

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé ED258

Faculté des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Génétique Moléculaire Animale

Thèse N° 21

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par

Florence Guillerme

Le 6 juin 2006

GLYCOGENOME ET MALADIES A PRIONS

Etude d'une tremblante expérimentale

Directeurs de thèse :

Raymond Julien et Paul-François Gallet

Jury :

Rapporteurs :

Docteur Myriam Ermonval (Institut Pasteur)

Docteur Jean-Luc Vilotte (INRA)

Examineurs :

Docteur Rafael Oriol (INSERM)

Professeur Abderrahman Maftah (Université de Limoges)

Docteur Paul-François Gallet (Université de Limoges)

Professeur Raymond Julien (Université de Limoges)

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé ED258

Faculté des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Génétique Moléculaire Animale

Thèse N° 21

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par

Florence Guillerme

Le 6 juin 2006

GLYCOGENOME ET MALADIES A PRIONS

Etude d'une tremblante expérimentale

Directeurs de thèse :

Raymond Julien et Paul-François Gallet

Jury :

Rapporteurs :

Docteur Myriam Ermonval (Institut Pasteur)

Docteur Jean-Luc Vilotte (INRA)

Examineurs :

Docteur Rafael Oriol (INSERM)

Professeur Abderrahman Maftah (Université de Limoges)

Docteur Paul-François Gallet (Université de Limoges)

Professeur Raymond Julien (Université de Limoges)

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Raymond Julien pour m'avoir accueillie au laboratoire il y a maintenant quelques années, pour avoir été mon tuteur en DEA, puis mon directeur de thèse, et pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux. Je remercie également François Gallet, co-directeur de ma thèse, pour ses conseils aux quotidiens, le temps passé pour mes travaux et pour son rire innimitable, mais aussi pour m'avoir aidé à mes débuts en tant que monitrice.

Merci à l'équipe dirigeante actuelle, Hubert Levéziel et Abdou Maftah, pour avoir suivi l'évolution de ma thèse. Je remercie en particulier Abdou, pour son accessibilité, merci donc Monsieur le Président.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury de thèse tout d'abord pour avoir accepté d'en faire partie et de plus pour s'y être investi. Un grand merci à Myriam Ermonval, rapporteur, pour avoir eu la gentillesse de m'accueillir afin de discuter de ma thèse, pour ses conseils très avisés et constructifs, pour le temps consacré à ma thèse... Merci à Rafael Oriol pour son intérêt régulier sur l'avancée de nos recherches.

Toute ma reconnaissance à Jean-Luc Vilotte, ainsi qu'à Hubert Laude et Annick Ledur, pour nous avoir fourni les échantillons biologiques utilisés tout au long de ma thèse, pour avoir suivi l'évolution des travaux et les discussions que nous avons eu.

Je remercie toutes les personnes du corps enseignant avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler : François Gallet, Michel Guilloton, Zéliha Ratinaud, Christelle Gady, Jean-Claude Rouly et Angélique Nizou (vive la microbio !), Jean-Robert Carrias, Ahmad Oulmouden, Lydie Rouhaud, Laure Brémaud, Jean-Michel Petit, Véronique Blanquet et Louis Gastinel... chaque expérience a été différente, mais toutes enrichissantes. J'ai apprécié toutes les tâches d'enseignement que j'ai pu effectuer (merci donc aussi aux étudiants !).

Une thèse est le fruit d'un travail réalisé à plusieurs...je remercie donc tous les membres du laboratoire ou d'autres labo qui m'ont aidée, soutenue, et avec qui j'ai passé de bons moments. Je remercie en particulier Chantal Jayat-Vignoles et Lionel Forestier (pour la construction et les analyses du micro-réseau), Nathalie Payet (vive les manip au mois d'août !), Marie-Pierre Laforêt (qui m'a transmis quelques connaissances en culture cell),

Mathilde Janot et Marion Dedet (qui j'espère se sont remises de leur stage sous mon aile!). Je n'oublie pas non plus Lourdès Ferreira (pour sa bonne humeur, et les petites discussions « entre filles du rez-de-chaussée»), Madeleine Pascaud (pour sa gentillesse et sa disponibilité) et Isaura Ferreira (un exemple de courage, avec toujours un mot gentil). Un clin d'œil particulier à mes copines de DEA (ou d'avant) : Céline, Zéliha, Barbara...nous voyons toutes le bout du tunnel ! Bon courage à tout ceux qui sont encore dans le tunnel : Magali, Matthieu (vous tenez le bon bout), Fanny, Benoît, Amro, Chris, Aurélien, Aymeric, et bonne chance à Christelle, Mathilde, Xavier et Renaud.

Un grand merci à la fine équipe, des amis connus grâce à ces années passées au labo...(par ordre alphabétique des prénoms) : Aurélie, Aurélien, Benoît, Christelle, Elena, Fanny, Magali, Marie, Matthieu, Nathalie, Nicolas et Sébastien...merci à vous tous pour tous les bons moments passés ensemble (que ce soit autour d'une pipette, d'un café, d'une boule noire qui disparaît miraculeusement, d'un barbecue, d'un lac radioactif...) et les moins bons durant lesquels on se serre les coudes !

Place maintenant aux amis de longues (très longues) dates. Un grand merci à mes amies : Laëtitia, Sidonie, Magali. Notre amitié compte énormément pour moi... Merci les filles pour votre courage, votre bonne humeur constante et votre gentillesse. Je remercie aussi Vincent et Damien, pour leurs petites visites inopinées, qui sont une bonne occasion de partager un verre (ou peut-être deux, au maximum!) et un petit repas « plat du jour » (eh oui, parfois, ça peut aussi être endives au jambon...).

Je remercie également ma belle-famille, et surtout Annie, Daniel et Marie pour leur soutien et leur compréhension, et l'affection profonde qui nous lie.

Un grand merci à mes grands-parents pour tout leur amour (réciproque, biensûr !), et puis aussi pour les petites cerises en bocal qui ont un succès fou ! Les savoir toujours prêts à me soutenir est un réel réconfort.

Je tiens biensûr à remercier Marie-Anne, ma « petite » sœur bientôt maman. Merci pour tout ce que l'on partage, pour nos conversations où l'on se parle à cœur ouvert... Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Denis et votre petit bout de chou qu'on aime déjà. Je souhaite également beaucoup de bonheur à mon frère Christian, à Sylvie et à mon adorable nièce Pauline. Merci à tous d'avoir compris que durant ces années, on ne se soit pas vus aussi

souvent et longtemps que nous l'aurions tous souhaité... et merci pour ces liens forts qui nous unissent.

Un immense merci à mes parents, pour leur soutien inconditionnel, pour les heures passées au téléphone notamment et la joie de passer un moment ensemble... Merci de me connaître par cœur, d'être toujours là pour moi et de tout faire pour mon bonheur. Vous êtes formidables.

Et enfin, mes remerciements tout particulier et plein d'amour à ma moitié, mon futur mari : merci Arnaud, pour tout ce que tu m'apportes depuis déjà plus de 10 ans ... Merci pour ton amour, ta compréhension, ton aide permanente, ta gentillesse, ton humour, ton intelligence, tes dons innés dans tout ce que tu entreprends ... j'arrête, la liste serait trop longue ! Je te remercie donc simplement pour qui tu es et le bonheur que tu m'offres en unissant nos vies.

A tous, Merci

Flo

Résumé

Glycogénome et maladies à prions. Etude d'une tremblante expérimentale.

Les maladies à prions sont caractérisées par l'accumulation d'une protéine prion dite PrP^{Sc}, isoforme mal conformée de la protéine prion cellulaire, appelée PrP^c. La protéine prion est une glycoprotéine glypiée qui interagit avec des partenaires eux-mêmes glycosylés, tels que les gangliosides. L'étude des modifications d'expression du glycogénome lors d'une tremblante murine expérimentale a permis de mettre en évidence une altération précoce de l'expression de seulement deux gènes dans les rates de souris malades : *ST3GalV* et *Pigq*. Ces deux gènes codent des enzymes clés respectivement impliquées dans la synthèse du ganglioside GM3 et des ancres GPI. Ces modifications, qui ont lieu bien avant l'apparition des premiers signes cliniques, induisent une hyposialylation (notamment membranaire) et favoriseraient la présence de protéines prions solubles. L'association de ces dérégulations altérerait la fonction transductrice de la PrP et faciliterait la propagation de la forme infectieuse.

Abstract

Glycogenome and prion diseases. Study of an experimental scrapie disease.

Prion diseases are characterized by the accumulation of a pathologic isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein called PrP^c. Prion is a GPI-anchored glycoprotein which interacts with various glycosylated partners, such as gangliosides. Analyses of glycogenome expression during an experimental scrapie disease lead us to identify an early alteration of expression of only two genes in scrapie-infected mice spleens: *ST3GalV* and *Pigq*. Both genes encode key enzymes implicated in GM3 and GPI anchor biosyntheses, respectively. Expression modifications occur long before the first clinical symptoms, induce a hyposialylation (notably at the membrane level) and probably lead to an increase of soluble prion proteins. Association of *ST3GalV* and *Pigq* down-regulations is thought to impair PrP transduction signal and to improve PrP^{Sc} spreading.

Abréviations

aa : Acide aminé

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

AS : Acide Sialique

ATNC : Agent Transmissible Non Conventionnel

Cer : Céramide

CMP-NeuAc : Cytidine Monophospho-acide N-acétylneuraminique / acide sialique

^{C_m}PrP : Forme transmembranaire de la protéine prion, la région C-terminale étant dans la lumière du RE.

DTT : Dithiothréitol

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

ESST : Encéphalopathie Subaiguë Spongiforme Transmissible

FDC : Cellule Dendritique Folliculaire (*Follicular Dendritic Cell*)

fMCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale

Fuc : Fucose

GAG : GlycosAminoGlycane

Gal : Galactose

GalCer : Galactosylcéramide

Glc : Glucose

GlcNH₂ : Glucosamine

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GPI : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

GSS : Gerstmann-Straüssler-Scheinker

IFF : Insomnie Fatale Familiale

Jpi : Jours post inoculation

KO : *Knock-out* : invalidation d'un gène

LacCer : Lactosylcéramide

LRP : Précurseur du Récepteur à la Laminine

Man : Mannose

MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob

^{N_{tm}}PrP : Forme transmembranaire de la protéine prion, la région N-terminale étant dans la lumière du RE

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

Prion : **p**roteinaceous **i**nfectious particle (les voyelles sont inversées)

Prnp : gène codant la protéine prion

PrP^c : Protéine prion cellulaire

PrP^{res} : Protéine prion partiellement résistante aux protéases

PrP^{Sc} : Protéine prion scrapie

PrP^{sen} : Protéine prion sensible aux protéases

QTL : Quantitative trait loci

RE : Réticulum Endoplasmique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)

RT-PCR : Transcription inverse -Réaction de polymérisation en chaîne (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (*Sodium Dodécyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

SLR : Système Lympho-Réticulaire

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Polymorphisme de base unique (*Single Nucleotide Polymorphisme*)

SOD : enzyme SuperOxyde Dismutase

STE : Séquence d'arrêt de transfert (*Stop Transfert Effector*)

UDP-GlcNAc : Uridine 5' Diphospho N-acétylglucosamine

UV : Ultraviolets

vMCJ : variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob

Table des matières

Avant-propos	21
Introduction	25
I. Les maladies à prions	27
A. Les différentes maladies à prions	27
B. Caractéristiques des maladies à prions	29
II. Le concept prion	30
A. L'hypothèse de la protéine seule	30
1. Etablissement de l'hypothèse	30
2. Modèles de conversion	32
3. L'hypothèse de la protéine seule et la barrière d'espèces	35
4. L'hypothèse de la protéine seule et les souches de prions	36
5. Questions non résolues	37
B. Les autres hypothèses	38
1. Hypothèses virales	38
2. L'hypothèse virino	39
3. Autres hypothèses	40
III. De la PrP ^c à la PrP ^{Sc}	41
A. Le gène codant la protéine prion	41
1. Organisation génomique du gène <i>Prnp</i>	41
2. Expression du gène <i>Prnp</i>	42
3. Polymorphisme et mutations	44
B. La protéine prion	48
1. La PrP ^c et la PrP ^{Sc} , une séquence primaire commune	48
2. La PrP ^c et la PrP ^{Sc} , des conformères différents	52
C. Localisation subcellulaire et sites de conversion	54
D. Fonction(s) de la protéine prion	57
1. Rôle dans l'homéostasie du cuivre	58
2. Rôle dans le stress oxydatif	59
3. Recherche de partenaires, rôle dans l'adhérence et la survie cellulaire	60
4. Rôle dans la transduction de signaux	61
E. Propagation de l'agent infectieux dans l'organisme	63
1. Rôle du système lymphoréticulaire	64
2. Propagation jusqu'au système nerveux central	66
IV. Rôle de la glycosylation dans la physiologie et la pathologie du prion	67
A. Les glycosylations de la PrP	68
1. La PrP, une protéine <i>N</i> -glycosylée	68
2. La PrP, une protéine <i>O</i> -glycosylée ?	70
3. La PrP, une protéine glypiée	71
B. Influence de la glycosylation sur la PrP	72
1. Glycosylation et contrôle du repliement	72
2. Influence de la glycosylation sur la conformation	74
3. La glycosylation dans le typage des souches	76
4. Ancrage glcosylé, le GPI	77
5. Interaction de la PrP avec des partenaires glycosylés	78
Résultats	81

