une part, les souris de génotype « N » qui expriment plus de PrPc splénique et accumulent plus rapidement la PrPres dans la rate sont plus radiorésistantes que les souris « J ». D'autre part, les souris « J » qui accumulent moins rapidement la PrPres, possèdent un système immunitaire plus développé et une quantité de cellules dans la rate plus importantes que les souris « N ». Ces données relancent dès lors le rôle des cellules immunitaires dans le contrôle de l'accumulation de la PrPres dans les stades précoces de l'infection. Il semble donc évident de déterminer plus précisément l'importance de l'expression de la PrPc dans une population cellulaire donnée et le rôle exact de chacune des populations dans l'accumulation et le contrôle de la PrPres afin de développer un thérapie

pour laquelle la cible aura été évaluée auparavant.

Les FDC et les lymphocytes B ont été décrits pour être impliqués dans la propagation de l'agent au niveau du SLR, et dans le SNP. Il semble que les cellules de Schwann aient également un rôle prépondérant [114] et pourraient servir de réservoir de l'infectiosité dans les tissus périphériques tels que les ganglions, les nerfs, l'intestin, et les muscles. Par ailleurs, la co-culture de cellules ScGT1 avec des cellules dendritiques CD11c+ d'origine myéloïde a permis de montrer *in vitro* que ces cellules dendritiques pouvaient dégrader l'accumulation de PrPres [215]. Cependant, le rôle de ces cellules migrantes, semble controversé puisque certains ont montré qu'elles pouvaient intervenir dans le transport de la PrPres depuis l'intestin vers les tissus lymphoïdes [158].

Ainsi, afin d'établir de façon plus précise le potentiel thérapeutique d'un composé dans un modèle de réplication périphérique, et compte tenu des diverses études montrant des résultats divergents entre ce qui est observé *in vitro* et *in vivo*, il semble déterminant aujourd'hui de développer des modèles cellulaires qui se rapprochent des conditions observées *in vivo* et notamment de développer des modèles représentant les mécanismes observés en périphérie. Or, jusqu'à présent, toutes les études menées sur l'efficacité de potentielles molécules thérapeutiques ont été effectuées sur des lignées neuronales dérivant du SNC. Les lignées cellulaires avec des caractéristiques de cellules de Schwann (Mov), montrant une très bonne capacité à être infectées par les prions, pourraient représenter un bon modèle de la pathophysiologie périphérique [9].

Cependant, il est nécessaire de ne pas oublier que même si l'accumulation de l'agent infectieux et le développement de la maladie dans le SNC sont clairement perturbés dans des souris immunodéficientes, plusieurs études ont montré qu'il existait un mode de propagation de l'agent indépendant du système lymphoréticulaire et donc de la réplication périphérique de l'agent. En effet, des souris qui n'expriment pas de PrP dans le SLR peuvent être infectées [299] alors que la PrPc a été montrée comme étant nécessaire à l'infection.

I-5 Efficacité thérapeutique et souches de prions

La difficulté à trouver un traitement efficace réside également dans l'existence de plusieurs souches d'ATNC pour lesquelles on a décrit des différences dans le tropisme cellulaire. Ainsi, les souches de tremblante chez le mouton et le vMCJ sont lymphotropes, tandis que l'agent de la MCJ sporadique et celui de l'ESB le sont moins [132, 154]. L'efficacité des molécules s'est par ailleurs révélée dépendante de la souche administrée dans diverses expériences que nous

avons menées. La souche de tremblante qui s'accumule fortement dans la rate 35 jours après inoculation semble plus facile à éliminer que l'agent de l'ESB, qui pourtant s'accumule beaucoup moins. Il semblerait donc que ce ne soit pas la quantité de PrPres qui soit difficile à combattre mais l'agent lui-même ou bien son processus de transconformation. Les divergences sur les compartiments préférentiels d'accumulation et probablement de réplication ont été clairement montrées par les études montrant qu'après inoculation par voie intrapéritonéale avec la souche de tremblante RML à des souris PrP knock-out et greffe de moëlle osseuse, les souris développaient la maladie probablement en raison des lymphocytes [36]. Au contraire, la souche ME7 ne semble pas se propager, même après reconstitution du système hémato et lymphopoïétique [45]. C'est également ce que l'on constate pour l'agent de l'ESB qui est difficilement détectable dans les organes lymphoïdes chez la vache tandis que le vMCJ dont il provient, colonise fortement les organes lymphoïdes chez l'homme. Compte tenu de ces différences observées à la fois au niveau de l'ATNC lui-même et de la réponse de l'hôte à l'infection, les différences observées entre les diverses classes de molécules ne semblent pas étonnantes.

Le développement d'une thérapie efficace contre les ESST a pour but ultime de traiter des patients atteints de MCJ et particulièrement du vMCJ. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucun système cellulaire de réplication de l'agent responsable du vMCJ et l'on ne teste les molécules que dans des modèles d'accumulation de l'agent de la tremblante. Compte tenu des différences observées entre les divers ATNC sur le tropisme cellulaire et les conséquences neuropathologiques, ceci pourrait ajouter un obstacle supplémentaire au développement d'une stratégie efficace urgente dans le traitement des personnes en période d'incubation du vMCJ. Compte tenu de la difficulté à obtenir des extraits de cerveaux de patients atteints du vMCJ ou bien d'autres formes de MCJ, des extraits de cerveau de bovins infectés représentent des échantillons de choix puisqu'il est admis aujourd'hui que l'agent de l'ESB est à l'origine du vMCJ. Dans ce projet de thèse (partie que nous avons choisi de ne pas développer dans ce manuscrit), nous avons tenté d'établir une lignée cellulaire infectable et infectée par l'agent de l'ESB. Cependant, ces travaux qui ont demandé une étude et une élaboration longue, n'ont pas abouti. Des cellules GT1 et des cellules d'origine gliale qui se sont montrées facilement infectables par divers agents de la tremblante, n'ont pu être infectées avec l'agent de l'ESB, même après avoir transfecté ces cellules de façon à leur faire surexprimer la PrP bovine. Notre stratégie qui consistait à faire exprimer aux cellules, la PrPc de la même espèce que l'agent de l'ESB, afin de s'affranchir du phénomène de barrière d'espèce, n'a pas permis d'obtenir de résultats concluants. Malgré une forte expression de la PrPc bovine sur un fonds génétique murin sans expression endogène de PrPc murine, nous ne sommes pas parvenus à

induire la transconformation de la PrPc bovine en PrP bovine pathologique. Aujourd'hui, il est difficile de donner une explication simple à cet échec surtout en regard de la très bonne transmissibilité interspèces de cette souche d'ESST in vivo [251]. Ceci montre une fois de plus les différences entre modèle in vitro et in vivo. Soit, le mode d'infection utilisé n'était pas suffisamment adapté à la souche que nous avons, soit l'expression seule de PrPc bovine n'est pas suffisante pour permettre sa transconformation en PrP bovine pathologique. Par ailleurs, les données de Melot et al. [233] montrant l'importance de la glycosylation de la PrPc bovine dans les différences d'infection des cellules immunitaires bovines, indiquent qu'il serait important de vérifier l'état de glycosylation de la PrP bovine présente dans le clone cellulaire que nous avons établi.

Plusieurs données semblent donc renforcer l'extrême difficulté à développer une stratégie efficace contre les agents des ESST : a) tous les ATNC n'ont pas le même tropisme cellulaire, b) n'activent pas les mêmes populations cellulaires, c) ne s'accumulent pas de la même façon in vivo, et d) n'entraînent pas les mêmes conséquences neuropathologiques.

II- GENES INTERVENANT DANS LES MECANISMES DE LA GLYCOSYLATION ET LES MALADIES A PRIONS

La glycosylation est la modification post-traductionnelle la plus fréquente dans les cellules eucaryotes. Entre 0,5% et 1% des gènes humains codent pour des protéines impliquées dans la synthèse, la dégradation et la fonction des glycoconjugués [120]. La N-glycosylation est un mécanisme complexe conduisant à diverses fonctions dans la cellule et composé d'étapes spécifiques catalysées par des enzymes précises. Il existe des anomalies génétiques affectant certaines étapes de la synthèse des N-glycans, appelées anomalies congénitales de la glycosylation ou CDG. Ces anomalies conduisent à des tableaux cliniques différents et sont fréquemment associées à un retard du développement, ou bien des anomalies hématologiques et parfois la mort. L'existence de l'implication d'une perturbation des mécanismes liés à la glycosylation dans des maladies génétiques est particulièrement intéressante dès lors que la glycosylation semble jouer un rôle dans les maladies à prions, à la fois au niveau du métabolisme de ces agents mais également d'un point de vue thérapeutique, domaine où nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de nouveaux mimétiques d'héparanes sulfates. L'étude que nous avons menée nous a conduits à mettre en évidence la dérégulation de plusieurs gènes dont deux particulièrement. La dérégulation de *Chst8*, codant pour la N-acétylgalactosamine-4-O-sulfotransférase 1, semble directement liée à la présence de la PrPres cellulaire, compte tenu d'une part de l'effet de réversion de la sous-expression de ce gène par des HM et d'une dérégulation similaire retrouvée dans une autre lignée cellulaire (Mov) infectée par la souche de tremblante. La dérégulation de *ChGnl* a retenu notre attention en raison de son rôle dans la synthèse des chondroïtines et nous a permis de constater la diminution de l'expression des gènes intervenant dans la synthèse des HS ainsi que des HS eux-mêmes, corrélée à une augmentation de la quantité de CS et une augmentation de la croissance cellulaire dans les cellules infectées. Notre étude montre donc que les mécanismes liés à la transcription de gènes spécifiques de la glycosylation dans le modèle cellulaire que nous avons choisi sont perturbés par la présence de PrP pathologique. Dans cette partie de la discussion, nous nous attacherons à montrer les raisons du choix du modèle utilisé dans cette étude, l'enseignement apporté par d'autres pathologies liées à une

perturbation de la glycosylation et les conséquences hypothétiques des dérégulations que nous avons observées au niveau des gènes *Chst8* et *ChGn1*.

II-1 Choix du modèle utilisé

Nous avons choisi le modèle de cellules neuronales dérivées d'hypothalamus de souris pour plusieurs raisons. D'une part, ce modèle est un système qui exprime de façon naturellement forte la PrPc murine, ce qui est un pré-requis important compte tenu des données indiquant le rôle de la PrPc dans l'infection [39]. Par ailleurs, les cellules infectées, ScGT1, ont montré qu'elles exprimaient fortement la PrPres [259], ce qui est un atout pour étudier l'impact de la PrPres sur la glycosylation. Un autre élément qui nous a conduit à choisir ce modèle réside dans l'utilisation de ce système dans le criblage de nouvelles molécules potentiellement thérapeutiques. Un autre volet de ce travail étant de développer de nouvelles molécules, il semblait donc approprié de choisir ce modèle afin de déterminer si l'efficacité d'une molécule sur l'accumulation de la PrPres pouvait être corrélée à une modification des dérégulations des gènes impliqués dans la glycosylation, ce qui a effectivement, été observé avec les héparanes mimétiques pour le gène *Chst8*.