I.	Matériels et méthodes.....	87
A.	Modèle biologique.....	87
B.	Création d'un microréseau d'ADN murin dédié à la glycosylation.....	88
1.	Sélection des cibles	88
2.	Fabrication des sondes ADNc	89
3.	Dépôts sur lames des unités d'hybridation.....	89
C.	Utilisation du microréseau	90
D.	RT-PCR semi-quantitative en temps réel.....	91
II.	Analyse du glycotranscriptome de cerveaux de souris saines et scrapie	94
A.	Au stade terminal de la maladie (60 jpi)	94
B.	Etude cinétique des gènes mis en évidence.....	96
III.	Analyse du glycotranscriptome de rates de souris saines et scrapie	99
A.	Article 1	107
B.	Article 2.....	143
	Discussion	165
I.	Les altérations de la glycosylation, une conséquence des maladies à prions ?.....	167
II.	Les altérations de la glycosylation influent-elles sur l'évolution des maladies à prions ?.....	169
	Conclusions-Perspectives.....	177
	Références	181
	Valorisation des compétences, le nouveau chapitre de la thèse	217
I.	Enjeux et place de la thèse	219
II.	Choix du sujet.....	221
III.	Déroulement, gestion et coût du projet	222
IV.	Résultats, impacts de la thèse	226

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Modèle du repliement imposé par la matrice (page 33).

Figure 2 : Modèle de nucléation-polymérisation (page 34).

Figure 3 : Organisation génomique des gènes *Prnp* ovin, murin, bovin et humain (page 42).

Figure 4 : Organisation de la protéine prion de mammifères (page 49).

Figure 5 : Différentes topologies de la protéine prion et divers modes d'insertion à la membrane (page 50).

Figure 6 : Représentation des fragments de la PrP générés par des clivages α et β (page 51).

Figure 7 : Représentation de la protéine prion cellulaire sous sa forme majoritaire : glypiée et *N*-glycosylée (page 52).

Figure 8 : Représentation tridimensionnelle des protéines PrP^c et PrP^{Sc} (page 53).

Figure 9 : Trafic cellulaire de la PrP^c et sites potentiels subcellulaires de formation de la PrP^{Sc} (page 55).

Figure 10 : Exemples de glycannes bi-, tri- et tétra-antennés présents sur les Asn 181 et 197 de la PrP (page 69).

Figure 11 : Exemple de composition glycanique de l'ancrage GPI de la protéine prion (page 72).

Figure 12 : La flexibilité de l'ancrage GPI permet deux orientations de la PrP vis-à-vis de la membrane, la première où la protéine est éloignée de la membrane, la seconde où elle est rapprochée (page 77).

Figure 13 : Cinétique d'expression des gènes de la glycosylation dont l'expression est modifiée dans le cerveau au stade sub-terminal d'une tremblante murine expérimentale (page 96).

Figure 14 : Western blot d'apparition de protéines prions pathologiques dans le cerveau de souris Tg338 après inoculation intracrânienne d'un homogénat de cerveau de souris atteinte de tremblante (page 97).

Figure 15 : Voies de biosynthèse des glycosphingolipides (page 101).

Figure 16 : Organisation du gène *ST3GalV* murin et épissage alternatif des exons 1' et 1 (page 102).

Figure 17 : La protéine PigQ, en complexe avec les protéines PigA, H et C (ainsi que Dpm2 et PigP) intervient dans la première étape de la biosynthèse de la partie glycanique des ancres GPI (page 103).

Figure 18 : Cinétique d'expression des gènes *Pigq* et *ST3GalV* dans la rate lors d'une tremblante expérimentale (page 129).

Figure 19 : Schéma illustrant l'impact potentiel des dérégulations des gènes *ST3GalV* et *Pigq* lors d'une tremblante expérimentale (page 165).

Tableaux

Tableau 1 : Les différentes ESST animales et leur première description (page 27).

Tableau 2 : Les différentes ESST humaines et leur première description (page 28).

Tableau 3 : Répartition des génotypes au codon 129 dans la population caucasienne et atteinte de MCJ (page 46).

Tableau 4 : Polymorphisme de la protéine prion et les cinq allèles communément présents chez le mouton (page 47).

Tableau 5 : Pourcentages d'hélices α et de feuillets β des formes PrP^c, PrP^{Sc} et PrP27-30 de la protéine prion (page 54).

Tableau 6 : Sites Internet utilisés pour sélectionner les gènes représentés sur le microréseau d'ADN (page 89).

Tableau 7 : Amorces utilisées en RT-PCR semi-quantitative pour valider les modifications d'expression mises en évidence par le microréseau (page 93).

Tableau 8 : Gènes mis en évidence par l'analyse par microréseau d'ADN du glyco-transcriptome de cerveaux de souris atteintes de tremblante comparativement à ceux de souris saines, au stade sub-terminal de 60 jpi (page 95).

Avant-propos

L'hypothèse du prion, suggérant l'existence d'une hérédité non mendélienne basée sur des changements conformationnels de protéines, qui pourraient s'autorépliquer et servir d'élément génétique, fragilise les conceptions existantes qui donnent aux acides nucléiques un rôle exclusif en matière d'hérédité. Toutefois, aucune preuve communément acceptée n'a pu définitivement confirmer ce qui reste à ce jour encore une hypothèse.

En effet, malgré l'étendue des connaissances aujourd'hui acquises sur les maladies à prions par plus de vingt années de recherche, les mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie ne sont toujours pas clairement élucidés.

L'objectif de ma thèse est d'apporter des informations nouvelles sur des évènements moléculaires collectivement désignés sous le terme de glycosylation cellulaire, dont la mise en jeu lors d'une maladie à prions apparaît de plus en plus comme importante. Pour ce faire, avec l'aide des collaborateurs de l'UMR-INRA j'ai abordé cette étude en exploitant l'existence d'un modèle murin de tremblante, mis au point au sein de l'INRA et en procédant à une analyse exhaustive de l'expression du glycogénome murin grâce à des outils élaborés par notre équipe.

Introduction

I. Les maladies à prions

A. Les différentes maladies à prions

Les maladies à prions ou Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles (ESST) constituent un groupe unique de maladies neurodégénératives qui affectent aussi bien les animaux (tableau 1) que les hommes (tableau 2, page suivante).

La tremblante du mouton est la première maladie à prions à avoir été décrite, et ce, dès 1732. Depuis, des maladies à prions ont été recensées chez de nombreuses espèces animales (tableau 1), telles l'Encéphalopathie Transmissible du Vison (ETV), la maladie du dépérissement chronique (ou syndrome de dégénérescence chronique) touchant les wapitis et le cerf-mulet des rocheuses, etc. Mais c'est avec l'émergence en 1986 de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) ou « maladie de la vache folle » dans les troupeaux de vaches anglaises que les maladies à prions ont connu le plus fort retentissement.

Les ESST Animales			
Maladie	Espèces atteintes	Cause	Première description
Tremblante	Ovins, Caprins	Lignées génétiquement sensibles, par contact entre individus	1732
Encéphalopathie Transmissible du Vison (ETV)	Vison	Infection par le prion des ovins ou des bovins (par voie alimentaire ?)	1947
Syndrome de dégénérescence chronique ou cachexie chronique	Cervidés nord-américains sauvages ou captifs	Inconnue	1967
Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)	Bovins, ruminants de zoos	Infection à partir de farines animales contaminées	1986
Encéphalopathie Spongiforme Féline	Félidés domestiques ou de zoos	Infection par des aliments d'origine bovine	1992

Tableau 1 : Les différentes ESST animales et leur première description.

Chez l'homme, de nombreuses maladies à prions ont été dénombrées (tableau 2). D'une incidence faible, elles peuvent être d'origine (i) sporadique, telle que la forme la plus répandue de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) décrite dès 1920 (ii) génétique, comme l'Insomnie Fatale Familiale (IFF), le Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) ou encore la forme familiale de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (fMCJ) et (iii) infectieuse, comme la forme iatrogénique de la MCJ, due à des infections inter-humaines malencontreusement survenues suite aux traitements par de l'hormone de croissance extraite d'hypophyses de cadavres. Parmi ces maladies à prions, le Kuru est apparue dès le tout début du XX^{ème} siècle. Cette maladie affecte des indigènes de Papouasie-Nouvelle Guinée pratiquant des rites funéraires cannibales. Mais c'est le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), apparu en 1996, et à l'époque nommé nouveau variant, forme infectieuse liée à la consommation de viande contaminée par l'agent de l'ESB, qui a suscité une vive inquiétude due à l'incertitude du nombre de personnes exposées et potentiellement atteintes (en 2002, les estimations prévoient de 100 à 136 000 décès par le vMCJ). Bien que depuis 1992, « seuls » 15 cas du vMCJ aient été recensés en France et 152 au Royaume-Uni, l'absence de test de diagnostic précoce et de traitements adaptés et efficaces fait de l'étude des maladies à prions un enjeu de santé publique.

Les ESST humaines		
Maladie	Cause	Première description
Kuru	Consommation rituelle de cerveaux de cadavres	1957
Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)	Sporadique : mutations non hérissables du gène <i>Prnp</i> Familiale : mutations hérissables du gène <i>Prnp</i> Iatrogène : infection par l'hormone de croissance, greffe de dure mère ou de cornées Variant : infection par le prion de l'ESB	1920
Syndrome de Gestmann-Straüssler-Scheinker (GSS)	Mutations hérissables du gène <i>Prnp</i>	1936
Insomnie Fatale Familiale (IFF)	Mutations hérissables du gène <i>Prnp</i>	1992
Insomnie Familiale Sporadique (IFS)	Mutations non hérissables du gène <i>Prnp</i> ou conversion spontanée de la PrP ^c en PrP ^{Sc}	1992

Tableau 2 : Les différentes ESST humaines et leur première description.

B. Caractéristiques des maladies à prions

Les maladies à prions ne sont pas contagieuses mais peuvent être transmissibles, au sein d'une même espèce et parfois même d'une espèce à une autre, comme en témoigne le vMCJ.

Une longue période d'incubation asymptomatique, d'une durée de 5 ans chez les bovins et de 5 à 30 ans chez l'homme caractérise les maladies à prions. Les signes cliniques correspondent exclusivement à une atteinte cérébrale avec une évolution progressive, sans rémission, jusqu'au décès. Les lésions tissulaires de type dégénératif sont quasi exclusivement confinées au système nerveux central (SNC). Ainsi, l'examen histopathologique post-mortem, réalisé en vue de confirmer le diagnostic, révèle des modifications spongiformes, une perte neuronale, une hypertrophie et une prolifération des cellules gliales. Des plaques amyloïdes sont également parfois observées.

Une autre caractéristique des maladies à prions est l'absence de réponse immunitaire spécifique après infection (Kasper *et al.* 1982).

De plus, l'agent infectieux résiste aux traitements de décontamination classiquement utilisés contre les agents infectieux conventionnels, tels que les bactéries, les champignons ou les virus (par exemple l'agent du prion résiste à un autoclavage à 121°C pendant 20 min, Dickinson et Taylor 1978). A ce titre, l'agent responsable des ESST est appelé Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC). Ainsi, l'ATNC ne peut être inactivé qu'après incubation dans une solution d'hydroxyde de sodium (soude) 1M ou d'hypochlorite de sodium (javel) titrant à 6 degrés chlorométriques pendant une heure à 20°C, et par un autoclavage en chaleur humide à au moins 134°C durant 18 minutes (Dormont 1999). L'agent infectieux persisterait même après un cycle d'autoclavage à 600°C en chaleur sèche (Brown *et al.* 2000).

La nature des ATNC n'est pas encore clairement arrêtée (voir partie II), mais le rôle central du prion, terme proposé par S. Prusiner en 1982 pour désigner la *protéine infectieuse* (Prusiner *et al.* 1982) est désormais démontré. La pathogénie serait liée à l'acquisition d'une structure tridimensionnelle anormale d'une protéine prion présente à l'état normal chez tous

les mammifères, appelée PrP^c (cellulaire), en une isoforme appelée PrP^{Sc} pour scrapie, le terme anglais de la tremblante du mouton.

La PrP^{Sc} s'accumule dans le SNC des patients atteints d'une maladie à prions. Cette protéine anormalement repliée est co-purifiée avec l'agent des ESST (Prusiner *et al.* 1982). Constitutive des plaques amyloïdes parfois présentes, la protéine prion est considérée à ce jour comme l'élément crucial, si ce n'est le seul, responsable de l'infection.

II. Le concept prion

Bien qu'il soit admis que la protéine prion est impliquée dans les maladies à prions, la nature exacte des circonstances associées à l'apparition de la maladie est encore sujette à discussions. L'hypothèse de la protéine seule est de loin la plus soutenue et documentée, mais d'autres thèses sont également envisagées.

A. L'hypothèse de la protéine seule

1. Etablissement de l'hypothèse

Dès 1966 (avant que la protéine prion soit identifiée en tant que principal constituant des agrégats amyloïdes), a été formulée pour la première fois l'hypothèse que l'agent infectieux pourrait être de nature protéique. T. Alper a en effet montré que le spectre de résistance aux rayonnements de l'agent de la tremblante du mouton se rapprochait plus de celui des protéines que de celui des acides nucléiques (Alper *et al.* 1966). Ainsi, les UV (qui détruisent les acides nucléiques) n'abolissaient pas l'infectiosité. En 1967, J.S. Griffith a proposé que l'agent serait une protéine, qui, sous certaines conditions, pourrait s'auto-répliquer et agir comme un agent infectieux (Griffith 1967). Cette hypothèse, qui bouleverse les dogmes de la biologie, n'a été reprise qu'en 1982 par S. Prusiner qui nomma l'agent des ESST « prion » pour *proteinaceous infectious particle* par analogie avec « virion » (Prusiner 1982). Dans cette étude, S. Prusiner et ses collaborateurs montrent qu'un extrait de cerveau infecté est partiellement résistant aux protéases (d'où le terme de PrPres utilisé pour signifier

la résistance de la PrP^{Sc} aux protéases, en opposition à la PrP^c qui est entièrement dégradée par un tel traitement et est à ce titre également appelée PrP^{sen}). Ce n'est que quelques années plus tard que l'existence du variant cellulaire (PrP^c) de la protéine prion scrapie (PrP^{Sc}) a été mise en évidence (Chesebro *et al.* 1985) et que le gène *Prnp*, codant la protéine prion, a été identifié (Basler *et al.* 1986).

Le rôle central de la protéine prion a définitivement été démontré par l'utilisation de souris transgéniques n'exprimant pas la protéine prion. Ainsi, les souris ayant leur gène *Prnp* invalidé sont totalement résistantes aux maladies à prions (Bueler *et al.* 1993). Ces modèles murins montrent qu'une infection à prions ne peut avoir lieu que si la protéine prion PrP^c est exprimée. Néanmoins, la présence indispensable de la PrP pour qu'il y ait infection à prions n'est pas une preuve que la protéine prion est la seule responsable des ESST. Elle pourrait par exemple agir comme un (co-)récepteur nécessaire à l'infection.

Une preuve formelle de la validité de l'hypothèse de la protéine seule réside en la reproduction *in vitro*, sans autre élément, de la conversion de protéines PrP^c en protéines PrP^{Sc} infectieuses.

Les premières expériences allant dans ce sens ont été obtenues chez la levure, où au moins quatre protéines ([PSI+], [URE3], [RNQ+] et [NU+]) ont des caractéristiques proches des protéines prion de mammifères. En effet, les prions de levure sont des éléments génétiques non mendéliens qui, de façon similaire aux PrP^{Sc} de mammifères, ont des conformations protéiques altérées qui se propagent par un processus autocatalytique. Comme chez les mammifères, les protéines prion de levure peuvent s'agréger, mais, chez la levure, ce processus est réversible et n'est généralement pas toxique pour la cellule. De façon similaire chez les mammifères et la levure, des souches de prions ont été mises en évidence. Les souches de prions se différencient par des caractéristiques phénotypiques transmissibles (temps d'incubation de la maladie, profils lésionnels... chez les mammifères, stabilité mitotique, dépendance de la machinerie des protéines chaperon cellulaire...chez la levure).

Les travaux sur la levure ont notamment permis de montrer que la production de protéines recombinantes de type prion, riches en feuillets β acquis *in vitro*, infectent de façon stable des cellules de levure normales et propagent les diverses caractéristiques des prions créés artificiellement (Tanaka *et al.* 2004). Ces travaux constituent donc une avancée importante dans la validation du concept du prion.

Chez les mammifères, de nombreuses tentatives de reproduction de l'infectiosité, répondant aux critères imposés par l'hypothèse de la protéine seule, se sont révélées infructueuses. Cependant, très récemment la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} semble pouvoir être reconstituée *in vitro*. L'utilisation d'un système acellulaire dit « PMCA » (Protein Misfolding Cyclic Amplification, amplification cyclique de protéines mal conformées) est en effet proche d'avoir reproduit ce qui apparaîtrait comme une preuve « irréfutable » de l'hypothèse de la protéine seule (Bocharova *et al.* 2005, Castilla *et al.* 2005a, Zou et Gambetti 2005). Même si ces systèmes doivent encore être améliorés afin notamment d'exclure l'intervention de facteurs exogènes et d'être dans des conditions plus physiologiques, cette méthodologie a l'énorme avantage de pouvoir détecter la présence de faibles quantités de PrP^{Sc}, et pourrait donc constituer une méthode de diagnostic non invasive efficace avant même l'apparition des symptômes de la maladie (Castilla *et al.* 2005b).

In vivo, une infectiosité a pu être reproduite mais après un très long temps d'incubation chez des souris surexprimant fortement des versions tronquées ou mutées de PrP (Legname *et al.* 2004).

Selon l'hypothèse de la protéine seule, la PrP^c se transforme en PrP^{Sc} par un processus autocatalytique mettant en jeu des mécanismes encore non démontrés.

2. Modèles de conversion

Les expériences d'initiation et de propagation des protéines PrP^{Sc} *in vitro* n'ont pas encore permis de faire la lumière sur le mécanisme de conversion de la PrP^c en PrP^{Sc}. Deux grands modèles de conversion sont généralement proposés : le modèle de remaniement imposé par la matrice (*refolding model*) et le modèle de nucléation-polymérisation (*seeding model*).

a. Modèle du remaniement imposé par la matrice (*refolding model*)

Selon ce modèle, également appelé modèle de conversion assistée, une haute barrière d'activation énergétique empêcherait la conversion spontanée de la PrP^c en PrP^{Sc}. La conversion ne se ferait que par l'interaction entre une protéine PrP^c et une protéine PrP^{Sc},

créant un hétérodimère. La PrP^{Sc} imposerait alors sa conformation à la protéine prion cellulaire qui deviendrait à son tour riche en feuillets β . L'homodimère de forme non native pourrait soit se dissocier en monomères aptes à convertir la PrP^c en PrP^{Sc} soit s'agréger pour former des fibrilles (Griffith 1967, Zou et Gambetti 2005).

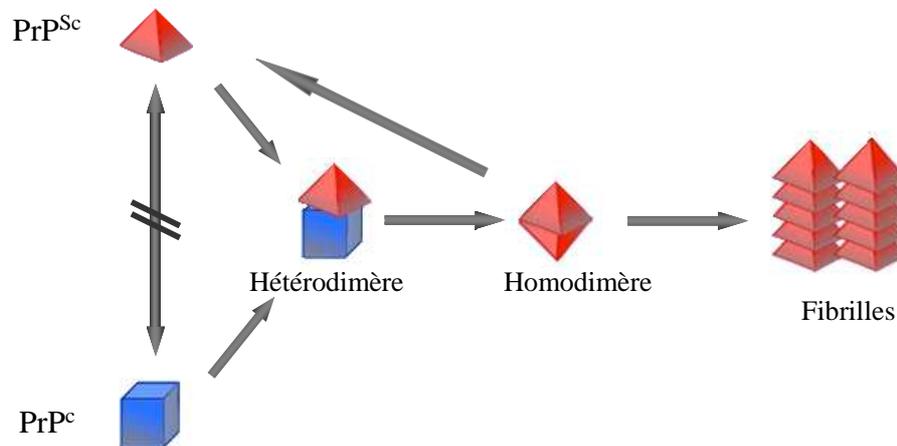


Figure 1 : Modèle du remaniement imposé par la matrice (d'après Aguzzi et Polymenidou 2004). Selon ce modèle, la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} n'est possible que via la formation d'un hétérodimère PrP^c-PrP^{Sc}. La PrP^c convertie en PrP^{Sc} s'agrégerait au contact des autres PrP^{Sc}, ou aurait la possibilité de se libérer du dimère pour former à son tour un hétérodimère avec une protéine prion cellulaire.

Certains auteurs suggèrent que la conversion se ferait selon ce principe, mais avec l'intervention d'un facteur encore non identifié, désigné sous le terme générique de « protéine X », qui faciliterait la formation de l'hétérodimère PrP^c (ou d'un intermédiaire entre la PrP^c et la PrP^{Sc}) - PrP^{Sc} (Zou et Gambetti 2005).

Ce modèle serait applicable à toutes les formes d'ESST (Zanusso et Monaco, 2005). Lors des maladies d'origines génétiques, les mutations et délétions/insertions pourraient provoquer une instabilité de la protéine prion mutée qui favoriserait l'acquisition des propriétés des PrP^{Sc}. Pour les maladies à prions sporadiques, le mécanisme de conversion serait provoqué par un évènement stochastique ou par mutations somatiques dans le cerveau. Les formes infectieuses seraient dues à l'introduction de protéines PrP^{Sc} exogènes qui interagiraient directement avec les protéines PrP^c du système lymphoréticulaire ou du SNC (Zanusso et Monaco, 2005).

b. Modèle de nucléation-polymérisation (*seeding model*)

Le nucléation-polymérisation postule que les protéines prion PrP^c et PrP^{Sc} sont en équilibre thermodynamique réversible. Les protéines PrP^{Sc} monomériques seraient des constituants naturels des cellules qui pourraient interagir les uns avec les autres et former un noyau très organisé. Ce noyau recruterait rapidement des protéines PrP^{Sc} monomériques, voire même directement les formes cellulaires (PrP^c). L'étape limitante serait la formation du noyau amyloïde. Ce noyau pourrait se fragmenter, produisant des particules hautement infectieuses. Ces noyaux infectieux seraient à leur tour capable de recruter des monomères de PrP .

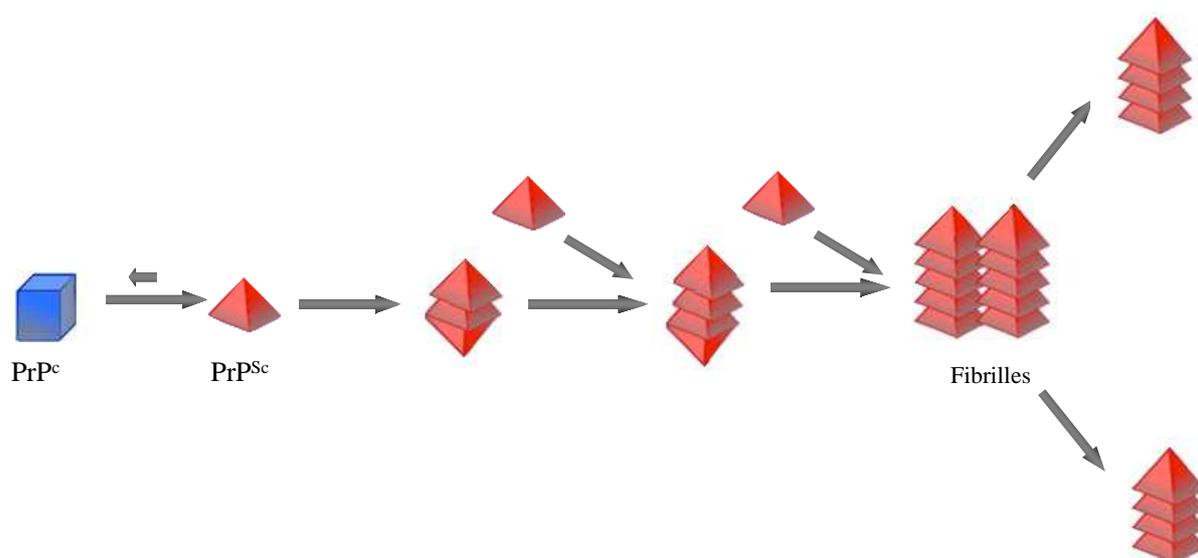


Figure 2 : Modèle de nucléation-polymérisation (Aguzzi et Polymenidou 2004 et Zou et Gambetti 2005). Selon ce modèle de conversion, la PrP^c est en équilibre thermodynamique avec la PrP^{Sc} . L'agrégation des PrP^{Sc} conduit à la formation d'un noyau amyloïde, capable de se fragmenter

Des expériences de fragmentation des fibrilles amyloïdes par sonication tendent à valider au moins pour partie ce modèle : les fragments générés peuvent en effet augmenter la formation de noyaux de nucléation (Jarrett et Lansbury 1993). De plus, certains auteurs estiment que ce second modèle rendrait mieux compte des cinétiques observées (Masel *et al.* 1999, Zou et Gambetti 2005).