Les dérégulations observées ont été détectées dans un modèle cellulaire murin infecté par l'agent de la tremblante. A ce stade de l'étude, il serait prématuré de corréler ce que l'on observe dans le modèle in vitro sur lequel nous avons travaillé à ce qui peut survenir d'une part chez l'animal et d'autre part chez l'homme. Des études menées en parallèle sur la souris transgénique Tg338 (surexprimant la PrP ovine), semblent indiquer que les gènes trouvés dérégulés dans la rate et le cerveau sur une cinétique d'accumulation de la PrPres dans ces organes sont différents de ceux que l'on observe dans notre modèle (communication personnelle de l'équipe de la Faculté des Sciences, Limoges). Ce modèle est différent des cellules ScGT1, puisqu'il s'agit d'un modèle animal murin exprimant la PrPc de l'espèce ovine infecté par une souche de prion différente (souche de tremblante Dawson tandis que c'est la souche Chandler qui se propage dans les cellules GT1). Par ailleurs, l'étude réalisée avec des puces à ADN sur un organe entier tient compte d'un ensemble de populations cellulaires pour lesquelles on n'a encore que des données fragmentaires sur leur fonction dans les processus d'infectiosité, de réplication, de transport et d'accumulation de l'agent. Néanmoins, les résultats de cette étude ont montré qu'une sialyltransférase était sous-exprimée dans les rates de souris infectées. La description de la localisation dans des fractions vésiculaires de cette enzyme, normalement retrouvée dans le Golgi, rejoint nos résultats

indiquant une potentielle localisation extra-golgienne de l'enzyme GalNAc-4-ST1 et confirme une localisation spécifique de dérégulations de l'expression d'enzymes impliquées dans la glycosylation. Il nous appartient désormais de déterminer les conséquences de telles modulations et leur fonction dans les mécanismes d'infection.

L'utilisation de la puce à ADN humaine développée par le laboratoire de Limoges, semblerait plus pertinente pour caractériser les dérégulations potentielles des gènes intervenant dans les processus de la glycosylation chez l'homme. Cependant, pour l'heure, il semble difficile pour des raisons aussi bien éthiques que techniques de réaliser ces analyses sur des tissus humains.

II-2 Les prions et le contrôle de la glycosylation cellulaire

L'une des premières études mettant en cause une modification de l'activité enzymatique intervenant dans la glycosylation de la PrP a été réalisée par l'équipe de Rudd [314]. Cette équipe a montré que la PrP^C et la PrP^{Sc} possédaient le même type de glycannes, mais que la PrP^{Sc} renfermait un taux plus élevé de motifs glycaniques tri et tétra-antennés. Les auteurs ont supposé, mais non démontré, que cette différence devait être liée à une diminution de l'activité d'une enzyme, la GnTIII, responsable de l'addition d'un GlcNAc à la position 4 d'un mannose de la bisection d'une chaîne pentasaccharidique cœur. Une unité spécifique du gène *MGAT3* se trouve sur la puce à ADN murine utilisée dans notre étude. L'expression du gène n'a pas été trouvée dérégulée dans notre modèle cellulaire. Cette observation pourrait s'expliquer par la différence entre les modèles analysés : lignée cellulaire dans notre étude et cerveau entier dans l'étude de Rudd. Il reste donc à déterminer si l'expression de *MGAT3* est spécifique d'un type cellulaire donné ou d'une localisation spécifique du cerveau ou liée à une réaction inflammatoire.

La PrP n'est pas la seule protéine à avoir montré une modification de son niveau de glycosylation. En effet, Nielsen et al ont démontré une dérégulation de la glycosylation d'une autre glycoprotéine, le récepteur à l'insuline (IR) suite à l'accumulation de PrP^{Sc} dans le modèle de neuroblastome N2a [258]. Notons que l'augmentation de 2 à 4 fois de la quantité de protéines IR est corrélée à une diminution de sa glycosylation entraînant une diminution des sites de fixation à l'insuline. Ces résultats indiquent donc que la PrP^{Sc} a la capacité de perturber la machinerie de sa propre glycosylation, mais également d'autres glycoprotéines. Cette dérégulation de la glycosylation d'autres protéines est réalisée de façon très sélective puisque dans cette étude, seul le récepteur à l'insuline voit sa glycosylation altérée, alors que le récepteur IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor) qui possède une structure et une

fonction similaires au récepteur à l'insuline IR, n'est absolument pas perturbé. Ces résultats sont donc en accord à différents niveaux avec les études que nous avons obtenues dans notre modèle. D'une part, nous avons constaté une dérégulation spécifique et unique des gènes *ChGn1* et *Chst8* qui font partie d'une famille de gènes. D'autre part, tandis qu'une augmentation de la quantité des chondroïtines sulfates a été trouvée corrélée à une surexpression du gène *ChGn1*, la sulfatation de ces GAGs spécifiques pourrait être perturbée vers une hyposulfatation, ce qui pourrait conduire à une nouvelle fonction précise de ces nouveaux composés. Il reste donc désormais à déterminer les raisons d'une telle sélectivité dans la perturbation de la machinerie de glycosylation, les mécanismes qui la sous-tendent et si cette sélectivité possède une origine commune.

II-3 Pathologies liées à la perturbation de la glycosylation et leur enseignement

II-3.1 Les CDG

La plupart des désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) découverts à ce jour montrent une altération des processus de N-glycosylation. Comme on peut le constater dans le tableau n°10, les CDG ont été classées selon les gènes et les enzymes pour lesquelles ils codent. Dans les dystrophies musculaires congénitales (CMD), on observe la déficience en une protéine appelée α dystroglycan [390]. Des biopsies musculaires de patients atteints de CMD ont montré que ces maladies étaient liées à une déficience dans le processing post-traductionnel du dystroglycan. L'un des enseignements tiré de ces maladies repose d'une part, sur le fait que des maladies congénitales montrant des effets cliniques distincts peuvent être liées à des mutations intervenant sur des gènes codant pour des enzymes de la glycosylation et d'autre part, sur la possibilité de réverser les symptômes. En effet, de nombreuses enzymes impliquées dans les mécanismes de la glycosylation, bien que distinctes, possèdent des spécificités leur conférant des fonctions similaires à d'autres. Récemment, il a été décrit que la surexpression dans le muscle squelettique de souris *mdx* (modèle de la maladie de Duchenne), d'une GalNAc transférase extraite de cellules T cytotoxiques (CT) améliorait les symptômes de la dystrophie musculaire [255]. Les auteurs montrent que l'expression ectopique de différentes glycosyltransférases pourrait être efficace dans le traitement des CMD associées à la réduction d' α dystroglycan.

Type d'erreurs métaboliques	CDG	Anomalie de glycosylation des N-GP	Métabolisme déficitaire	Protéine	Gène
1. Production et mobilisation de sucre activé	CDG Ia	Abs N-GP	Accumulation inconstante de GlcNAc ₂ Man ₅	PMM	<i>PMM2</i>
	CDG Ib	Abs N-GP		PMI	<i>MP1</i>
	CDG Ie	Abs N-GP	Accumulation de GlcNAc ₂ Man ₅	Dol-P Man synthase	<i>DPM1</i>
	CDG If	Abs N-GP	Accumulation de GlcNAc ₂ Man ₆ , GlcNAc ₂ Man ₉ , GlcNAc ₂ Man ₆ Glc ₃ , GlcNAc ₂ Man ₇ Glc ₃	Lec35	<i>MPDU1</i>
2. Transporteur de sucre activé	CDG IIc/ LAD II	Défaut de fucosylation des N-GP sériques	Accumulation de GDP-fucose	Transporteur du GDP-fucose	<i>ORF-7</i>
3. Glycosyl transférase	CDG Ic	Abs N-GP	Accumulation de GlcNAc ₂ Man ₇	Dol-P-Glc : Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₇ α1, 3-Glc transférase	<i>hALG6</i>
	CDG Ig	Abs N-GP	Accumulation de GlcNAc ₂ Man ₇	Dol-P-Man : Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₇ -Man-transférase	<i>hALG12</i>
	CDG Ih	Abs N-GP	Accumulation de GlcNAc ₂ Man ₉ Glc _{α-1}	Dol-P-Glc : Dol-PP-GlcNAc ₂ Man ₉ Glc α1, 3-Glc transférase	<i>hALG8</i>
	CDG Id	Abs N-GP	Accumulation de GlcNAc ₂ Man ₅	Dol-P-Man : Man ₅ GlcNAc ₂ -PP-Dol Man transférase	<i>hALG3</i>
	CDG IIa	Chaîne monoantennée des N-GP sériques		UDP-GlcNAc α6-D-Man-β1, 2-GlcNAc transférase II	<i>MGAT2</i>
	CDG IIb	Chaîne bi-antennée monogalactosylée et monosialylée des N-GP sériques		UDP-Gal : β-GlcNAc ₂ β-1, 4-galactosyl transférase I	<i>B4GALT1</i>
<i>I-cell disease</i>		Hydrolases lysosomales présentes dans le milieu extracellulaire		GlcNAc-1-phospho-transférase	<i>GNPT</i>
4. Glycosidase	CDG IIb	Glc(α1-2)Glc(α1-3)Glc(α1-3)Man présent dans les urines		Glucosidase I	<i>GLSI</i>

Tableau n°10: Les anomalies congénitales de la glycosylation et les différents gènes touchés (d'après Dupré T, [101])

Ces résultats indiquent qu'il serait possible de réverser certaines perturbations de la machinerie de glycosylation par l'expression exogène de glycosyltransférases. Il semble donc intéressant et pertinent d'effectuer ce type de recherches pour le gène *Chst8* ou/et l'enzyme correspondante si l'on suspecte, et si l'on veut vérifier, que la 4-O-sulfatation sélective de certains oligosaccharides pourrait être au coeur de la problématique des phénomènes de conversion PrPc/PrPres (travaux en cours par l'équipe de Limoges).

II-3.2 Pathologies et glycosaminoglycannes

Notre étude nous a conduits à constater la dérégulation des voies de synthèse des GAGs aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau des produits de synthèse (CS ou HS). Nous avons montré que les gènes intervenant dans la voie de synthèse des HS étaient pour la plupart sous-exprimés et que seul le *ChGn1*, intervenant dans l'initiation vers la voie de synthèse des CS était fortement surexprimé. La quantification des HS et CS a permis de corroborer les résultats obtenus au niveau transcriptionnel et confirme un certain déséquilibre entre les quantités de HS et de CS en faveur des CS. L'effet observé sur la croissance cellulaire, à savoir un effet stimulateur de la croissance sous l'effet du nouvel équilibre entre HS et CS dans les cellules infectées est en accord avec l'étude effectuée par Miziguchi et al dans *C. Elegans*. En effet, l'inactivation du gène orthologue de *ChSy*, codant pour la chondroïtine synthase, résulte en une cytokinèse incomplète [240]. Ces résultats ont permis de montrer que l'altération d'un gène impliqué dans la voie de synthèse des CS peut conduire à une modification de la division cellulaire. Même s'il est nécessaire d'être prudent quant aux conclusions tirées de cette étude, qui ne montre pas directement la relation entre la surexpression du gène *ChSy* et la stimulation de la cytokinèse, il semble qu'il existe une corrélation entre l'expression des gènes intervenant dans la voie de synthèse des CS et la croissance cellulaire. Notons que les variations de quantités des HS et des CS et les gènes intervenant dans la voie de synthèse des HS ont déjà été décrits pour intervenir dans d'autres pathologies. En effet, des mutations sur les gènes *Ext1* et *Ext2* impliqués dans la synthèse des HS sont à l'origine de maladies autosomales dominantes appelées exostoses multiples héréditaires (HME) [396]. Par ailleurs, l'étude concernant plusieurs types d'amyloïdoses (Maladie d'Alzheimer, Amyloïdose AA, Amyloïdose liée à la b2 microglobuline) ont montré une modification profonde et localisée dans le cerveau du pourcentage de CS et HS [263, 337]. En utilisant des cultures de fibroblastes dérivés de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (AD), Zebrower et al ont montré une modification sélective de la quantité de motifs glycaniques précis [401], postulant que les HS étaient altérés chez les patients AD par un contrôle anormal des O-sulfotransférases dans la biosynthèse des HS. Cette étude est particulièrement intéressante dans la mesure où elle met en cause, comme dans notre étude, le rôle potentiel d'une sulfotransférase dans une amyloïdose. Cependant, Cheung et al. n'ont retrouvé que des différences minimales [73]. En revanche, une perte importante sélective des kératanes sulfates (unités disaccharidiques Galb1,4GlcNac) dans le cortex cérébral des patients AD a été détectée. Les amyloïdoses, dont font partie les maladies à prions, semblent donc caractérisées par une dérégulation de la quantité des HS et des CS qui pourraient