L'infection ne serait pas véhiculée par des PrP^{Sc} monomériques ou formant de larges agrégats, mais par des oligomères de PrP^{Sc} (Aguzzi et Polymenidou 2004). Des résultats récents montrent en effet que ces derniers sont les particules les plus infectieuses (Masel *et al.* 2005, Silveira *et al.* 2005).

3. L'hypothèse de la protéine seule et la barrière d'espèces

Selon l'hypothèse de la protéine seule, l'efficacité de la conversion d'une protéine prion PrP^c endogène au contact d'une protéine PrP^{Sc} exogène repose sur l'homologie de leurs séquences primaires. Ainsi, l'interaction PrP^c-PrP^{Sc} est optimale au sein d'une même espèce (Prusiner *et al.* 1990). Par contre, une transmission hétérologue entre espèces différentes nécessite le passage de la barrière d'espèces, qui se caractérise par un allongement de la période d'incubation au cours du premier passage (Bueler *et al.* 1993 et Scott *et al.* 1997). Après plusieurs passages successifs chez le même hôte, le temps d'incubation se raccourcit pour finalement se stabiliser au temps caractéristique de la souche. La PrP^{Sc} qui s'accumule *de novo* correspond toujours à la séquence de la PrP de l'hôte et non à celle de l'inoculum.

La barrière d'espèces ne semble pas toujours pouvoir être franchie. Ainsi, en dépit de plus de deux siècles de cohabitation, la transmission naturelle de la tremblante du mouton à l'homme n'a jamais été formellement démontrée (Concepcion *et al.* 2005). De même, les différences de séquences entre les PrP humaines et murines seraient responsables du fait que seules 10% des souris inoculées intracérébralement par des prions humains de MCJ développent la maladie, et ce après une longue période d'incubation.

Plusieurs éléments tendent cependant à réfuter l'idée selon laquelle la barrière d'espèces ne serait liée qu'au pourcentage d'homologies entre les deux protéines prion incriminées. Par exemple, l'infection de souris par une ESST humaine devrait être facilitée chez des souris transgéniques exprimant le gène *PRNP* humain. Or ces souris ne deviennent sensibles à la maladie que si l'expression de leur *Prnp* endogène est abolie (Telling *et al.* 1995). Il a alors été suggéré qu'un facteur présent chez l'hôte, tel qu'une protéine chaperon, appelé protéine X, jouerait un rôle dans la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} (Telling *et al.* 1995). Plusieurs études ont même identifié la région C-terminale de la PrP comme site potentiel de liaison avec cette protéine X (Telling *et al.* 1995, Kaneko *et al.* 1997, Scott *et al.* 1997), toujours non identifiée chez les mammifères. L'intervention d'une telle protéine est d'autant plus envisagée que des protéines chaperons (telles que Hsp104 et GroEL présentes respectivement chez les levures et les bactéries) peuvent stimuler la formation de protéines prion scrapie dans un système de conversion *in vitro* acellulaire (Leffers *et al.* 2004).

En raison des variations d'efficacité de transmission selon les souches de prions considérées, un lien étroit entre la barrière d'espèces et les différentes souches de prions a très vite été suggéré, proposant même le concept de barrière de transmission, plutôt que de barrière d'espèces pour montrer que la détermination de l'infectiosité du prion n'était pas simplement due à l'homologie de séquences (Collinge 2001).

4. L'hypothèse de la protéine seule et les souches de prions

L'existence de souches de prions, qui se caractérisent chez les mammifères par des périodes d'incubation, des manifestations cliniques et neuropathologiques différentes (Prusiner *et al.* 1998), est resté pendant longtemps inexplicable selon l'hypothèse de la protéine seule, puisqu'il évoquait plutôt la présence d'acides nucléiques spécifiques. Ce n'est que récemment que des données expérimentales ont commencé à suggérer que les souches multiples de prions pourraient être rationalisées selon le modèle de la protéine seule : les souches représenteraient différentes conformations de la PrP^{Sc} (Peretz *et al.* 2002, Tanaka *et al.* 2004, Vanik *et al.* 2004), mais est-ce suffisant pour induire des périodes d'incubation aussi disparates ?

R. Krishnan et S. Lindquist ont montré dans un modèle de levure que la présence des différentes souches de prions serait due à des variations de la longueur du noyau de nucléation et de la nature des interfaces moléculaires (Krishnan et Lindquist 2005). Plusieurs modèles, appuyant l'hypothèse de la protéine seule, sont proposés pour intégrer simultanément les souches de prions, la barrière d'espèces et la formation d'agrégats tout en reconnaissant un rôle pour des facteurs cellulaires de l'hôte (Chien *et al.* 2004, Park *et al.* 2006).

L'implication de facteurs de l'hôte lors des maladies à prions est étayée par la mise en évidence de gènes ou de régions chromosomiques ayant une influence sur la période d'incubation des maladies (QTL). Ainsi, outre *Prnp*, d'autres loci sont impliqués dans ces différences de sensibilité (Stephenson *et al.* 2000, Cosseddu *et al.* 2002, Moreno *et al.* 2003).

La propagation des maladies à prions ne serait donc pas uniquement le fait de l'apparition (spontanée, exogène...) d'une protéine prion mal conformée, mais dépendrait également de facteurs cellulaires.

5. Questions non résolues

L'hypothèse de la protéine seule semble progressivement en mesure de trouver des explications aux constatations qui mettent en doute sa validité. Cependant plusieurs faits ne sont pas encore pris en compte dans cette hypothèse et nombreux sont les points qui n'ont pas été démontrés.

Par exemple, le pic d'incidence de la forme sporadique de la MCJ suit une équation de type gaussien avec une moyenne d'âge autour de 65 ans. Or si l'évènement déclencheur de la pathologie est un repliement aberrant spontané de la PrP^c en une isoforme PrP^{Sc}, comment expliquer que l'incidence de la maladie n'augmente pas avec l'âge ? De plus, le vMCJ apparaît de façon prédominante chez les individus jeunes et des données épidémiologiques indiquent que la plupart des bovins qui développent une ESB ne sont encore que des veaux (Arnold et Wilesmith 2004). De même, il a été suggéré que les jeunes agneaux seraient plus sensibles à l'infection naturelle par la tremblante que les adultes (Diaz *et al.* 2005). Ces différentes données laissent penser que des facteurs liés à l'âge doivent influencer sur la susceptibilité aux maladies à prions et/ou que des niveaux d'exposition différents seraient également en jeu (Ghani *et al.* 2003).

Par ailleurs, une disparité manifeste est parfois observée entre la quantité de PrP^{Sc} accumulée, les taux d'infectiosité et/ou les signes cliniques (Ersdal *et al.* 2005). Les symptômes neurologiques et la mort neuronale peuvent être transmis sans accumulation détectable de protéines prion anormalement repliées (Lasmézas *et al.* 1997). A l'inverse, des échantillons riches en PrP^{Sc} ne sont pas obligatoirement infectieux (Hill *et al.* 2000).

De plus, l'émergence de nouvelles souches de prions (Casalone *et al.* 2004) et l'atteinte d'individus que l'on pensait résistants (Everest *et al.* 2006) suggère qu'une remise en question permanente des postulats est à envisager, le concept du prion étant ainsi en constante évolution.

Bien que l'hypothèse de la protéine seule soit admise par une majorité de scientifiques, comme en témoigne l'attribution en 1997 du prix Nobel à son auteur, S. Prusiner, d'autres hypothèses ont été et sont proposées.

B. Les autres hypothèses

1. Hypothèses virales

L'hypothèse virale, dont l'hypothèse d'un virus lent, était la plus communément admise jusqu'au début des années 1980, date de la découverte de la protéine prion, car cette hypothèse se rapprochait le plus des caractéristiques de l'agent infectieux : transmissibilité, longueur de la durée d'incubation, petite taille. Des expériences d'inactivation par irradiation aux rayons X, réalisées par analogie avec des génomes viraux de taille connue, indiquent une taille du génome entre 2 et 4 kb (Rohwer 1984), soit la plus petite connue pour le génome d'une particule virale, ce qui expliquerait les difficultés de purification de l'agent. Les études de Alper (Alper *et al.* 1967) démontrant la forte résistance de l'agent infectieux aux traitements qui détruisent les acides nucléiques ont mis à mal cette hypothèse, bien qu'elle ne soit pas définitivement exclue (Manuelidis 2003 et communication de L. Manuelidis, 2nd congrès Dormont, Paris, 1-3 décembre 2005).

Selon l'hypothèse du virus, la corrélation existant entre les mutations du gène *PRNP* et les maladies à prions familiales s'expliquerait par le fait que la protéine prion serait un récepteur de très faible affinité pour un virus ubiquitaire des ESST (non identifié), raison pour laquelle l'incidence des MCJ sporadiques est faible. Par contre, les formes mutées de PrP^C seraient des récepteurs de haute affinité pour le virus, d'où la forte pénétrance de la maladie chez les individus porteur d'un allèle *PRNP* muté (Kimberlin 1990).

Il est également supposé que les maladies à prions pourraient être liées à un rétrovirus, qui en s'intégrant à proximité du gène *PRNP* dans le génome de l'hôte, provoquerait des mutations du gène codant la protéine prion. Cette dernière aurait alors tendance à s'agréger conduisant à l'apparition ultérieure des symptômes. Les formes familiales des maladies à prions s'expliqueraient par l'intégration de l'ADNc double brin du rétrovirus dans les cellules germinales (Labat 1997, Labat 1999, Ledoux 2005).

Malgré la recevabilité de l'hypothèse virale, un reproche majeur lui est imputable : comment expliquer l'absence de réaction immunitaire suite à l'infection ?

2. L'hypothèse virino

Afin notamment d'expliquer l'absence de réponse immunitaire, l'hypothèse virino (ou holoprion) est proposée par Dickinson (Dickinson et Outram 1988) puis C. Weissmann (Weissmann 1991). Le virino serait constitué d'une partie nucléique protégée par une capsidie protéique : la protéine prion. La petite taille de l'acide nucléique et la protection forte apportée par la protéine expliqueraient la résistance des acides nucléiques aux traitements censés les détruire. Tout comme dans l'hypothèse virale, l'acide nucléique serait responsable de la variabilité des souches ainsi que de la transmissibilité de la pathologie. Quant à la PrP^{Sc}, elle serait impliquée dans l'apparition des signes neurologiques.

Un argument en faveur des hypothèses virales et virino est la relation particulière de la protéine prion avec les acides nucléiques. Des acides nucléiques sont ainsi systématiquement purifiés avec l'agent des ESST, et il a été montré à maintes reprises que les acides nucléiques peuvent induire des changements dans la protéine prion et agir dans sa conversion (Nandi et Leclerc 1999, Cordeiro *et al.* 2001, Nandi *et al.* 2002, Adler *et al.* 2003, Zou *et al.* 2004, Deleault *et al.* 2003). Par ailleurs, la sur-expression de PrP^c dans un système cellulaire sensible à l'infection par le virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH) inhibe spécifiquement la synthèse de deux protéines virales (Env et Vrp), sans toutefois avoir un effet sur la réplication du génome viral (Leblanc *et al.* 2004).

Bien qu'incontestablement un lien existe entre la protéine prion et les acides nucléiques, l'identification d'une séquence nucléique spécifique de l'agent des ESST (que serait l'ADN/ARN viral) a toujours échoué. De plus, les acides nucléiques n'ont un effet sur la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} que s'ils sont originaires de l'hôte (Deleault *et al.* 2003) et non d'une espèce différente. La mise en évidence récente de polynucléotides dans des fractions purifiées de cerveaux de hamster infectés montre que ces séquences d'acides nucléiques sont variables, non spécifiques du prion, et comme précédemment souligné, vraisemblablement produites par l'hôte (Safar *et al.* 2005). Dernièrement, il a été suggéré que l'effet des acides nucléiques sur la conversion serait due à leurs charges polyanioniques (Deleault *et al.* 2005), ce qui replace les acides nucléiques en tant que porteurs de charges négatives et non plus en tant que porteurs d'information génétique.

3. Autres hypothèses

D'autres hypothèses sont timidement avancées, telles qu'une origine bactérienne (Broxmeyer 2004) : il a par exemple été proposé que *spiroplasma* (Bastian 2005) ou encore *Brucella abortus* (Watarai 2004) pourraient être impliqués. Dans ce cadre, la protéine prion serait un récepteur de ces pathogènes.

Malgré une avancée significative dans la validation, au moins partielle, de l'hypothèse de la protéine seule, la communauté scientifique reste divisée. Le rôle central de la protéine prion dans les maladies à prions ne fait cependant plus de doutes, et il semble également que des facteurs de l'hôte sont impliqués.

III. De la PrP^c à la PrP^{Sc}

A. Le gène codant la protéine prion

1. Organisation génomique du gène *Prnp*

Tout d'abord décrit chez la souris sous le nom de *Sinc* (pour Scrapie incubation period) comme le principal responsable de la susceptibilité des animaux à l'infection, le gène codant la protéine prion est maintenant clairement identifié sous le terme *Prnp* (Moore *et al.* 1998).

Les formes PrP^c et PrP^{Sc} sont donc toutes deux issues de l'expression de ce gène ubiquiste et très conservé entre les espèces (les régions codantes des protéines de mammifères ont près de 90% de similarités) ce qui suggère une fonction essentielle pour ce gène (Lee *et al.* 1998).

Localisé sur le chromosome 20 chez l'homme, 2 chez la souris (Sparkes *et al.* 1986), 13 chez le bovin et l'ovine (Lee *et al.* 1998), il a aussi des analogues chez le poulet (Harris *et al.* 1991, Gabriel *et al.* 1992), les reptiles (Simonic *et al.* 2000), les amphibiens (Strumbo *et al.* 2001) et les poissons (Cotto *et al.* 2005, Miesbauer *et al.* 2006).

Selon l'espèce considérée, le gène *Prnp* est constitué de 1 à 3 exons (3 exons chez le mouton, la souris et la vache, 2 chez l'homme et 1 seul chez les oiseaux par exemple), mais dans tous les cas, seul l'exon aval (d'environ 2 000 nucléotides) est partiellement codant (figure 3, page suivante). De ce fait, les deux isoformes de la protéine prion ne peuvent pas être les produits de transcrits ayant subi un épissage alternatif (Basler *et al.* 1986). Le seul cas rapporté d'épissage alternatif du gène *Prnp* est celui du gène bovin, où deux types d'ARNm, différant par la présence ou l'absence d'un exon appelé « exon 1b », ont été détectés dans de nombreux tissus, exceptée la rate, où seul l'ARNm ne contenant pas l'exon 1b est transcrit (Horiuchi *et al.* 1997).

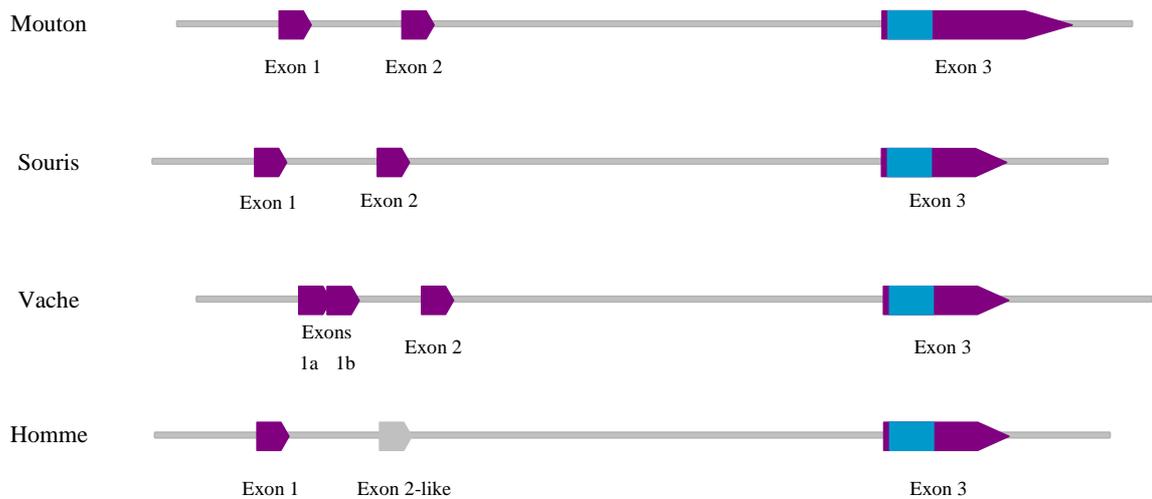


Figure 3 : Organisation génomique des gènes *Prnp* ovin, murin, bovin et humain. Les exons sont indiqués en violet et le cadre ouvert de lecture du gène, situé dans l'exon aval, est indiquée en bleu clair (d'après Lee *et al.* 1998, Heaton *et al.* 2003).

Bien que la structure du gène *Prnp* n'explique pas l'apparition ou la propagation des maladies à prions, sa séquence et son expression sont capitales pour l'étude et l'apparition des maladies à prions.

2. Expression du gène *Prnp*

Habituellement décrit comme gène de ménage, le gène *Prnp* ne possède ni boîte TATA ni élément initiateur dans sa région promotrice, mais présente des séquences riches en répétition GC (4 motifs répétés CCGCCC). Plusieurs sites de liaison de facteurs de transcription sont entièrement conservés entre mammifères avec de grandes régions d'homologie, particulièrement entre l'homme et le bovin. Parmi les nombreux facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de *Prnp* se trouvent Sp1, où au moins un site est présent chez tous les mammifères étudiés, AP-1 et AP-2 (Saeki *et al.* 1996, Inoue *et al.* 1997, Mahal *et al.* 2001, O'Neill *et al.* 2005). Par ailleurs, chez le mouton, l'expression du gène *Prnp* et donc la synthèse de la protéine prion pourrait être modulées par une polyadénylation alternative de ses ARNm (Goldmann *et al.* 1999).

Prnp est exprimé dans toutes les cellules, cependant son taux de transcrits est variable selon les tissus, avec les niveaux les plus élevés dans le cerveau. Cette expression différentielle révèle l'existence d'une régulation propre à chaque tissu dont l'origine n'est à présent pas déterminée. Ce gène est également régulé lors du développement (Mobley *et al.* 1988) avec une augmentation des taux de transcrits autour du 13^{ème} jour post-natal chez la souris (Manson *et al.* 1992, Monnet *et al.* 2003) et des 10-20 jours pour le hamster (McKinley *et al.* 1987), l'expression restant ensuite stable tout au long de la vie adulte (Mahal *et al.* 2001).

Des études réalisées sur des modèles de rongeurs transgéniques notamment montrent que la production de protéines prion est nécessaire pour qu'il puisse y avoir infection à prions (Bueler *et al.* 1993, Daude *et al.* 2003). De plus, le taux de PrP endogènes influence l'initiation et la progression des maladies à prions (Prusiner *et al.* 1990, Carlson *et al.* 1994, Manson *et al.* 1994). De ce fait, les périodes d'incubation à la suite d'inoculations expérimentales sont connues pour être inversement proportionnelles aux taux d'expression de *Prnp* (Prusiner *et al.* 1990, Bueler *et al.* 1992). Ainsi, une invalidation homozygote du gène *Prnp* chez la souris (*Prnp*^{0/0}) conduit à une résistance complète de ces souris aux infections à prions, alors que des souris hétérozygotes (*Prnp*^{+/0}), qui produisent moitié moins de PrP que les souris sauvages ont une période d'incubation et une durée de maladie plus longues en comparaison des souris sauvages (Bueler *et al.* 1993). Au contraire, la présence de plusieurs copies du gène *Prnp*, chez des souris transgéniques par exemple, conduit à un raccourcissement des périodes d'incubation, caractéristique utilisée pour l'étude de ces maladies (Vilotte *et al.* 2001).

La présence d'un analogue conservé du gène *Prnp* localisé en aval, appelé *Prnd* et codant pour la protéine Doppel (acronyme de downstream prion protein-like gene) ne semble pas avoir d'influence sur la susceptibilité et la propagation des maladies à prions (Comincini *et al.* 2001).

Bien que les taux de protéines prion exprimées semblent être un facteur majeur dont dépend la durée d'incubation de la maladie, aucune altération particulière de l'expression de *Prnp* n'est observée durant une ESST (Chesebro *et al.* 1985, Oesch *et al.* 1985). De plus, la quantité de protéines prion ne semble pas être finement liée à ses taux d'ARNm (Horiuchi *et al.* 1995, Horiuchi *et al.* 1997).

3. Polymorphisme et mutations

a. Dans les régions non codantes de *Prnp*

L'analyse des séquences nucléotidiques des *Prnp* humaine, ovine, bovine et murine a mis en évidence plusieurs SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) et insertion/délétion (indel) dans les régions promotrices et introniques 5' non codantes pouvant avoir une influence sur la sensibilité aux maladies à prions (Geldermann *et al.* 2003, King *et al.* 2003, Sander *et al.* 2004, Sander *et al.* 2005). Ainsi, certains SNP et indel dans les régions promotrices des gènes humain et bovin influencent respectivement l'apparition des formes sporadiques de la MCJ (McCormack *et al.* 2002) ou de l'ESB (Sander *et al.* 2004, Sander *et al.* 2005).

Malgré les efforts consentis pour identifier les polymorphismes des régions non codantes du gène *Prnp* et les associer à une susceptibilité aux maladies à prions, ces variations ne semblent pas être un facteur déterminant dans les maladies à prions.

b. Dans les régions codantes de *Prnp*

Transmises selon un mode autosomal dominant, les formes familiales des maladies à prions humaines comme la MCJ, IFF ou GSS (tableau 2 page 28) sont liées à des mutations dans la région codante du gène *PRNP*. Actuellement plus de 50 mutations ont été identifiées chez l'homme comme responsables de maladies à prions (Leliveld *et al.* 2006). Parmi les 24 mutations non-sens recensées comme provoquant des maladies à prions chez l'homme se trouve la mutation A117V étroitement liée au développement du syndrome de GSS. Cette mutation favoriserait la production d'une forme transmembranaire de la protéine prion, habituellement très minoritaire, appelée $C^{tm}PrP$ (figure 5, page 39) (Hegde *et al.* 1998). L'étendue de la neurodégénérescence chez des souris porteuses de cette mutation est directement proportionnelle aux taux de $C^{tm}PrP$ retrouvés dans leur cerveau suggérant que $C^{tm}PrP$ est directement responsable de la mort cellulaire (Sponne *et al.* 2004). Cependant, la formation de $C^{tm}PrP$ n'est pas un phénomène général à toutes les formes familiales d'ESST (et encore moins pour les formes sporadiques et infectieuses) (Stewart et Harris 2001). Le lien

pouvant exister entre le déclenchement d'une ESST et la synthèse des formes transmembranaires de la protéine prion n'est donc pas clairement établi.

De nombreuses mutations présentes dans la région codante du gène *PRNP* humain sont localisées dans les hélices α de PrP^c (ex D178N, T183A, E200K...). Il a été supposé que ces mutations entraîneraient une conversion spontanée de la PrP^c en PrP^{Sc}. Cependant différents travaux montrent que seules certaines mutations de *Prnp* entraînent une modification de la stabilité de la protéine (Riek *et al.* 1998, Liemann et Glockshuber 1999). Les mutations n'expliquent donc pas à elles seules le changement de conformation de la protéine prion et ne conduisent pas nécessairement à l'apparition spontanée d'une maladie (Riek *et al.* 1998, Liemann et Glockshuber 1999, Apetri *et al.* 2004), ce qui suggère que des événements ou facteurs supplémentaires sont nécessaires pour qu'il y ait développement d'ESST. De même, le considérable degré de variabilité phénotypique au sein d'individus d'une même famille, portant les mêmes mutations de *PRNP* (King *et al.* 2003), laisse supposer que d'autres facteurs sont impliqués dans la variabilité phénotypique.

Le polymorphisme le plus connu du gène *PRNP* chez l'homme se situe au niveau du codon 129. Ce codon code une valine (V) ou une méthionine (M) dans la protéine prion. En absence d'infections à prions ce polymorphisme est apparemment sans importance, mais il revêt une importance majeure lors du développement d'une maladie à prions. Ainsi, la répartition des cas de MCJ montre une nette différence de sensibilité selon le génotype au codon 129 (tableau 3). De plus, ce codon peut avoir une influence sur les caractéristiques associées à la maladie (Pastore *et al.* 2005). Par exemple, la mutation D178N est associée soit à une MCJ soit à une IFF selon que le codon 129 code respectivement pour une valine ou une méthionine. Enfin, le vMCJ, corrélé à l'ingestion de viande bovine contaminée, ne semble affecter que les patients homozygotes MM, aucun patient d'un autre génotype n'ayant développé de vMCJ.