dès lors jouer un rôle dans les phénomènes de fibrillogénèse [183]. Par ailleurs, notre étude montrant un déséquilibre des deux composants principaux des GAGs rejoint celles décrites par Papakonstantinou et Gabizon dans les maladies à prions. Papakonstantinou et al. montrent une diminution de 40% des GAGs totaux dans le cerveau de bovins infectés par l'agent de l'ESB [275] corrélée à une diminution de la neuroprotection. Gabizon et al. quant à eux décrivent une surreprésentation des GAGs liés à la PrP dans les urines de patients MCJ, AD et dans le cerveau de souris infectées par la tremblante [230]. Il nous appartient désormais de déterminer si les modulations de la quantité des différents GAGs retrouvées au niveau d'une lignée cellulaire neuronale, se retrouvent in vivo au niveau cérébral et si ces dérégulations, comme on le suspecte et comme il semble être décrit dans la littérature, sont localisées sélectivement et représenteraient une nouvelle cible dans le domaine thérapeutique. Les études réalisées après lésion du système nerveux semblent rejoindre nos hypothèses. En effet, après lésion du système nerveux, on observe généralement une forte augmentation de CS autour de la région de la lésion avec des effets divergents sur la régénération axonale et neuritique [245]. Certains montrent un effet inhibiteur sur la croissance neuritique, contribuant alors à une nature non permissive de la lésion gliale (astrocyte, oligodendrocyte et cellules méningées) [245]. Par ailleurs, une étude réalisée sur l'épilepsie montre que cette pathologie est caractérisée par une sclérose de l'hippocampe, associée à une perte neuronale et une gliose réactive, phénomènes histologiques que l'on retrouve aussi dans les maladies à prions. Chez ces patients, on observe dans l'hippocampe, une augmentation de CS de 224% et d'acide hyaluronique de 146%, mettant en évidence des modifications des GAGs ciblées au niveau du cerveau [281]. Ces changements très localisés de la quantité des CS associés à des caractéristiques histologiques que l'on retrouve dans les maladies à prions semblent confirmer l'hypothèse d'un rôle des GAGs et plus précisément des CS dans ces pathologies. La description d'un rôle protecteur des CS, tel que l'atténuation de la neurodégénération induite par le peptide β amyloïde [394] ou bien un effet protecteur de la barrière hémato-encéphalique après une lésion [113] rend complexe l'interprétation de nos résultats. L'augmentation de l'expression transcriptionnelle de *ChGn1* intervenant dans l'initiation de la voie de synthèse des CS corrélée à une diminution de l'expression transcriptionnelle de *Chst8*, une quantité maximale de CS dans les ScGT1 et une augmentation de la croissance cellulaire pourraient avoir différentes significations:

- Compte tenu du caractère généralement inhibiteur des CS vis-à-vis de la croissance neuritique et à l'opposé d'une croissance cellulaire plus forte dans les ScGT1, si l'augmentation de CS observée est un mécanisme de défense de la cellule vis-à-vis de

l'infection, il semblerait qu'il soit insuffisant. Ce mécanisme pourrait même être détourné par la PrPres pour se propager.

- Il pourrait s'agir d'un mécanisme totalement intrinsèque à la PrPres pour se propager. C'est la PrPres elle-même qui induirait une modulation de la transcription des gènes *ChGn1* et *Chst8* conduisant à une nouvelle forme de chondroïtine qui pourrait être impliquée dans la transconformation de PrPc en PrPres.

II-3.3 Rôle de la sulfatation

Notre étude nous a amenés à mettre en évidence la sous-expression du gène *Chst8* codant pour une enzyme précise dont la fonction est d'ajouter un groupement sulfate spécifiquement sur le carbone 4 d'une N-acétylgalactosamine terminale (figure n°18).

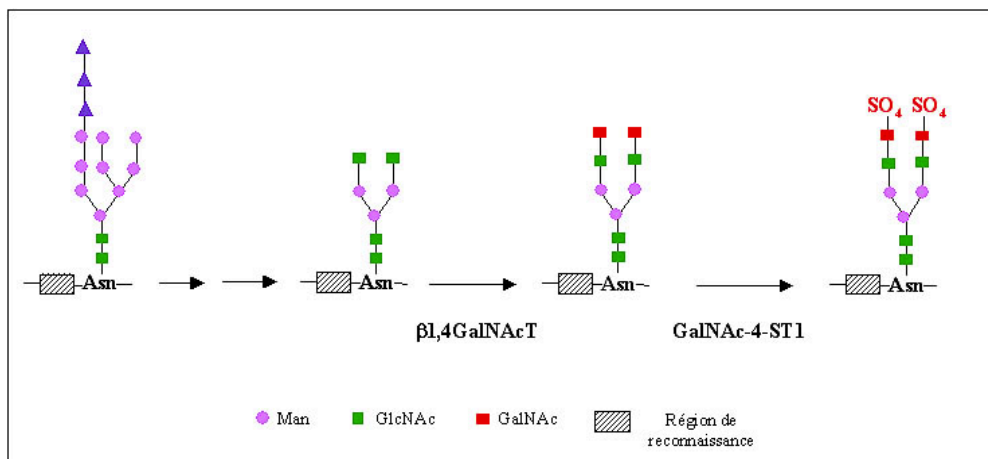


Figure n°18 : Mécanisme de transfert de groupement SO₄ par la GalNAc-4-ST1.

Ces résultats semblent indiquer une modification d'un mécanisme de sulfatation précis qui pourrait ainsi conduire à une dérégulation de la quantité des charges négatives dans les cellules où s'accumule la PrPres. L'altération génique est spécifique puisque, sur les 20 autres gènes codant pour des sulfotransférases présents sur la puce, seul *Chst8* présente une telle dérégulation, et l'expression de *Chst9* qui code pour la GalNAc-4-ST2 n'a pas été retrouvée perturbée [265]. GalNAc-4-ST2 a la même fonction que GalNAc-4-ST1 mais semble ne pas avoir la même distribution dans les organes et a la capacité d'ajouter un groupement sulfate à la fois sur les GalNAc terminaux et centraux. Ces résultats, d'une part, rejoignent les conclusions émises par Nielsen indiquant une modulation sélective des mécanismes de la glycosylation par la PrPres [258] et d'autre part, semblent montrer que cette sélection s'établit au niveau des gènes eux-mêmes et de leur niveau de transcription.

La sulfatation est une modification post-traductionnelle très complexe et d'une importance capitale à différents niveaux. Elle est associée aux caractéristiques structurales des carbohydrates, pré-requis déterminant pour reconnaître des récepteurs spécifiques. Dès lors, les oligosaccharides sulfatés jouent des rôles divers dans le développement, la différenciation et l'homéostasie. Par exemple, les HS et leur niveau de sulfatation jouent un rôle important dans la liaison de facteurs de croissance (FGF) à leurs récepteurs [303] et dans l'adhésion de l'herpès simplex virus 1 à la surface cellulaire [331]. Le rôle prépondérant de la sulfatation des HS a été très bien montré par l'abolition de la sulfatation des héparanes conduisant à la mort néonatale de la souris [56] et à un développement anormal chez la drosophile [212]. L'importance de la reconnaissance ligand/récepteur par les niveaux de sulfatation est particulièrement intéressante dans la mesure où le transfert spécifique de résidus GalNAc-4-SO₄ est prépondérant dans la reconnaissance d'hormones lutéinisantes par leur récepteur. Il semblerait intéressant de déterminer l'implication des modulations de l'expression de *Chst8* dans ces phénomènes afin de savoir si une dérégulation de la sulfatation des résidus GalNAc pourrait être impliquée dans la modulation du système neuroendocrinien dans les maladies à prions. Par ailleurs, les résultats préliminaires in vivo montrant une localisation précise et sur un nombre limité de cellules de l'expression de la GalNAc-4-ST1 dans l'hypothalamus latéral, pourrait indiquer l'existence de sous-populations cellulaires qu'il nous appartient de caractériser pour déterminer leur fonction.

Le PAPS (3'-phosphoadénosine5'-phosphosulfate), substrat donneur de sulfates pour les sulfotransférases, et le transporteur au sulfate ont également des rôles notables. La sulfatation des oligosaccharides est réalisée dans la lumière du Golgi par le transfert d'un groupe sulfate à partir d'un PAPS à une position spécifique d'un précurseur oligosaccharidique et est catalysé par des sulfotransférases. La déficience en enzymes impliquées dans le transport de sulfate et dans la voie de synthèse de PAPS sont à l'origine de certaines maladies héréditaires telles que les ostéochondrodysplasies [146] ce qui implique un rôle essentiel de la sulfatation des protéoglycannes dans le développement normal du cartilage et des os.

Notons l'existence de plusieurs familles de gènes de sulfotransférases. Leur expression peut être différente suivant leur distribution dans les tissus, probablement en raison de régions 5' non codantes différentes et de promoteurs différents utilisés. En effet, plusieurs transcrits ont été observés pour de nombreuses sulfotransférases et glycosyltransférases, cela reflétant généralement une utilisation alternative de promoteurs multiples [155]. Des études sur les mécanismes de l'expression des gènes de sulfotransférases incluant l'analyse des régions promotrices ont donné des informations importantes pour comprendre comment un oligosaccharide sulfaté est exprimé dans un type cellulaire donné. Des patients avec une