	MM	MV	VV
Population caucasienne	39%	50%	11%
MCJ sporadiques	69%	14%	17%
MCJ iatrogéniques due à l'hormone de croissance	48%	20%	32%
vMCJ	100%	-	-

Tableau 3 : Répartition des génotypes au codon 129 dans la population caucasienne et atteinte de MCJ (d'après Windl *et al.* 1996 et Collins *et al.* 2004).

Très récemment une des hypothèses qui a été émise pour expliquer l'influence de ce polymorphisme sur la susceptibilité aux ESST suggère que la méthionine 129 serait un site alternatif d'initiation de la traduction. La protéine produite, tronquée des 128 premiers acides aminés, s'accumulerait dans le cytosol où elle aurait une plus forte propension à s'agréger et former des fibrilles (Concepcion et Padlan 2005). Cependant, il est intrigant de remarquer que la prédisposition aux maladies à prions chez les individus homozygotes MM au codon 129 est réelle pour les individus de type caucasien, mais n'est pas présente chez les Asiatiques (Baldwin *et al.* 1995). Ainsi, l'hétérozygotie (MV) sur ce codon est plus fréquente chez les patients japonais atteints de MCJ sporadique (18%) que dans la population générale où la fréquence des polymorphismes est de 0% VV (?), 92% MM et 8% MV (Doh-ura *et al.* 1991). Cette disparité de susceptibilité chez les individus de même génotype pour le gène *PRNP* est un élément de plus qui tend à impliquer d'autres facteurs cellulaires dans la genèse des maladies à prions.

Chez le mouton, au moins 14 SNP dans la région codante de *Prnp* ont été identifiés (Heaton *et al.* 2003). Les variants nucléotidiques affectant la traduction des codons 136, 154 et 171 (numérotation ovine) sont les polymorphismes connus les plus fréquemment associés à une variation à la susceptibilité à la tremblante (tableau 4). Bien qu'il y ait 12 combinaisons possibles des différents acides aminés, seuls 5 allèles sont fréquemment décrits chez le mouton (Hunter 2003). L'allèle sauvage est probablement ARQ (notation simplifiée de A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁) et les quatre allèles supplémentaires détectés jusqu'à présents (VRQ, ARR, AHQ et ARH) dériveraient de l'allèle sauvage par la variation d'un seul codon.

Numéro du codon	Acide aminé	Allèle
-----------------	-------------	--------

136	Valine (V)	VRQ
	Alanine (A)	ARQ, ARR, AHQ, ARH
154	Arginine (R)	VRQ, ARQ, ARR, ARH
	Histidine (H)	AHQ
171	Glutamine (Q)	VRQ, ARQ, AHQ
	Arginine (R)	ARR
	Histidine (H)	ARH

Tableau 4 : Polymorphisme de la protéine prion et les cinq allèles communément présents chez le mouton, (d'après Hunter 2003).

L'allèle ARR et à un moindre degré l'allèle AHQ sont corrélés à une importante résistance à la tremblante du mouton alors que les haplotypes VRQ et ARQ sont associés à une forte susceptibilité (Hunter 1997, Elsen *et al.* 1999, Madec *et al.* 2004). La susceptibilité à la tremblante du dernier haplotype (ARQ) est intermédiaire et varie selon les élevages et populations (Heaton *et al.* 2003). Ces données suggèrent que des interactions différentielles des variants de la PrP avec la machinerie cellulaire contribueraient à la susceptibilité ou à la résistance à la tremblante (Sabuncu *et al.* 2005). De façon surprenante, des analyses structurales montrent que les variants résistants ARR et AHQ de la PrP^c semblent avoir une structure moins stable que leurs homologues sensibles VRQ et ARQ (Eghiaian *et al.* 2004).

Dans le but d'éradiquer la tremblante, un programme national de sélection des ovins pour la résistance à la tremblante a été mis en place en France en 2002. L'idée conductrice est que l'utilisation de béliers ARR/ARR donnerait rapidement une protection importante des élevages vis-à-vis de la tremblante, comme cela a pu être montré dans différents élevages de Midi-Pyrénées. Ce principe a également été retenu par de nombreux pays et par l'Union Européenne. La résistance à la tremblante des moutons de génotype dit « résistant » est cependant toute relative, puisque plusieurs moutons de ce génotype ont accumulé de la PrP^{Sc} (Buschmann *et al.* 2004a, Buschmann *et al.* 2004b, Madec *et al.* 2004, De Bosschere *et al.* 2005) et pouvaient transmettre la maladie (Le Dur *et al.* 2005).

La partie codante du gène *Prnp* bovin est moins polymorphe que ses homologues humains et ovins. Cependant, quatre polymorphismes, aux codons 78, 113, 192 et une délétion d'un octapeptide ont été identifiés dans le cadre ouvert de lecture (Goldmann *et al.* 1991, Humeny *et al.* 2002, Jeong *et al.* 2005), sans qu'un lien soit toutefois établi avec l'ESB.

Plusieurs mutations dans la région codante du gène *Prnp* sont donc associées à des formes génétiques des maladies à prions. Cependant, aucune mutation dans le gène n'est

assimilée à l'apparition des formes sporadiques (qui représentent environ 85% des maladies à prions humaines). L'hypothèse formulée par Garcion *et al.* serait que la production de PrP^{Sc} résulterait de la mutation somatique d'une base (apparition d'une uracile par désamination d'une cytosine induite sous l'action d'un stress par exemple) qui produirait des PrP portant notamment les mutations observées lors des formes familiales. Même si la production de cette protéine prion mutée est transitoire, ils estiment qu'elle serait suffisante pour amorcer le processus d'amplification (Garcion *et al.* 2004).

La connaissance du gène codant la protéine prion est d'une importance toute particulière dans la compréhension et l'étude des maladies à prions. En effet, cela a permis de réaliser que l'expression du gène *Prnp* est nécessaire pour qu'il puisse y avoir une infection à prions. Codées par le même gène, ne subissant ni épissage alternatif ni variation du taux d'expression, les deux formes (PrP^c et PrP^{Sc}) de la protéine prion ne peuvent résulter que d'une modification post-transcriptionnelle (Stahl et Prusiner 1991, Dormont 1999).

B. La protéine prion

1. La PrP^c et la PrP^{Sc}, une séquence primaire commune

La séquence en acides aminés des protéines prion est très conservée et organisée de façon très similaire chez les mammifères (figure 4, page suivante). Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) réalisées sur les protéines prion recombinantes humaine (Zahn *et al.* 2000), bovine (Hornemann *et al.* 2004), ovine (Lysek *et al.* 2005) murine (Riek *et al.* 1998)... ont permis de déterminer leur structure tridimensionnelle et de confirmer leur grande similarité, la séquence primaire des PrP étant très proche entre les différentes espèces. Des analyses faites sur la protéine prion bovine naturelle ont prouvé que les résultats établis à partir de protéines recombinantes étaient tout à fait similaires à ceux obtenus sur des protéines prion cellulaires (Hornemann *et al.* 2004). En raison de son insolubilité, de telles études n'ont pu être réalisées avec la forme pathologique.

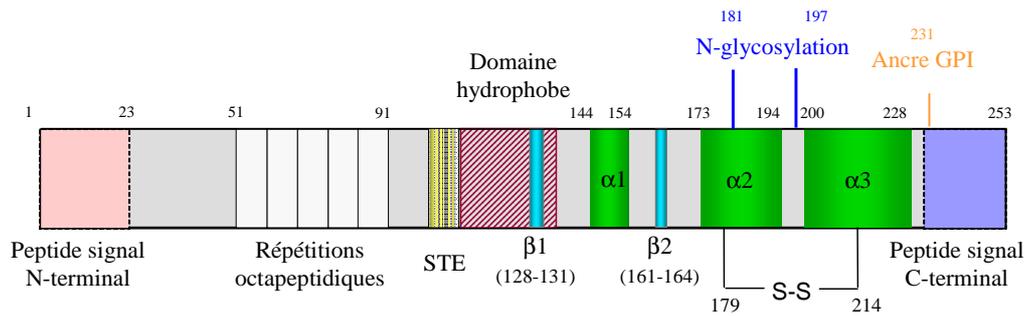


Figure 4 : Organisation de la protéine prion de mammifères (numérotation humaine). Sont indiqués les peptides signaux N- et C-terminaux, clivés durant la maturation de la protéine. Ancrée par un GPI (jaune-orange), la PrP présente néanmoins un domaine hydrophobe (hachuré rouge), parfois utilisé comme région transmembranaire. Les deux sites potentiels de N-glycosylation sont indiqués en bleu. Les hélices α et les brins β présents chez la protéine prion cellulaire sont représentés respectivement en vert et bleu.

Les 22 premiers acides aminés (numérotation humaine) codés par le gène *PRNP* constituent un peptide signal hydrophobe qui permet la translocation de la chaîne polypeptidique dans le réticulum endoplasmique (RE). Ce peptide signal est clivé dès le début de la traduction.

La région N-terminale flexible (résidus 23 à 120) renferme 4 octamères de séquence PHGGGWGQ (des résidus 60 à 91). Ces octarépétitions sont entourées d'un nonamère (PQGGGTWGQ, résidus 51 à 59) et d'une répétition partielle (GGGTHNQ, résidus 92 à 98). Cette région est connue pour sa capacité à lier le cuivre. En aval de ces octapeptides, se trouve un domaine hydrophobe très conservé dans toutes les espèces (comprenant les acides aminés (aa) 118 à 135), qui peut correspondre à un site d'insertion transmembranaire (De Fea *et al.* 1994, Hay *et al.* 1987). Ce site est précédé d'une séquence d'arrêt de transfert (aa 104 à 112) appelée STE (Stop Transfert Effector) (Yost *et al.* 1990). Cette séquence permet l'arrêt de la translocation dans le RE de la protéine native, avant que la région hydrophobe ne soit insérée dans la membrane.

La région centrale a été largement étudiée car des peptides synthétiques correspondant aux acides aminés 106-126 forment des fibrilles en solution et ont des propriétés neurotoxiques (Forloni *et al.* 1993). Cette région est également impliquée dans l'association

de la PrP^{Sc} avec la PrP^C (Singh *et al.* 2002, Norstrom et Mastrianni 2005). De plus, des différentes topologies de la protéine prion décrites (PrP (ou ^{Sec}PrP), ^{Ctm}PrP, ^{Ntm}PrP), deux (^{Ctm}PrP, ^{Ntm}PrP) sont liées à la présence de la région hydrophobe. La protéine prion possède en effet la particularité de pouvoir être synthétisée dans le RE sous trois formes (figure 5) : la forme glypiée, la plus fréquente, pour laquelle l'ancre Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) est fixée sur la Ser231 chez l'homme, et deux formes transmembranaires minoritaires, utilisant leur région hydrophobe (118-135 chez l'homme, figure 4, page précédente) comme domaine transmembranaire. Deux orientations de la protéine sont alors possibles (Hegde *et al.* 1998), l'une avec la région N-terminale dans la lumière du RE et donc appelée ^{Ntm}PrP, l'autre étant insérée de façon opposée, avec le domaine C-terminal dans la lumière du RE et nommée ^{Ctm}PrP (figure 5).

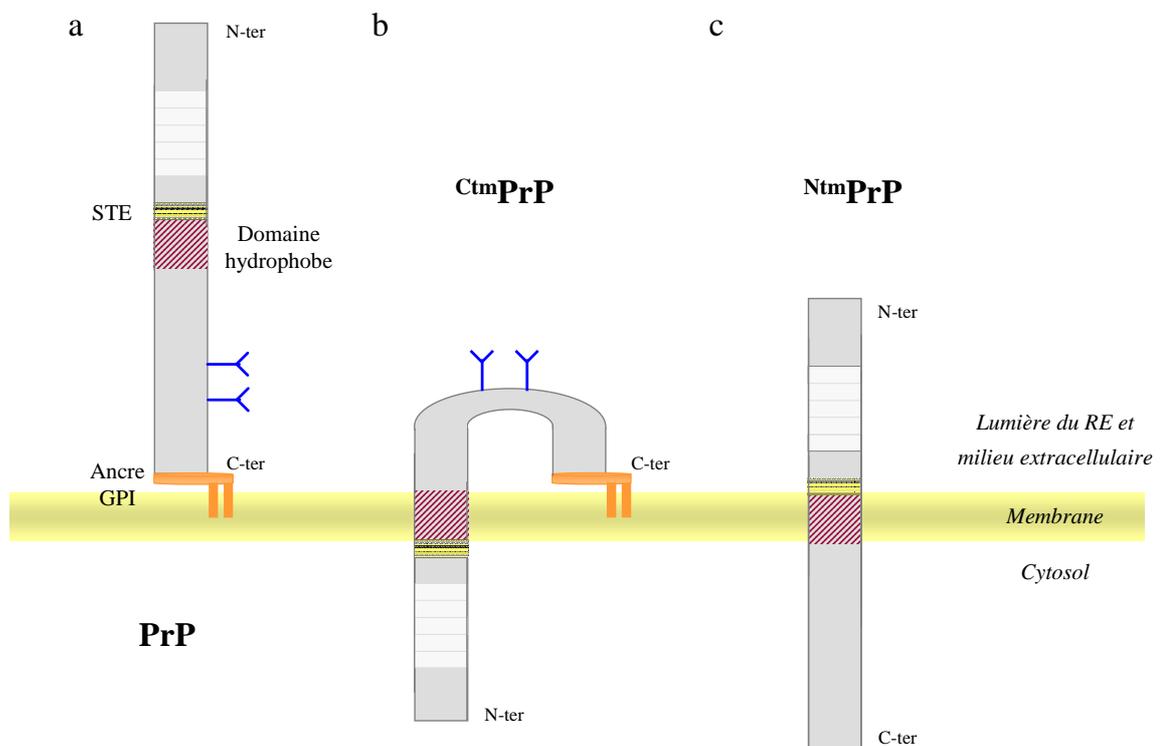


Figure 5 : Différentes topologies de la protéine prion et divers modes d'insertion à la membrane (a) forme très majoritaire glypiée (b) forme transmembranaire glypiée (c) forme transmembranaire non glypiée.

Le domaine globulaire de la protéine prion cellulaire (résidus 121-231) se structure en trois hélices alpha ($\alpha 1$: 144-154, $\alpha 2$: 173-194, $\alpha 3$: 200-228) et un petit feuillet bêta formé

de deux brins antiparallèles (128-131 et 161-164). Dans cette région, sont présents deux sites potentiels de *N*-glycosylation (181 et 197) occupés de façon variable, la protéine prion pouvant être bi-, mono- ou non-glycosylée. Deux cystéines (179 et 214) comprises dans les hélices 2 et 3 respectivement, sont impliquées dans la formation d'un pont disulfure. Ce dernier permet la formation d'une boucle de type V3 qui permettrait à la PrP d'interagir avec certains sphingolipides des rafts membranaires, tels que la sphingomyéline, le galactosylcéramide, ou encore le ganglioside GM3 (Mahfoud *et al.* 2002).

Enfin la séquence carboxy-terminale hydrophobe (232-253), qui contrôle l'ajout d'une ancre GPI, est clivée lors de la maturation de la protéine, ce qui permet le greffage du GPI sur la sérine 231. Cependant, pour environ 15% des protéines prion, ce clivage n'a pas lieu, les protéines sont alors tronquées à la glycine 228 (Stahl et Prusiner 1991).

Comme de nombreuses protéines, la PrP est sujette à des clivages protéolytiques (Mange *et al.* 2004). Ainsi, la PrP^c peut subir un clivage α entre les acides aminés 110 et 111 pour produire deux fragments : C1 (fragment C-terminal, de 17 kDa) et N1 (fragment N-terminal). Un deuxième type de clivage, appelé clivage β , peut se produire au sein même ou à proximité des répétitions octapeptidiques, ce qui génère un fragment C2 C-terminal de 21 kDa et un fragment N-terminal nommé N2 (Chen *et al.* 1995, Perini *et al.* 1996, Mange *et al.* 2004).

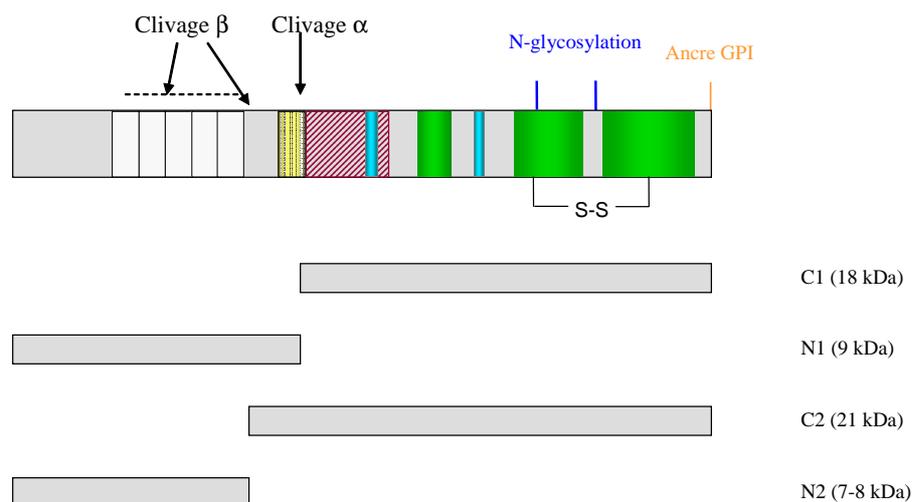


Figure 6 : Représentation des fragments de la PrP générés par des clivages α et β (d'après Mange *et al.* 2004). Seul un exemple de fragments C2 et N2 générés par un clivage β est représenté.

Le gène *PRNP* humain code donc pour une protéine de 253 acides aminés (252 chez la souris et 254 chez le mouton), qui subit ensuite une maturation pour produire une protéine fonctionnelle de 209 acides aminés, généralement liée à la membrane plasmique par une ancre GPI, et substituée de façon variable sur ses deux sites de *N*-glycosylation (figure 7).

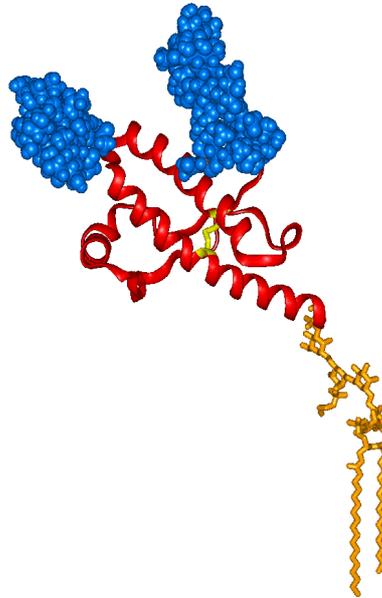


Figure 7 : Représentation de la protéine prion cellulaire sous sa forme majoritaire : glypiée (ancre GPI en jaune-orangé) et *N*-glycosylée (*N*-glycannes bleu).

2. La PrP^c et la PrP^{Sc}, des conformères différents

Codées par un seul gène, les isoformes cellulaires et scrapie de la PrP ont la même séquence primaire (Stahl *et al.* 1993) et présentent les mêmes modifications post-traductionnelles (*N*-glycosylation, pont disulfure, ancrage à la membrane par un GPI, Stahl et Prusiner 1991) mais divergent en de nombreux aspects.

Tout d'abord, les protéines PrP^c et PrP^{Sc} diffèrent par leur sensibilité aux traitements censés dégrader les protéines : comme nous l'avons vu, la PrP^c est sensible aux protéases qui la dégradent entièrement (d'où le terme PrPsen parfois employé), contrairement à la PrP^{Sc} qui, est partiellement résistante (et donc également appelée PrPres) : une digestion ménagée à la protéinase K de tissus infectés laisse ainsi apparaître une protéine prion tronquée jusqu'au résidu 90 environ, d'une masse moléculaire de 27-30 kDa (Bolton et Bendheim 1988). Ce

cœur protéique résistant, appelé PrP²⁷⁻³⁰, conserve des propriétés d'infection proches de celles de PrP^{Sc} (Safar *et al.* 1993).

L'une des différences majeures entre la PrP^c et la PrP^{Sc} est la structure tridimensionnelle. D'une forme cellulaires comprenant 3 hélices α et 1 feuillet β avec deux brins antiparallèles (figures 4 et 7, pages 38 et 42), la protéine prion peut passer à une structure PrP^{Sc} qui serait constituée de 2 hélices α et 4 feuillets β (Pan *et al.* 1993, Safar *et al.* 1993) (figure 8). Sous cette conformation, la protéine a tendance à s'agréger et à former des oligomères, qui sont fortement infectieux (Huang *et al.* 1996, Masel *et al.* 2005, Silveira *et al.* 2005).

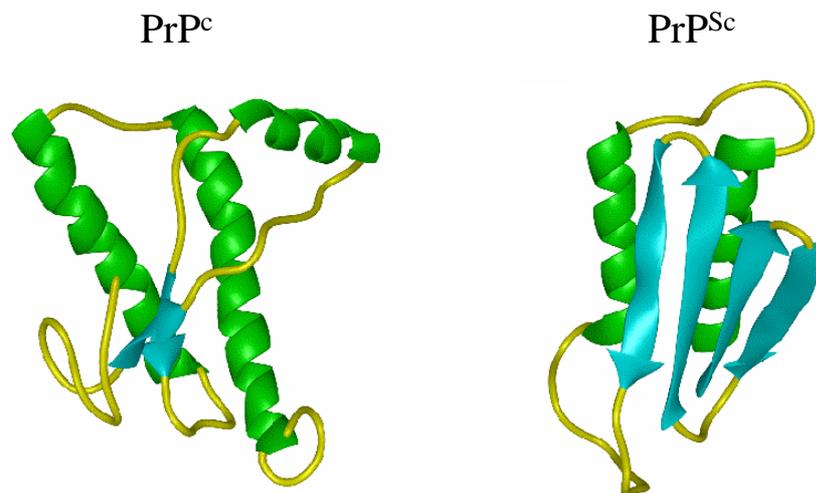


Figure 8 : Représentation tridimensionnelle des protéines PrP^c et PrP^{Sc} (les N-glycannes et l'ancre GPI ne sont pas représentés).

Par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge, les proportions relatives d'hélices α et de feuillets β ont pu être estimées pour chacune de ces formes (tableau 5, page suivante). Les pourcentages obtenus pour les formes PrP^{Sc} et PrP²⁷⁻³⁰ diffèrent selon les études (Caughey *et al.* 1991, Pan *et al.* 1993, Safar *et al.* 1993), probablement à cause des multiples formes et tailles des PrP^{Sc}, des difficultés à étudier des structures agrégées, et peut-être de l'impureté des extraits utilisés (Kazlauskaitė *et al.* 2005). De tels obstacles ne sont pas

rencontrés pour l'étude de la PrP^c, cette dernière étant soluble dans les détergents et facilement solubilisée en conditions non dénaturantes, ce qui permet son analyse en RMN et dichroïsme circulaire.

Protéine	Hélices α (%)	Feuillets β (%)
PrP ^c	42	3
PrP ^{Sc}	17-30	43-54
PrP 27-30	21	54

Tableau 5 : Pourcentages d'hélices α et de feuillets β des formes PrP^c, PrP^{Sc} et PrP 27-30 de la protéine prion (d'après Caughey *et al.* 1991, Pan *et al.* 1993, Safar *et al.* 1993).

Enfin, bien que ces deux formes soient généralement glypiées, un traitement à la phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC) induit la libération de la PrP^c dans le milieu, mais pas à celle de la PrP^{Sc} (Stahl *et al.* 1987).

C. Localisation subcellulaire et sites de conversion

La protéine prion étant une protéine glypiée et *N*-glycosylée, elle suit la voie de sécrétion classique des glycoprotéines. De ce fait, la PrP^c transite par plusieurs compartiments sub-cellulaires de sa biosynthèse jusqu'à sa dégradation, qui sont autant de sites potentiels de transconformation, d'accumulation et/ou de propagation de la PrP^{Sc}.