dystrophie maculaire cornéenne (MCD) type II, sont connus pour avoir des mutations dans la région promotrice du gène codant la GlcNAc6ST spécifique de la cornée, abolissant son expression dans les cellules cornéennes mais pas dans d'autres tissus [5]. Ces mutations résultent dans l'absence de kératane sulfaté dans la cornée, alors qu'on en détecte dans le sérum. L'étude que nous avons menée sur *Chst8* nous a conduits à examiner si l'existence de plusieurs transcrits de ce gène dans les cellules GT1 et ScGT1 accompagnait sa sous-expression dans les ScGT1. Les résultats préliminaires obtenus sur cette lignée cellulaire ont indiqué l'existence d'un seul transcrit. Bien que cette étude nous semblait trop exhaustive pour pouvoir émettre une conclusion, les travaux réalisés sur les cellules Mov ont confirmé nos résultats (communication personnelle de l'équipe de Limoges). L'expression ciblée de la GalNac-4-ST1 correspondante dans les cerveaux de souris semble bien montrer une expression de cette enzyme dans des régions spécifiques du cerveau. Il serait donc intéressant d'analyser plus en profondeur la constitution du promoteur de ce gène afin de déterminer l'existence de régions pouvant lier plus ou moins certains facteurs de transcription pouvant réguler l'expression de ce gène. La sous-expression de *Chst8* consécutive à la présence de PrPres et la réversion de cette sous-expression par des molécules qui inhibent l'accumulation de PrPres, semblent indiquer un rôle direct de la PrPres sur la transcription de ce gène. Cette hypothèse est en effet possible puisque la PrPc et la PrPSc ont été décrites dans le noyau [23, 285]. Plus précisément, la PrPc a été retrouvée dans le noyau associée à la lectine CBP70 [316] et des formes mutées de la PrP retrouvées dans les maladies de GSS et IFF ont également montré cette localisation [140]. Il semblerait particulièrement intéressant de déterminer l'existence dans le promoteur de ce gène des régions pouvant lier la PrP, des partenaires de la PrP ou bien encore des sites de liaison à des facteurs de transcription régulés par des glycanes particuliers. En effet, certains facteurs de transcription peuvent être régulés et notamment transloqués dans le noyau suivant le niveau de O-glycosylation et de phosphorylation [197, 364]. L'effet d'héparanes mimétiques sur la transcription de ce gène est spectaculaire puisqu'on revient à une expression normale du gène *Chst8* après deux traitements. Comme il a été discuté dans la première partie, les HM sont suspectés d'agir par compétition avec les HS endogènes en inhibant la liaison et la conversion PrPc/PrPres à la surface cellulaire. Notre étude semble ajouter une information supplémentaire. Des mimétiques d'oligosaccharides sont aussi capables d'avoir un effet sur la transcription d'un gène. Nous pouvons supposer, compte tenu des résultats montrant qu'après un seul traitement avec des HM ne permet pas une réversion totale de la sous-expression de *Chst8*, que les HM mettent plus de temps à exercer leur effet au niveau transcriptionnel en raison de la nécessité d'une translocation primaire dans le noyau tandis que leur effet sur l'accumulation de PrPres

est plus rapide s'il est réalisé à la membrane cellulaire.

**CONCLUSIONS
ET PERSPECTIVES**

L'objet de ce travail qui a fait l'objet d'une collaboration entre le laboratoire de Génétique Moléculaire Animale de la Faculté des Sciences de Limoges et le Groupe D'Innovation Diagnostique et Thérapeutique des Infections à Prions du CEA de Fontenay-aux-Roses, nous a conduits à examiner les maladies à prions sous deux angles différents. D'une part, la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques nous a amenés à la conclusion que les mimétiques d'héparanes semblent les composés les plus prometteurs dans ce domaine. Ce travail qui a nécessité un criblage important de molécules, nous a par ailleurs confirmé la nécessité de mieux déterminer et préciser les cibles cellulaires que l'on cherchait à atteindre et que le développement d'une thérapie dans ces pathologies est dépendant de nombreux facteurs tels que la souche de prion inoculée, son tropisme, la période de la maladie à laquelle on administre le produit et la communication intercellulaire. D'autre part, le second volet de notre étude nous a permis de constater que des modifications spécifiques des mécanismes de la glycosylation survenaient en présence de PrPres et que, en conséquence, non seulement la PrPres semblait altérer de façon sélective certains mécanismes de la glycosylation, mais qu'en plus, cette modulation s'établissait au niveau de la transcription de gènes précis. Cette deuxième partie de notre travail est d'autant plus intéressante qu'elle nous a permis de confirmer le rôle prépondérant des GAGs dans ces maladies. Par ailleurs, la conclusion que nous avons émise quant au potentiel plus élevé des HM en terme thérapeutique comparativement aux autres classes de molécules semble corroborée par les résultats obtenus au niveau transcriptionnel, montrant ainsi un lien plus évident entre l'effet des HM sur la conversion de la PrPc en PrPres et les dérégulations transcriptionnelles obtenues au niveau des mécanismes de la glycosylation. Les nouvelles cibles que nous avons identifiées, et plus précisément, *Chst8* et la GalNAc-4-O-sulfatation et *ChGn1* et les chondroïtines sulfates, permettent d'une part d'ouvrir une nouvelle voie d'investigation pour mieux appréhender les mécanismes sous-tendant la conversion, l'accumulation et la propagation de l'agent infectieux et d'autre part, d'envisager de nouvelles voies de recherche dans le traitement des maladies à prions. En effet, puisqu'il semble qu'une modulation de la sulfatation, donc des charges négatives, pourrait être impliquée dans les processus de transconformation de la PrPc en PrPres, corrélée à une modification de l'équilibre HS/CS, glycosaminoglycannes pouvant jouer un rôle dans l'adhésion et la communication intercellulaires, il semblerait intéressant de se focaliser plus précisément sur les dérégulations de la sulfatation. L'analyse plus approfondie de la GalNAc-4-O-sulfatation et le rôle de charges négatives précises dans ces processus semblent d'autant plus importants que plusieurs études tendent à montrer un rôle prépondérant des résidus GalNAc-4-SO₄ dans les mécanismes de reconnaissance ligand/récepteur. On peut dès lors supposer que l'effet des HM est essentiellement dû à la

proportion et la nature de groupements sulfates qui pourraient agir, directement en inhibant la liaison PrPc/PrPres, en agissant au niveau nucléaire ou bien encore au niveau extracellulaire par leur interaction avec la matrice extracellulaire conférant ainsi aux HM des fonctions aussi diverses que prépondérantes dans le traitement de ces maladies. L'effet plus modéré de la quinacrine et des porphyrines semble dès lors confirmer notre hypothèse. Ces molécules pourraient agir à des étapes secondaires des processus de conversion de PrPc en PrPres. Si l'on démontrait clairement que la quinacrine agit préférentiellement au niveau des lysosomes, organites d'accumulation de la PrPres et que les métalloporphyrines testées jouent un rôle dans l'activité SOD ou HO-1, donc une fois que les mécanismes de stress cellulaire se sont installés, on pourrait alors montrer que ces molécules n'exercent leur effet que trop tardivement dans le processus de pathogénèse, ce qui pourrait expliquer leur efficacité jusqu'ici limitée. Une thérapie appliquée une fois que l'agent s'est propagé dans l'organisme s'est révélée inefficace pour la plupart des essais, ce qui représente un obstacle considérable dans le traitement des patients en cours d'incubation ou en stade de neurovasion. Il semblerait donc intéressant de tester si une thérapie regroupant plusieurs classes de molécules agissant à des niveaux différents, incluant évidemment des composés apportant des groupements sulfatés précis, améliorerait l'état des patients et diminuerait la propagation de l'agent infectieux et les dérégulations transcriptionnelles constatées. Par ailleurs, compte tenu des résultats montrant une dérégulation de *Chst8* à la fois dans les ScGT1 et dans les ScMov et de la présence extra-golgienne potentielle de l'enzyme correspondante indiquant une activité possible de cette enzyme sur la sulfatation des chondroïtines, il semblerait particulièrement intéressant de cibler nos perspectives de recherche sur cette enzyme et/ou sur le gène *Chst8*. Par ailleurs, il semble prépondérant de vérifier l'existence d'une forme soluble extra-golgienne de la GalNAc-4-ST1 et son activité vis-à-vis des chondroïtines. Enfin, une analyse précise de la composition des chondroïtines (longueur des chaînes oligosaccharidiques et niveau de sulfatation) dans les ScGT1 représenterait un autre moyen de valider notre hypothèse. Ainsi, ce travail qui s'inscrivait dans l'étude des maladies à prions à deux niveaux très différents, a conduit à la mise en évidence de nouveaux axes de recherche, convergeant vers l'idée d'un rôle prépondérant de la sulfatation, et par voie de conséquence de groupements sulfatés précis, et des mécanismes conduisant à une modification post-traductionnelle des processus de conversion conformationnelle de la PrPc en PrPres.

REFERENCES

1. Adjou KT, Demaimay R, Lasmezas C, Deslys JP, Seman M, Dormont D (1995) MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2810-2
2. Adjou KT, Simoneau S, Sales N, Lamoury F, Dormont D, Papy-Garcia D, Barritault D, Deslys JP, Lasmezas CI (2003) A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* 84: 2595-603
3. Aguzzi A, Brandner S, Fischer MB, Furukawa H, Glatzel M, Hawkins C, Heppner FL, Montrasio F, Navarro B, Parizek P, Pekarik V, Prinz M, Raeber AJ, Rockl C, Klein MA (2001) Spongiform encephalopathies: insights from transgenic models. *Adv Virus Res* 56: 313-52
4. Aguzzi A, Polymenidou M (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116: 313-27
5. Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, Dota A, Kawasaki S, Inoue Y, Maeda N, Yamamoto S, Fujiwara T, Thonar EJ, Shimomura Y, Kinoshita S, Tanigami A, Fukuda MN (2000) Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat Genet* 26: 237-41
6. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214: 764-6
7. Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 199-225
8. Arch I, Med (1946) Plasma quinacrine concentration as a function of dosage and environment *Armored Medical Research Laboratory and Commission on tropical Diseases*, vol 78, pp 64-107
9. Archer F, Bachelin C, Andreoletti O, Besnard N, Perrot G, Langevin C, Le Dur A, Vilette D, Baron-Van Evercooren A, Vilotte JL, Laude H (2004) Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol* 78: 482-90
10. Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol* 176: 403-11
11. Asakura S (1968) A kinetic study of in vitro polymerization of flagellin. *J Mol Biol* 35: 237-9
12. Aucouturier P, Geissmann F, Damotte D, Saborio GP, Meeker HC, Kascsak R, Carp RI, Wisniewski T (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest* 108: 703-8

13. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267: 18148-53
14. Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B (2002) Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *Embo J* 21: 1031-40
15. Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA (2002) Retrograde transport of transmissible mink encephalopathy within descending motor tracts. *J Virol* 76: 5759-68
16. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-28
17. Bate C, Rutherford S, Gravenor M, Reid S, Williams A (2002) Cyclo-oxygenase inhibitors protect against prion-induced neurotoxicity in vitro. *Neuroreport* 13: 1933-8
18. Bate C, Langeveld J, Williams A (2004) Manipulation of PrP(res) production in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J Neurosci Methods* 138: 217-23
19. Bate C, Reid S, Williams A (2004) Phospholipase A2 inhibitors or platelet activating factor antagonists prevent prion replication. *J Biol Chem*
20. Bate C, Salmona M, Diomedea L, Williams A (2004) Squalestatin cures prion-infected neurons and protects against prion neurotoxicity. *J Biol Chem* 279: 14983-90
21. Batinic-Haberle I, Benov L, Spasojevic I, Fridovich I (1998) The ortho effect makes manganese(III) meso-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic. *J Biol Chem* 273: 24521-8
22. Baybutt H, Manson J (1997) Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene* 184: 125-31
23. Bazan JF, Fletterick RJ, McKinley MP, Prusiner SB (1987) Predicted secondary structure and membrane topology of the scrapie prion protein. *Protein Eng* 1: 125-35
24. Beekes M, Baldauf E, Diringer H (1996) Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77 (Pt 8): 1925-34
25. Beekes M, McBride PA, Baldauf E (1998) Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* 79 (Pt 3): 601-7
26. Beekes M, McBride PA (2000) Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 278: 181-4
27. Bellinger-Kawahara C, Cleaver JE, Diener TO, Prusiner SB (1987) Purified scrapie

- prions resist inactivation by UV irradiation. *J Virol* 61: 159-66
28. Ben-Zaken O, Tzaban S, Tal Y, Horonchik L, Esko JD, Vlodayvsky I, Taraboulos A (2003) Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. *J Biol Chem* 278: 40041-9
 29. Benito-Leon J (2004) Combined quinacrine and chlorpromazine therapy in fatal familial insomnia. *Clin Neuropharmacol* 27: 201-3
 30. Beranger F, Mange A, Goud B, Lehmann S (2002) Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem* 277: 38972-7
 31. Beringue V, Lasmezas CI, Adjou KT, Demaimay R, Lamoury F, Deslys JP, Seman M, Dormont D (1999) Inhibiting scrapie neuroinvasion by polyene antibiotic treatment of SCID mice. *J Gen Virol* 80 (Pt 7): 1873-7
 32. Beringue V, Adjou KT, Lamoury F, Maignien T, Deslys JP, Race R, Dormont D (2000) Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol* 74: 5432-40
 33. Beringue V, Lamoury F, Adjou KT, Maignien T, Demoy M, Couvreur P, Dormont D (2000) Pharmacological manipulation of early PrPres accumulation in the spleen of scrapie-infected mice. *Arch Virol Suppl*: 39-56
 34. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68: 729-77
 35. Blanquaert F, Saffar JL, Colombier ML, Carpentier G, Barritault D, Caruelle JP (1995) Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone* 17: 499-506
 36. Blattler T, Brandner S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtlander T, Weissmann C, Aguzzi A (1997) PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389: 69-73
 37. Bosques CJ, Imperiali B (2003) The interplay of glycosylation and disulfide formation influences fibrillization in a prion protein fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7593-8
 38. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 276: 39145-9
 39. Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blattler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13148-51

40. Brown DR, Herms JW, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997) PrP and beta-amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *Eur J Neurosci* 9: 1162-9
41. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146: 104-12
42. Brown DR, Besinger A (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 334 (Pt 2): 423-9
43. Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344 Pt 1: 1-5
44. Brown DR (2001) Microglia and prion disease. *Microsc Res Tech* 54: 71-80
45. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A, Fraser H, Morrison WI, Bruce ME (1999) Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* 5: 1308-12
46. Brown P, Rohwer RG, Gajdusek DC (1986) Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J Infect Dis* 153: 1145-8
47. Brown P, Liberski PP, Wolff A, Gajdusek DC (1990) Conservation of infectivity in purified fibrillary extracts of scrapie-infected hamster brain after sequential enzymatic digestion or polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7240-4
48. Brown P, Liberski PP, Wolff A, Gajdusek DC (1990) Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *J Infect Dis* 161: 467-72
49. Brown P, Wolff A, Gajdusek DC (1990) A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 40: 887-90
50. Brown P, Rau EH, Johnson BK, Bacote AE, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC (2000) New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3418-21
51. Brown P (2004) CWD, iatrogenic CJD: an overview. In: First international conference of the european network of excellence Neuroprion, Paris
52. Bruce ME, Fraser H (1991) Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 125-38
53. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to

- mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501
54. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-82
 55. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-47
 56. Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, Wilson VA (1998) Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 12: 1894-906
 57. Cabral AL, Lee KS, Martins VR (2002) Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J Biol Chem* 277: 5675-82
 58. Capellari S, Zaidi SI, Urig CB, Perry G, Smith MA, Petersen RB (1999) Prion protein glycosylation is sensitive to redox change. *J Biol Chem* 274: 34846-50
 59. Capellari S, Zaidi SI, Long AC, Kwon EE, Petersen RB (2000) The Thr183Ala Mutation, Not the Loss of the First Glycosylation Site, Alters the Physical Properties of the Prion Protein. *J Alzheimers Dis* 2: 27-35
 60. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*
 61. Cashore WJ (1990) The neurotoxicity of bilirubin. *Clin Perinatol* 17: 437-47
 62. Caspi S, Halimi M, Yanai A, Sasson SB, Taraboulos A, Gabizon R (1998) The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem* 273: 3484-9
 63. Caughey B, Raymond GJ (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 67: 643-50
 64. Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA (1998) Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* 273: 32230-5
 65. Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30: 7672-80
 66. Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B (1998) Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12117-22
 67. Chabry J, Caughey B, Chesebro B (1998) Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* 273: 13203-7

68. Chen PY, Lin CC, Chang YT, Lin SC, Chan SI (2002) One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12633-8
69. Cheng AM, Saxton TM, Sakai R, Kulkarni S, Mbamalu G, Vogel W, Tortorice CG, Cardiff RD, Cross JC, Muller WJ, Pawson T (1998) Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95: 793-803
70. Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtsov SG, Liebman SW (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* 268: 880-4
71. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315: 331-3
72. Chesebro B (1998) BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science* 279: 42-3
73. Cheung WF, Eriksson I, Kusche-Gullberg M, Lindhal U, Kjellen L (1996) Expression of the mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/ N-sulfotransferase in human kidney 293 cells results in increased N-sulfation of heparan sulfate. *Biochemistry* 35: 5250-6
74. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J* 21: 3317-26
75. Cho HJ (1976) Is the scrapie agent a virus? *Nature* 262: 411-2
76. Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB (1994) Structural clues to prion replication. *Science* 264: 530-1
77. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-7
78. Collinge J, Rossor M (1996) A new variant of prion disease. *Lancet* 347: 916-7
79. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-90
80. Collins S, Law MG, Fletcher A, Boyd A, Kaldor J, Masters CL (1999) Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Lancet* 353: 693-7
81. Collins SJ, Lewis V, Brazier M, Hill AF, Fletcher A, Masters CL (2002) Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* 52: 503-6
82. Collins SJ, Lawson VA, Masters CL (2004) Transmissible spongiform

- encephalopathies. *Lancet* 363: 51-61
83. Cuille JC, PL (1936) Pathologie Animale. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sc, Paris*
 84. Cyster JG (2003) Lymphoid organ development and cell migration. *Immunol Rev* 195: 5-14
 85. Dealler S (2003) Variant CJD case treated by intraventricular PPS: Symptomatic improvements over the following 6 months. In: *Prion diseases: from basic research to intervention concepts*, Munich, pp 288
 86. DeArmond SJ, Qiu Y, Sanchez H, Spilman PR, Ninchak-Casey A, Alonso D, Daggett V (1999) PrPc glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1000-9
 87. Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425: 717-20
 88. Demaimay R, Adjou K, Lasmezas C, Lazarini F, Cherifi K, Seman M, Deslys JP, Dormont D (1994) Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie. *J Gen Virol* 75 (Pt 9): 2499-503
 89. Demaimay R, Adjou KT, Beringue V, Demart S, Lasmezas CI, Deslys JP, Seman M, Dormont D (1997) Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol* 71: 9685-9
 90. Deslys JP, Picot A (2001) *La vache folle, les risques pour l'homme*. Flammarion
 91. Dickinson AG, Taylor DM (1978) Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med* 299: 1413-4
 92. Dickinson AG, Outram G (1979) The scrapie replication-site hypothesis and its implications in the nervous system. In: Prusiner SB and Hadlow WJ (eds) *Slow Transmissible Diseases of the Nervous system : pathogenesis, immunology, Virology and Molecular Biology of the Spongiforme encephalopathies*. Academic Press, New-York, vol 2, pp 13-31
 93. Dickinson AG, Outram G, Taylor DM, Foster JD (1989) Further evidence that scrapie agent has an independent genome, Court edn. CEA Diffusion, Fontenay-aux-Roses, France
 94. Diringier (1991) *SAF and hypothesis of agent structure*, R. Bradley, M., S.a.B.M.e edn. Kluwer Academic, Dordrecht, NL
 95. Diringier H, Ehlers B (1991) Chemoprophylaxis of scrapie in mice. *J Gen Virol* 72 (Pt 2): 457-60
 96. Diringier H, Beekes M, Ozel M, Simon D, Queck I, Cardone F, Pocchiari M, Ironside

- JW (1997) Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* 40: 238-46
97. Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 74: 4894-7
 98. Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T (2004) Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78: 4999-5006
 99. Dolphin D (1978) *The porphyrins*. Academic Press, New-York
 100. Dormont D, Delpech B, Delpech A, Courcel MN, Viret J, Markovits P, Court L (1981) [Hyperproduction of glial fibrillary acidic protein (GFA) during development of experimental scrapie in mice]. *C R Seances Acad Sci III* 293: 53-6
 101. Dupre T, Lavieu G, Moore S, Seta N (2004) [Inherited disorders of protein glycosylation]. *Med Sci (Paris)* 20: 331-8
 102. Ehlers B, Diringier H (1984) Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol* 65 (Pt 8): 1325-30
 103. Enari M, Flechsig E, Weissmann C (2001) Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9295-9
 104. Ermonval M, Mouillet-Richard S, Codogno P, Kellermann O, Botti J (2003) Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie* 85: 33-45
 105. Ernst DR, Race RE (1993) Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* 41: 193-201
 106. Ewing JF, Maines MD (1993) Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein in rat brain. *J Neurochem* 60: 1512-9
 107. Farquhar C, Dickinson A, Bruce M (1999) Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 353: 117
 108. Farquhar C (2003) Pentosan polysulfate has prophylactic potential for transmissible spongiform encephalopathies. In: *Prion diseases: from basis research to intervention concepts*, Munich, pp 296
 109. Farquhar CF, Dickinson AG (1986) Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol* 67 (Pt 3): 463-73
 110. Farrelly PV, Kenna BL, Laohachai KL, Bahadi R, Salmona M, Forloni G, Kourie JI

- (2003) Quinacrine blocks PrP (106-126)-formed channels. *J Neurosci Res* 74: 934-41
111. Favereaux A, Quadrio I, Vital C, Perret-Liaudet A, Anne O, Laplanche JL, Petry KG, Vital A (2004) Pathologic prion protein spreading in the peripheral nervous system of a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 61: 747-50
112. Fichet G, Comoy E, Duval C, Antloga K, Dehen C, Charbonnier A, McDonnell G, Brown P, Lasmezas CI, Deslys JP (2004) Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 364: 521-6
113. Fitch MT, Silver J (1997) Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp Neurol* 148: 587-603
114. Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, Podevin-Dimster V, Lehmann S, Chauvin JP, Decavel JP, Varea R, Grassi J, Fontes M, Cesbron JY (2002) PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *J Virol* 76: 2434-9
115. Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-6
116. Forloni G (1996) Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides. *Curr Opin Neurol* 9: 492-500
117. Forloni G, Iussich S, Awan T, Colombo L, Angeretti N, Girola L, Bertani I, Poli G, Caramelli M, Grazia Bruzzone M, Farina L, Limido L, Rossi G, Giaccone G, Ironside JW, Bugiani O, Salmona M, Tagliavini F (2002) Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10849-54
118. Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V (2000) Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech* 50: 76-88
119. Fraser H, Dickinson AG (1985) Targeting of scrapie lesions and spread of agent via the retino-tectal projection. *Brain Res* 346: 32-41
120. Freeze HH (1998) Disorders in protein glycosylation and potential therapy: tip of an iceberg? *J Pediatr* 133: 593-600
121. Gabizon R, Meiner Z, Halimi M, Ben-Sasson SA (1993) Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol* 157: 319-25
122. Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB (1992) Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9097-101
123. Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197: 943-60

124. Gauczynski S, Hundt C, Leucht C, Weiss S (2001) Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Adv Protein Chem* 57: 229-72
125. Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* 20: 5863-75
126. Gianni L, Bellotti V, Gianni AM, Merlini G (1995) New drug therapy of amyloidoses: resorption of AL-type deposits with 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Blood* 86: 855-61
127. Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Latarjet R (1978) Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 6268-70
128. Giese A, Levin J, Bertsch U, Kretzschmar H (2004) Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1240-6
129. Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Lucassen R, Spielhauer C, Muranyi W, Riesner D, Tatzelt J, Schatzl HM (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *Embo J* 20: 3957-66
130. Glatzel M, Aguzzi A (2000) PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* 81: 2813-21
131. Glatzel M (2001) Sympathetic prions. *ScientificWorldJournal* 1: 555-6
132. Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 349: 1812-20
133. Goldmann W, O'Neill G, Cheung F, Charleson F, Ford P, Hunter N (1999) PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J Gen Virol* 80 (Pt 8): 2275-83
134. Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23: 39-71
135. Gorodinsky A, Harris DA (1995) Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J Cell Biol* 129: 619-27
136. Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8342-7
137. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 85-92

138. Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 258: 1903-10
139. Griffith JS (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* 215: 1043-4
140. Gu Y, Hinnerwisch J, Fredricks R, Kalepu S, Mishra RS, Singh N (2003) Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis* 12: 133-49
141. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, et al. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274: 1-13
142. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J* 6: 861-70
143. Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R (1993) Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32: 1009-16
144. Harris DA (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* 66: 71-85
145. Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-9
146. Hastbacka J, de la Chapelle A, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M, Hamilton BA, Kusumi K, Trivedi B, Weaver A, et al. (1994) The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 78: 1073-87
147. Hauw JJ, Seilhean D, Colle MA, Hogenhuys J, Duyckaerts C (1998) [Neuropathologic markers in degenerative dementias]. *Rev Neurol (Paris)* 154 Suppl 2: S50-64
148. Hauw JJ, Sazdovitch V, Laplanche JL, Peoc'h K, Kopp N, Kemeny J, Privat N, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Deslys JP, Dormont D, Alperovitch A (2000) Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology* 54: 1641-6
149. Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-34
150. Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP, Aguzzi A (2001) Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* 7: 976-7
151. Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A (2001) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic

- expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 294: 178-82
152. Hill AF, Antoniou M, Collinge J (1999) Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* 80 (Pt 1): 11-4
 153. Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10248-53
 154. Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, Ironside JW, Collinge J (2003) Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 126: 1333-46
 155. Hirahara Y, Tsuda M, Wada Y, Honke K (2000) cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. *Eur J Biochem* 267: 1909-17
 156. Holscher C, Delius H, Burkle A (1998) Overexpression of nonconvertible PrP^c delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol* 72: 1153-9
 157. Horiuchi M, Caughey B (1999) Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure Fold Des* 7: R231-40
 158. Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* 83: 267-71
 159. Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE (1996) Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des* 1: 13-9
 160. Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J* 20: 5876-86
 161. Hunter CL, Lloyd E, Eltis LD, Rafferty SP, Lee H, Smith M, Mauk AG (1997) Role of the heme propionates in the interaction of heme with apomyoglobin and apocytochrome b5. *Biochemistry* 36: 1010-7
 162. Hutter G, Heppner FL, Aguzzi A (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem* 384: 1279-85
 163. Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL (1993) Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today* 14: 500-5
 164. Ihrcke NS, Platt JL (1996) Shedding of heparan sulfate proteoglycan by stimulated endothelial cells: evidence for proteolysis of cell-surface molecules. *J Cell Physiol* 168: 625-37
 165. Illanes J, Dabancens A, Acuna O, Fuenzalida M, Guerrero A, Lopez C, Lemus D

- (2002) Effects of betamethasone, sulindac and quinacrine drugs on the inflammatory neoangiogenesis response induced by polyurethane sponge implanted in mouse. *Biol Res* 35: 339-45
166. Imperiali B, Rickert KW (1995) Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 97-101
167. Ingrosso L, Ladogana A, Pocchiari M (1995) Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J Virol* 69: 506-8
168. Inoue S, Tanaka M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M (1997) Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J Vet Med Sci* 59: 175-83
169. Ivanova L, Barmada S, Kummer T, Harris DA (2001) Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276: 42409-21
170. James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB, Cohen FE (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10086-91
171. Jansen K, Schafer O, Birkmann E, Post K, Serban H, Prusiner SB, Riesner D (2001) Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem* 382: 683-91
172. Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73: 1055-8
173. Jeffrey M, McGovern G, Goodsir CM, Brown KL, Bruce ME (2000) Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol* 191: 323-32
174. Kachadourian R, Flaherty MM, Crumbliss AL, Patel M, Day BJ (2003) Synthesis and in vitro antioxidant properties of manganese(III) beta-octabromo-meso-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin. *J Inorg Biochem* 95: 240-8
175. Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB (1997) COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2333-8
176. Kaneko K, Wille H, Mehlhorn I, Zhang H, Ball H, Cohen FE, Baldwin MA, Prusiner SB (1997) Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. *J Mol Biol* 270: 574-86
177. Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the

- cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10069-74
178. Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H (1985) Biochemical differences among scrapie-associated fibrils support the biological diversity of scrapie agents. *J Gen Virol* 66 (Pt 8): 1715-22
 179. Kellings K, Prusiner SB, Riesner D (1994) Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343: 425-30
 180. Kimberlin RH, Walker CA, Millson GC, Taylor DM, Robertson PA, Tomlinson AH, Dickinson AG (1983) Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci* 59: 355-69
 181. Kimberlin RH, Walker CA (1986) Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 409-13
 182. Kimpara T, Takeda A, Yamaguchi T, Arai H, Okita N, Takase S, Sasaki H, Itoyama Y (2000) Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 551-4
 183. Kisilevsky R (1990) Heparan sulfate proteoglycans in amyloidogenesis: an epiphenomenon, a unique factor, or the tip of a more fundamental process? *Lab Invest* 63: 589-91
 184. Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 65: 6292-5
 185. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A (1997) A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390: 687-90
 186. Klitzman R (1999) Sorcery and science: responses to kuru and other epidemics. *West J Med* 171: 204-6
 187. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-4
 188. Korth C, Kaneko K, Prusiner SB (2000) Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(Sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J Gen Virol* 81: 2555-63
 189. Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:

190. Kourie JI, Shorthouse AA (2000) Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C1063-87
191. Kourie JI (2001) Mechanisms of prion-induced modifications in membrane transport properties: implications for signal transduction and neurotoxicity. *Chem Biol Interact* 138: 1-26
192. Kretzschmar HA, Tings T, Madlung A, Giese A, Herms J (2000) Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl*: 239-49
193. Kunzi V, Glatzel M, Nakano MY, Greber UF, Van Leuven F, Aguzzi A (2002) Unhampered prion neuroinvasion despite impaired fast axonal transport in transgenic mice overexpressing four-repeat tau. *J Neurosci* 22: 7471-7
194. Kurschner C, Morgan JI (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* 30: 165-8
195. Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400: 225-6
196. Ladogana A, Casaccia P, Ingrosso L, Cibati M, Salvatore M, Xi YG, Masullo C, Pocchiari M (1992) Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* 73 (Pt 3): 661-5
197. Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC (2003) Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J Am Chem Soc* 125: 6612-3
198. Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ (1996) BSE transmission to macaques. *Nature* 381: 743-4
199. Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275: 402-5
200. Latarjet R, Muel B, Haig DA, Clarke MC, Alper T (1970) Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* 227: 1341-3
201. Latarjet R. (1979) Inactivation of the agents of scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, and kuru by radiations, Academic Press edn, New-York
202. Laurent M (1997) Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases. *FEBS Lett* 407: 1-6
203. Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal

- deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 79: 79-87
204. Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR (2003) Towards cellular receptors for prions. *Rev Med Virol* 13: 399-408
 205. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305: 673-6
 206. Lehmann S, Harris DA (1997) Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J Biol Chem* 272: 21479-87
 207. Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, Lasmezas CI, Weiss S (2003) The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* 4: 290-5
 208. Liao YC, Lebo RV, Clawson GA, Smuckler EA (1986) Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 233: 364-7
 209. Lie SO, Schofield B (1973) Inactivation of lysosomal function in normal cultured human fibroblasts by chloroquine. *Biochem Pharmacol* 22: 3109-14
 210. Liesi P, Narvanen A, Soos J, Sariola H, Snounou G (1989) Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. *FEBS Lett* 244: 141-8
 211. Lin H, Bhatia R, Lal R (2001) Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *Faseb J* 15: 2433-44
 212. Lin X, Buff EM, Perrimon N, Michelson AM (1999) Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126: 3715-23
 213. Liu T, Li R, Pan T, Liu D, Petersen RB, Wong BS, Gambetti P, Sy MS (2002) Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 47671-8
 214. Loftus B, Rogers M (1997) Characterization of a prion protein (PrP) gene from rabbit; a species with apparent resistance to infection by prions. *Gene* 184: 215-9
 215. Luhr KM, Wallin RP, Ljunggren HG, Low P, Taraboulos A, Kristensson K (2002) Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c(+) myeloid dendritic cells in vitro. *J Virol* 76: 12259-64
 216. Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P (2002) Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6979-84
 217. Ma J, Lindquist S (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease

- are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14955-60
218. Ma J, Lindquist S (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science* 298: 1785-8
 219. Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME (2000) Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* 6: 719-20
 220. Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, Walport MJ, Pepys MB (2001) Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* 7: 485-7
 221. Madore N, Smith KL, Graham CH, Jen A, Brady K, Hall S, Morris R (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *Embo J* 18: 6917-26
 222. Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 33311-8
 223. Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J (2001) Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 268: 105-14
 224. Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302: 871-4
 225. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8: 121-7
 226. Manuelidis L, Sklaviadis T, Manuelidis EE (1987) Evidence suggesting that PrP is not the infectious agent in Creutzfeldt-Jakob disease. *Embo J* 6: 341-7
 227. Manuelidis L (1997) Decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease and other transmissible agents. *J Neurovirol* 3: 62-5
 228. Manuelidis L, Fritch W, Zaitsev I (1998) Dapsone to delay symptoms in Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 352: 456
 229. May BC, Fafarman AT, Hong SB, Rogers M, Deady LW, Prusiner SB, Cohen FE (2003) Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3416-21
 230. Mayer T, Zeigler M, Gabizon R (2004) Aberrant metabolism of GAGs is part of prion

- disease pathogenesis. In: First international conference of the european network of excellence Neuroprion, Paris
231. McKenzie D, Kaczkowski J, Marsh R, Aiken J (1994) Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection. *J Virol* 68: 7534-6
 232. Meddahi A, Bree F, Papy-Garcia D, Gautron J, Barritault D, Caruelle JP (2002) Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J Biomed Mater Res* 62: 525-31
 233. Melot F, Thielen C, Labiet T, Eisher S, Jolois O, Heinen E, Antoine N (2002) Do bovine lymphocytes express a peculiar prion protein? *Dev Immunol* 9: 245-52
 234. Merlini G, Ascari E, Amboldi N, Bellotti V, Arbustini E, Perfetti V, Ferrari M, Zorzoli I, Marinone MG, Garini P, et al. (1995) Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2959-63
 235. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2310-4
 236. Meyer RK, Lustig A, Oesch B, Fatzer R, Zurbriggen A, Vandevelde M (2000) A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP. *J Biol Chem* 275: 38081-7
 237. Minghetti L, Greco A, Cardone F, Puopolo M, Ladogana A, Almonti S, Cunningham C, Perry VH, Pocchiari M, Levi G (2000) Increased brain synthesis of prostaglandin E2 and F2-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 866-71
 238. Minghetti L, Cardone F, Greco A, Puopolo M, Levi G, Green AJ, Knight R, Pocchiari M (2002) Increased CSF levels of prostaglandin E(2) in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 58: 127-9
 239. Miura T, Hori-i A, Takeuchi H (1996) Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* 396: 248-52
 240. Mizuguchi S, Uyama T, Kitagawa H, Nomura KH, Dejima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Sugahara K, Nomura K (2003) Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 423: 443-8
 241. Monnet C, Marthiens V, Enslin H, Frobert Y, Sobel A, Mege RM (2003) Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell

- lines. *Eur J Neurosci* 18: 542-8
242. Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A, Weissmann C (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288: 1257-9
 243. Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW, Manson JC (1998) Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet* 18: 118-25
 244. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* 292: 797-817
 245. Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 137: 313-32
 246. Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B (1995) Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14: 509-17
 247. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-8
 248. Moya KL, Hassig R, Creminon C, Laffont I, Di Giamberardino L (2004) Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. *J Neurochem* 88: 155-60
 249. Muramoto T, DeArmond SJ, Scott M, Telling GC, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. *Nat Med* 3: 750-5
 250. Nakamura Y, Yanagawa H, Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Sato T (1999) Incidence rate of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *Int J Epidemiol* 28: 130-4
 251. Narang H (1996) Origin and implications of bovine spongiform encephalopathy. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 306-22
 252. Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272: 6324-31
 253. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME (1992) Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267-70

254. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP (1996) Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86: 345-8
255. Nguyen HH, Jayasinha V, Xia B, Hoyte K, Martin PT (2002) Overexpression of the cytotoxic T cell GalNAc transferase in skeletal muscle inhibits muscular dystrophy in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5616-21
256. Nichols BJ (2002) A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 4: 374-8
257. Nielsen CH, Fischer EM, Leslie RG (2000) The role of complement in the acquired immune response. *Immunology* 100: 4-12
258. Nielsen D, Gyllberg H, Ostlund P, Bergman T, Bedecs K (2004) Increased levels of insulin and insulin-like growth factor-1 hybrid receptors and decreased glycosylation of the insulin receptor alpha- and beta-subunits in scrapie-infected neuroblastoma N2a cells. *Biochem J* 380: 571-9
259. Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavel O, Lehmann S (2000) Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* 74: 320-5
260. Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, da Silva LS, Iughetti P, Papadopoulos M, Carrilho PM, Caramelli P, Albrecht S, Zatz M, LeBlanc A (1997) Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann Neurol* 42: 138-46
261. Nunziante M, Gilch S, Schatzl HM (2003) Prion diseases: from molecular biology to intervention strategies. *Chembiochem* 4: 1268-84
262. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-46
263. Ohashi K, Hara M, Yanagishita M, Kawai R, Tachibana S, Ogura Y (1995) Proteoglycans in haemodialysis-related amyloidosis. *Virchows Arch* 427: 49-59
264. Okado-Matsumoto A, Batinic-Haberle I, Fridovich I (2004) Complementation of SOD-deficient *Escherichia coli* by manganese porphyrin mimics of superoxide dismutase activity. *Free Radic Biol Med* 37: 401-10
265. Okuda T, Sawada T, Nakano H, Matsubara K, Matsuda Y, Fukuta M, Habuchi O (2003) Mouse N-acetylgalactosamine 4-sulfotransferases-1 and -2. Molecular cloning, expression, chromosomal mapping and detection of their activity with GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-octyl. *J Biochem (Tokyo)* 134: 111-20

266. Ong WY, Lu XR, Ong BK, Horrocks LA, Farooqui AA, Lim SK (2003) Quinacrine abolishes increases in cytoplasmic phospholipase A2 mRNA levels in the rat hippocampus after kainate-induced neuronal injury. *Exp Brain Res* 148: 521-4
267. Oosta GM, Favreau LV, Beeler DL, Rosenberg RD (1982) Purification and properties of human platelet heparitinase. *J Biol Chem* 257: 11249-55
268. Ozel M, Diringer H (1994) Small virus-like structure in fractions from scrapie hamster brain. *Lancet* 343: 894-5
269. Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F (2002) Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem* 83: 1208-14
270. Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352: 340-2
271. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10962-6
272. Pan T, Colucci M, Wong BS, Li R, Liu T, Petersen RB, Chen S, Gambetti P, Sy MS (2001) Novel differences between two human prion strains revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 276: 37284-8
273. Pan T, Li R, Wong BS, Liu T, Gambetti P, Sy MS (2002) Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms. *J Neurochem* 81: 1092-101
274. Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS (2002) Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J* 368: 81-90
275. Papakonstantinou E, Karakioulakis G, Roth M, Verghese-Nikolakaki S, Dawson M, Papadopoulos O, Sklaviadis T (1999) Glycosaminoglycan analysis in brain stems from animals infected with the bovine spongiform encephalopathy agent. *Arch Biochem Biophys* 370: 250-7
276. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, et al. (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316: 452-7
277. Patel M, Day BJ (1999) Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* 20: 359-64
278. Pattison IH, Jones KM (1967) The possible nature of the transmissible agent of

- scrapie. *Vet Rec* 80: 2-9
279. Pauly PC, Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 273: 33107-10
 280. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412: 739-43
 281. Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JR, Passeroti CC, Amado D, Matas SL, Nader HB, Cavalheiro EA, Leite JP, Naffah-Mazzacoratti MG (2002) Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull* 58: 509-16
 282. Perovic S, Pergande G, Ushijima H, Kelve M, Forrest J, Muller WE (1995) Flupirtine partially prevents neuronal injury induced by prion protein fragment and lead acetate. *Neurodegeneration* 4: 369-74
 283. Perrett S, Freeman SJ, Butler PJ, Fersht AR (1999) Equilibrium folding properties of the yeast prion protein determinant Ure2. *J Mol Biol* 290: 331-45
 284. Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162: 703-17
 285. Pfeifer K, Bachmann M, Schroder HC, Forrest J, Muller WE (1993) Kinetics of expression of prion protein in uninfected and scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells. *Cell Biochem Funct* 11: 1-11
 286. Pocchiari M, Schmittinger S, Masullo C (1987) Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol* 68 (Pt 1): 219-23
 287. Pocchiari M, Macchi G, Peano S, Conz A (1988) Can potential hazard of Creutzfeldt-Jakob disease infectivity be reduced in the production of human growth hormone? Inactivation experiments with the 263K strain of scrapie. Rapid communication. *Arch Virol* 98: 131-5
 288. Pocchiari MS, S. Ladogana, A. Masullo, C. (1986) Effects of amphotericin B in intracerebrally scrapie inoculated hamster. Court, Paris
 289. Popper (1991) Selections from the logic of scientific discovery. The MIT Press, Cambridge, MA
 290. Porter DD, Porter HG, Cox NA (1973) Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol* 111: 1407-10
 291. Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi

- A (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 919-24
292. Prinz M, Montrasio F, Furukawa H, van der Haar ME, Schwarz P, Rulicke T, Giger OT, Hausler KG, Perez D, Glatzel M, Aguzzi A (2004) Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J Neurosci* 24: 5974-81
293. Priola SA, Raines A, Caughey WS (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* 287: 1503-6
294. Priola SA, Lawson VA (2001) Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein. *Embo J* 20: 6692-9
295. Proske D, Gilch S, Wopfner F, Schatzl HM, Winnacker EL, Famulok M (2002) Prion-protein-specific aptamer reduces PrP^{Sc} formation. *Chembiochem* 3: 717-25
296. Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, Masiarz FR, McKinley MP, Martinez HM (1980) Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 19: 4883-91
297. Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-44
298. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE (1998) Prion protein biology. *Cell* 93: 337-48
299. Race R, Oldstone M, Chesebro B (2000) Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* 74: 828-33
300. Race RE, Priola SA, Bessen RA, Ernst D, Dockter J, Rall GF, Mucke L, Chesebro B, Oldstone MB (1995) Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* 15: 1183-91
301. Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, Lehmann S, Favier A (2003) Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol Chem* 278: 9064-72
302. Raeber AJ, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A, Bessen RA, Mucke L, Manson J, Aguzzi A, Oldstone MB, Weissmann C, Chesebro B (1997) Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *Embo J* 16: 6057-65
303. Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252: 1705-8
304. Rice G, Stedman K, Snyder J, Wiedenheft B, Willits D, Brumfield S, McDermott T, Young MJ (2001) Viruses from extreme thermal environments. *Proc Natl Acad Sci U*

S A 98: 13341-5

305. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382: 180-2
306. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413: 282-8
307. Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K (1998) Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11667-72
308. Riesner D (2003) Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull* 66: 21-33
309. Rizzardini M, Chiesa R, Angeretti N, Lucca E, Salmona M, Forloni G, Cantoni L (1997) Prion protein fragment 106-126 differentially induces heme oxygenase-1 mRNA in cultured neurons and astroglial cells. *J Neurochem* 68: 715-20
310. Roberts C, Platt N, Streit A, Schachner M, Stern CD (1991) The L5 epitope: an early marker for neural induction in the chick embryo and its involvement in inductive interactions. *Development* 112: 959-70
311. Rohwer RG (1991) The scrapie agent: "a virus by any other name". *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 195-232
312. Rubenstein R, Gray PC, Wehlburg CM, Wagner JS, Tisone GC (1998) Detection and discrimination of PrPSc by multi-spectral ultraviolet fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 100-6
313. Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, Dwek RA (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13044-9
314. Rudd PM, Wormald MR, Wing DR, Prusiner SB, Dwek RA (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40: 3759-66
315. Russelakis-Carneiro M, Saborio GP, Anderes L, Soto C (2002) Changes in the glycosylation pattern of prion protein in murine scrapie. Implications for the mechanism of neurodegeneration in prion diseases. *J Biol Chem* 277: 36872-7
316. Rybner C, Finel-Szermanski S, Felin M, Sahraoui T, Rousseau C, Fournier JG, Seve AP, Botti J (2002) The cellular prion protein: a new partner of the lectin CBP70 in the nucleus of NB4 human promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* 84: 408-19
317. Ryou C, Legname G, Peretz D, Craig JC, Baldwin MA, Prusiner SB (2003)

- Differential inhibition of prion propagation by enantiomers of quinacrine. *Lab Invest* 83: 837-43
318. Saadi S, Wrenshall LE, Platt JL (2002) Regional manifestations and control of the immune system. *Faseb J* 16: 849-56
 319. Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-3
 320. Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. (1993) Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 268: 20276-84
 321. Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. (1994) Scrapie amyloid (prion) protein has the conformational characteristics of an aggregated molten globule folding intermediate. *Biochemistry* 33: 8375-83
 322. Safar J, Prusiner SB (1998) Molecular studies of prion diseases. *Prog Brain Res* 117: 421-34
 323. Sakudo A, Lee DC, Yoshimura E, Nagasaka S, Nitta K, Saeki K, Matsumoto Y, Lehmann S, Itohara S, Sakaguchi S, Onodera T (2004) Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 850-5
 324. Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 10: 2464-71
 325. Sanghera N, Pinheiro TJ (2002) Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J Mol Biol* 315: 1241-56
 326. Schipper HM, Cisse S, Stopa EG (1995) Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann Neurol* 37: 758-68
 327. Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314: 1209-25
 328. Schonberger O, Horonchik L, Gabizon R, Papy-Garcia D, Barritault D, Taraboulos A (2003) Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 473-9
 329. Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E (1995) Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8463-7

330. Sethi S, Lipford G, Wagner H, Kretzschmar H (2002) Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 360: 229-30
331. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD, Spear PG (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99: 13-22
332. Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125: 1239-50
333. Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA (1995) Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem* 270: 30221-9
334. Shyng SL, Moulder KL, Lesko A, Harris DA (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 270: 14793-800
335. Sigurdsson EM, Brown DR, Daniels M, Kascsak RJ, Kascsak R, Carp R, Meeker HC, Frangione B, Wisniewski T (2002) Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol* 161: 13-7
336. Sigurdsson EM, Sy MS, Li R, Scholtzova H, Kascsak RJ, Kascsak R, Carp R, Meeker HC, Frangione B, Wisniewski T (2003) Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci Lett* 336: 185-7
337. Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN (1988) The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 133: 456-63
338. Snow AD, Wight TN (1989) Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol Aging* 10: 481-97
339. Snow AD, Wight TN, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, DeArmond SJ, Prusiner SB (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest* 63: 601-11
340. Somerville RA, Oberthur RC, Havekost U, MacDonald F, Taylor DM, Dickinson AG (2002) Characterization of thermodynamic diversity between transmissible spongiform encephalopathy agent strains and its theoretical implications. *J Biol Chem* 277: 11084-9
341. Soto C, Kascsak RJ, Saborio GP, Aucouturier P, Wisniewski T, Prelli F, Kascsak R, Mendez E, Harris DA, Ironside J, Tagliavini F, Carp RI, Frangione B (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker

- peptides. *Lancet* 355: 192-7
342. Spielhauer C, Schatzl HM (2001) PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 276: 44604-12
 343. Spillmann D, Witt D, Lindahl U (1998) Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273: 15487-93
 344. Spire B, Dormont D, Barre-Sinoussi F, Montagnier L, Chermann JC (1985) Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma rays, and ultraviolet light. *Lancet* 1: 188-9
 345. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-40
 346. Stewart RS, Drisaldi B, Harris DA (2001) A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* 12: 881-9
 347. Stimson E, Hope J, Chong A, Burlingame AL (1999) Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38: 4885-95
 348. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-6
 349. Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J* 22: 3591-601
 350. Supattapone S, Wille H, Uyechi L, Safar J, Tremblay P, Szoka FC, Cohen FE, Prusiner SB, Scott MR (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* 75: 3453-61
 351. Suresh GK, Martin CL, Soll RF (2003) Metalloporphyrins for treatment of unconjugated hyperbilirubinemia in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004207
 352. Swietnicki W, Petersen RB, Gambetti P, Surewicz WK (1998) Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem* 273: 31048-52
 353. Tagliavini F, McArthur RA, Canciani B, Giaccone G, Porro M, Bugiani M, Lievens PM, Bugiani O, Peri E, Dall'Ara P, Rocchi M, Poli G, Forloni G, Bandiera T, Varasi M, Suarato A, Cassutti P, Cervini MA, Lansen J, Salmona M, Post C (1997) Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters.

Science 276: 1119-22

354. Tagliavini F, Forloni G, Colombo L, Rossi G, Girola L, Canciani B, Angeretti N, Giampaolo L, Peressini E, Awan T, De Gioia L, Ragg E, Bugiani O, Salmona M (2000) Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol* 300: 1309-22
355. Taguchi F, Tamai Y, Uchida K, Kitajima R, Kojima H, Kawaguchi T, Ohtani Y, Miura S (1991) Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Arch Virol* 119: 297-301
356. Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Prusiner SB (1994) Biosynthesis of the prion proteins in scrapie-infected cells in culture. *Braz J Med Biol Res* 27: 303-7
357. Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB, Avraham D (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129: 121-32
358. Tari AM, Lopez-Berestein G (2001) GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol* 28: 142-7
359. Taylor DM, Fraser H, McConnell I, Brown DA, Brown KL, Lamza KA, Smith GR (1994) Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* 139: 313-26
360. Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90
361. ten Dam GB, Hafmans T, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH (2003) Differential expression of heparan sulfate domains in rat spleen. *J Histochem Cytochem* 51: 727-39
362. Tilly G, Chapuis J, Vilette D, Laude H, Vilotte JL (2003) Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 548-51
363. Tompa P, Tusnady GE, Friedrich P, Simon I (2002) The role of dimerization in prion replication. *Biophys J* 82: 1711-8
364. Tsokos GC, Nambiar MP, Juang YT (2003) Activation of the Ets transcription factor Elf-1 requires phosphorylation and glycosylation: defective expression of activated Elf-1 is involved in the decreased TCR zeta chain gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 987: 240-5
365. Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB (1988) Purification and properties of the

- cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* 176: 21-30
366. Van Everbroeck B, Pals P, Martin JJ, Cras P (2002) Transmissible spongiform encephalopathies: the story of a pathogenic protein. *Peptides* 23: 1351-9
367. van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP (1996) Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* 34: 1228-31
368. Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14945-9
369. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM (1994) Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2607-10
370. Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2042-7
371. Vogtherr M, Grimme S, Elshorst B, Jacobs DM, Fiebig K, Griesinger C, Zahn R (2003) Antimalarial drug quinacrine binds to C-terminal helix of cellular prion protein. *J Med Chem* 46: 3563-4
372. Wadsworth JD, Jackson GS, Hill AF, Collinge J (1999) Molecular biology of prion propagation. *Curr Opin Genet Dev* 9: 338-45
373. Wagner H (2002) Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 5: 62-9
374. Walmsley AR, Zeng F, Hooper NM (2001) Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *Embo J* 20: 703-12
375. Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE (2002) Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 18421-30
376. Webster RV, Craig JC, Shyamala V, Kirby GC, Warhurst DC (1991) Antimalarial activity of optical isomers of quinacrine dihydrochloride against chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Biochem Pharmacol* 42 Suppl: S225-7
377. Weissmann C (1991) A 'unified theory' of prion propagation. *Nature* 352: 679-83
378. Weissmann C (1999) Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem* 274: 3-6
379. Welch WJ, Gambetti P (1998) Chaperoning brain diseases. *Nature* 392: 23-4
380. Welker E, Wedemeyer WJ, Scheraga HA (2001) A role for intermolecular disulfide

- bonds in prion diseases? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4334-6
381. Wells GA, Dawson M, Hawkins SA, Green RB, Dexter I, Francis ME, Simmons MM, Austin AR, Horigan MW (1994) Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 135: 40-1
 382. Wells GA, Hawkins SA, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI, Chaplin MJ, Stack MJ, Dawson M (1998) Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec* 142: 103-6
 383. Westaway D, Prusiner SB (1986) Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids Res* 14: 2035-44
 384. Westaway D, Goodman PA, Miranda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51: 651-62
 385. Westaway D, Miranda CA, Foster D, Zabarjadian Y, Scott M, Torchia M, Yang SL, Serban H, DeArmond SJ, Ebeling C, et al. (1991) Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice. *Neuron* 7: 59-68
 386. Whittington MA, Sidle KC, Gowland I, Meads J, Hill AF, Palmer MS, Jefferys JG, Collinge J (1995) Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet* 9: 197-201
 387. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-5
 388. Will RG (2003) Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* 66: 255-65
 389. Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3563-8
 390. Winder SJ (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26: 118-24
 391. Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC, Palmer MS, Collinge J (1996) Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet* 98: 259-64
 392. Wong BS, Pan T, Liu T, Li R, Gambetti P, Sy MS (2000) Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem Biophys Res*

Commun 273: 136-9

393. Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, Caughey B (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Embo J* 20: 377-86
394. Woods AG, Cribbs DH, Whittmore ER, Cotman CW (1995) Heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan attenuate beta-amyloid(25-35) induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 697: 53-62
395. Wormald MR, Dwek RA (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure Fold Des* 7: R155-60
396. Wuyts W, Van Hul W, De Boulle K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Ludecke HJ, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, Willems PJ (1998) Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet* 62: 346-54
397. Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J* 20: 5383-91
398. Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 145-50
399. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* 21: 3307-16
400. Zebrower M, Beeber C, Kieras FJ (1992) Characterization of proteoglycans in Alzheimer's disease fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 1293-300
401. Zebrower M, Kieras FJ (1993) Are heparan sulphate (HS) sulphotransferases implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Glycobiology* 3: 3-5
402. Zuegg J, Gready JE (2000) Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. *Glycobiology* 10: 959-74

ANNEXES

Participation aux congrès

Posters

1. **A. Barret**, P.F. Gallet, S. Simoneau, L. Forestier, C. Jayat-Vignolles, C. Larramendy, D. Papy-Garcia, D. Barritault, R. Julien and J.P Deslys.

“Glycogenome expression changes in prion infected cells and after treatment by heparan mimetics”

Prion Diseases: from basic research to intervention concepts, Gasteig, Munich, Germany, 08-10 Octobre, 2003, référence BR100.

2. **C. Larramendy**, **A. Barret**, E. Daudigeos, E. Mathieu, C. Riffet, D. Papy-Garcia, D. Barritault, C. Lasmézas, JP Deslys.

“Promising new drugs for prion therapeutics”

Prion Diseases: from basic research to intervention concepts, Gasteig, Munich, Germany, 08-10 Octobre, 2003, référence IV-27.

3. **Barret A.**, Tagliavini F., Forloni G., Limido L., Suardi S., Rossi G., Williams A, Sales N., Lasmézas C, Deslys JP.

“Evaluation of quinacrine treatment efficiency in different prion experimental model”

TSE, New perspectives for prion therapeutics, Hôtel Lutétia, Paris, France, 01-03 Décembre, 2002, référence:P-03.

4. **Deslys JP**, **Barret A.**, Larramendy C., Grosclaude J., Laude H., Couvreur P., Barritault D., Battioni P., Leblond Y, Hauw, JJ.

“New therapeutical approaches of prion diseases: mechanisms of action, synergistic effects and implications for human health”

TSE, New perspectives for prion therapeutics, Hôtel Lutétia, Paris, France, 01-03 Décembre, 2002, référence: P-07.

5. **A.Barret**, C. Larramendy, F. Mouthon, F. Auvré, K. Adjou, C. Lasmézas, N.Salès, JP Deslys.

“New therapeutic strategies against prion diseases: rapid in vitro and in vivo models”

International Union of Microbiological Societies World Congresses, The World of microbes,

Palais des Congrès, Paris, France, 27 Juillet-1er Août, 2002, référence n°V-865.

6. **Barret A.**, Larramendy C., Mouthon F., Auvré F., Adjou K., Lasmézas C., Salès N., Deslys JP

“New in vitro models for the evaluation of therapeutic strategies against prions”

Third forum of European Neuroscience, Fens, Palais des Congrès, Paris, France, 13-17 Juillet, 2002, référence 120.5 poster p305.

7. **F. Gallet**, L. Forestier, F. Guillerme, **A. Barret**, C. Jayat-Vignoles, A.S. Lia-Baldini, J.L. Vilotte, J.P. Deslys, H. Laude and R. Julien.

“DNA micro-array analysis of glycosylation changes during prion infection”

GlycoT 2002, Third International Symposium on Glycosyltransferases, Stockholm, 19-22 Septembre, 2002.

Communications orales

1. **A. Barret**, P-F Gallet, L. Forestier, C. Jayat-Vignolles, R. Julien and J.P Deslys

“Glycogenome expression and prion diseases: new targets for therapy?”

First International Conference of the European network of excellence Neuroprion, 24-28 Mai, 2004, Paris, France, référence 41.

2. **Barret A.**, Tagliavini F., Forloni G., Salmons M., Colombo L., Limido L., Suardi S., Rossi G., Auvré F., Larramendy C., Adjou K., Sales N., Bates C., Williams A., Lasmézas c, Deslys JP.

“Evaluation du traitement des maladies à prions par la quinacrine dans différents modèles expérimentaux »

Vèmes journées francophones de Virologie (Avril 10-11, 2003), Faculté de Pharmacie, Paris, France, référence. n°O100

3. **Deslys JP**, **Barret A.**, Larramendy C., Grosclaude J., Laude H., Couvreur P., Barritault D., Battioni P., Leblond Y, Hauw, JJ.

“New therapeutical approaches of prion diseases: mechanisms of action, synergistic effects and implications for human health”

TSE, New perspectives for prion therapeutics, Hôtel Lutétia, Paris, France, 01-03 Décembre, 2002.