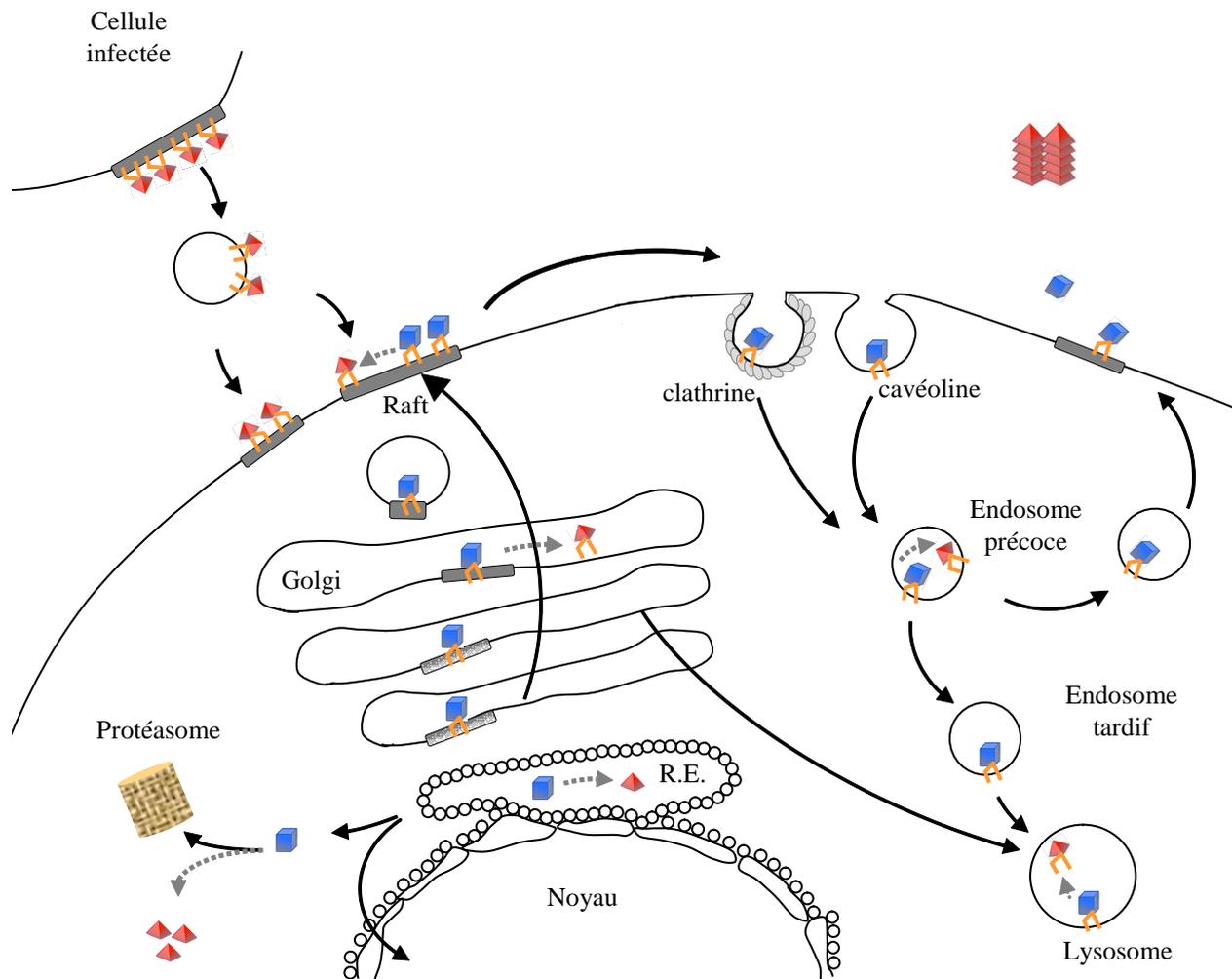


Figure 9 : Trafic cellulaire de la PrP^c (cube bleu) et sites potentiels subcellulaires de formation de la PrP^{Sc} (pyramide rouge). Lors de son transit dans le RE et l'appareil de Golgi, la protéine prion subit différentes maturations : clivage des peptides N- et C-terminaux, formation d'un pont disulfure et ajout d'une ancre GPI (jaune-orangé) et de *N*-glycannes. Localisée préférentiellement dans les rafts lipidiques, la protéine prion gagne la surface cellulaire. Elle peut ensuite être endocytée puis rapidement recyclée à la membrane plasmique (en quelques minutes), ou être dirigée vers les lysosomes où elle sera dégradée, avec une demi-vie d'environ 5 heures. La conversion en PrP^{Sc} peut avoir lieu à différents moments de son trafic cellulaire, indiqués par des flèches grises pointillées (d'après Collins *et al.* 2004, Kazlauskaitė et Pinheiro 2005).

Grâce notamment à son ancre GPI, la protéine prion est dirigée à la membrane plasmique, préférentiellement dans des rafts lipidiques. Les rafts sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels la transduction de signaux, le trafic intracellulaire de protéines (dont

les toxines bactériennes) et de lipides. Les rafts sont également des sites privilégiés d'interactions de l'hôte avec des pathogènes ou des toxines (Fantini *et al.* 2002). La composition lipidique particulière de ces microdomaines leur confère une plus grande rigidité et une plus forte résistance à la solubilisation par des détergents (d'où leur autre appellation DRM : *Detergent Resistant Membranes*), ce qui permet leur isolement face aux autres régions membranaires (Loberto *et al.* 2005). La PrP se trouve donc concentrée dans des rafts, où elle peut interagir avec différents composants cellulaires. De plus, la membrane plasmique constitue vraisemblablement le premier lieu de contact de la PrP^c endogène avec la PrP^{Sc} exogène, ce qui en fait un site privilégié de conversion.

Le compartiment endolysosomal est un autre site supposé de conversion, la PrP^{Sc} y étant détectée. Lors de son métabolisme cellulaire normal, la protéine ancrée par son GPI est en effet internalisée puis recyclée à la surface membranaire. Deux grandes voies d'endocytose ont été décrites pour PrP. La première fait appel aux puits tapissés à clathrine (« *coated-pits* »). Cette endocytose, inhabituelle pour une protéine ne possédant pas de domaine cytoplasmique pouvant interagir avec la clathrine, semble dépendre d'un motif basique de la moitié N-terminale de la PrP (23-107) qui lui confère la capacité à entrer dans ces puits tapissés (Sunyach *et al.* 2003). Cette internalisation serait médiée par d'autres facteurs possédant un signal de localisation pour les puits recouverts, tels que le précurseur du récepteur à la laminine (LRP) (Campana *et al.* 2005). La seconde voie d'endocytose décrite pour la protéine prion est dépendante de la cavéoline (Peters *et al.* 2003). Cette endocytose est induite en présence de fortes concentrations en cuivre. Le cuivre induirait également un mauvais repliement de la PrP, qui serait alors dirigée vers les lysosomes.

Au cours du cycle d'endocytose, certaines protéines subissent un clivage α , peut-être précédé du clivage β (figure 6, page 51). La molécule restante, toujours glypiée, est recyclée à la surface cellulaire, alors que le fragment peptidique N1 contenant les aa 23 à 110 est libéré dans le milieu extracellulaire. Le fragment C-terminal C1 (aa 111-231) possède les deux sites potentiels de *N*-glycosylation et est à ce titre di-, mono- ou non-glycosylé (Chen *et al.* 1995, Perini *et al.* 1996).

Alors que la majeure partie de la PrP est endocytée, 10 à 30 % du pool de PrP^c membranaires peuvent être relâchés de la surface cellulaire sous l'action spécifique d'une phospholipase qui clive la partie inositol de l'ancre GPI. Quant aux protéines PrP^c endocytées,

la majorité d'entre elles va être recyclée à la membrane, alors qu'un faible pourcentage est dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé.

D. Fonction(s) de la protéine prion

Connaître la fonction de la protéine prion, que l'on suspecte importante au vue de sa grande conservation au cours de l'évolution, est d'un enjeu majeur pour l'étude des maladies à prions, la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} pouvant engendrer une perte ou un gain de fonction. Malgré les très nombreux travaux entrepris dans cette optique, la fonction de la PrP n'est toujours pas clairement établie.

L'invalidation du gène codant la protéine prion a été l'une des premières stratégies employées pour identifier la fonction de la PrP^c. Plusieurs lignées de souris *Prnp*^{-/-} ont donc été créées. Les premières lignées générées (ZrchI et Npu) sont viables et présentent un développement normal (Bueler *et al.* 1992, Manson *et al.* 1994, Tobler *et al.* 1996). Par contre, les lignées produites ultérieurement (Ngsk, Rcm0, ZrchII) présentent une dysfonction cérébelleuse due à une perte des cellules de Purkinje. Ces phénotypes secondaires ont par la suite été attribués non pas à la perte de fonction de la PrP, mais à l'expression ectopique de la protéine Doppel dans le cerveau, provoquée involontairement lors de la production de ces souris (Moore *et al.* 1999, Rossi *et al.* 2001). La protéine Doppel, qui présente de nombreuses similarités avec la protéine prion ne compenserait pas la perte de fonction de la protéine prion (Paisley *et al.* 2004). De plus, la protéine Doppel ne semble pas établir d'interactions avec les partenaires connus de la PrP, pas plus qu'elle n'interagit avec la protéine prion (Azzalin *et al.* 2005). Une autre protéine très conservée, Shadoo (Sho), qui possède également de nombreuses similarités avec la protéine prion, a été identifiée (Premzl *et al.* 2003, Miesbauer *et al.*, 2006). Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires pour établir un lien fonctionnel entre ces deux protéines.

L'invalidation du gène *Prnp* ne permettant pas de mettre en évidence un rôle fondamental de la PrP dans l'organisme, l'établissement de sa/ses fonction(s) s'appuie en particulier sur sa localisation et l'identification de ses partenaires. Quatre pistes principales ont été avancées, grâce notamment à l'utilisation de modèles cellulaires: un rôle de la PrP

dans l'homéostasie du cuivre, dans la résistance au stress oxydatif, dans l'adhérence et dans la transduction de signaux. Cependant, la question du rôle physiologique de PrP^c reste encore ouverte.

1. Rôle dans l'homéostasie du cuivre

Un lien entre les maladies à prions et le métabolisme du cuivre a été proposé dès les années 1970 (Pattison et Jebbett 1971a, Pattison et Jebbett 1971b). La création des souris KO, bien que peu informatives du fait de leur absence de phénotype majeur particulier, a révélé un taux de Cu²⁺ intracellulaire plus faible chez ces souris comparativement aux souris normales (Brown *et al.* 1997). La capacité de la PrP^c à lier spécifiquement les ions cuivre Cu²⁺ a été mise en évidence (Stockel et Hartl 2001) et le site majeur de liaison identifié dans la région de répétition octapeptidique (Hornshaw *et al.* 1995, Brown *et al.* 1997, Miura *et al.* 1999, Garnett *et al.* 2006). Cette région très conservée peut coordonner la liaison coopérative et pH dépendante de 4 ions Cu²⁺ (Brown *et al.* 1997). Il existerait également un autre site de liaison au cuivre localisé autour des histidines 96 et 111 (Jackson *et al.* 2001), mais d'autres études contredisent ces résultats (Garnett et Viles 2003).

Il a également été montré que des concentrations élevées de Cu²⁺ favorisent l'endocytose de la PrP, ce qui conduit à l'hypothèse que la protéine prion aurait un rôle dans le métabolisme du cuivre et dans son transport (Pauly et Harris 1998, Lee *et al.* 2001, Perera et Hooper 2001). Cependant, plusieurs études n'abondent pas en ce sens, montrant par exemple que la PrP n'a pas d'influence sur la libération du cuivre aux concentrations physiologiques (Rachidi *et al.* 2005).

Dans le cerveau, la PrP^c est notamment détectée dans les membranes synaptiques, vraisemblablement dans le domaine pré-synaptique (Herms *et al.* 1999, Fournier *et al.* 2000). La présence importante de la PrP^c dans les neurones et les pré-synapses suggère que la protéine prion serait impliquée dans l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique (Re *et al.* 2006). La capacité de la PrP de lier le cuivre associé au fait que la concentration en cuivre est fortement réduite dans des préparations synaptosomales de souris *Prnp*^{0/0} suggèrent que la protéine prion cellulaire pourrait en effet réguler la transmission synaptique en modulant la quantité de cuivre dans l'espace synaptique (Brown *et al.* 1997, Herms *et al.*

1999, Vassallo et Herms 2003). Une hypothèse selon laquelle la PrP^c pourrait jouer un rôle fonctionnel et trophique en régulant la capture et le transport de précurseurs d'acides aminés aux neurotransmetteurs et/ou en régulant le nombre, l'affinité et la diffusion des neurorécepteurs à ces neurotransmetteurs a également été émise (Ledoux 2005).

Le cuivre jouerait également un rôle lors des maladies à prions, en modifiant la conformation de la région N-terminale de la PrP (Wadsworth *et al.* 1999) ce qui pourrait favoriser le changement de conformation et/ou influencer son affinité pour un récepteur ou partenaire cellulaire (Hundt *et al.* 2001). Ce changement de conformation lors de la liaison au cuivre pourrait même induire une conformation de type feuillet β , et conduire à la production de protéines PrP insolubles dans les détergents et résistantes à la protéinase K (Quaglio *et al.* 2001, Jones *et al.* 2004, Kiachopoulos *et al.* 2004). Par ailleurs, la chélation du cuivre permet d'inhiber l'amplification de la PrP^{Sc} (Orem *et al.* 2006). Paradoxalement, les maladies à prions présentent des caractéristiques communes à celles dues à un défaut de cuivre. Comme la PrP^{Sc} n'est pas capable, contrairement à la PrP^c, de lier le cuivre (Muller *et al.* 2005), il a été récemment suggéré que la perte de fonction de PrP^c associée à la présence de protéines prions non fonctionnelles serait responsable de la perte des propriétés anti-oxydantes (Brown 2005).

2. Rôle dans le stress oxydatif

Un lien entre la PrP^c, le cuivre et la résistance au stress oxydatif est argumenté par le clivage β (figure 6 page 41). En effet, ce dernier est réalisé de façon dépendante des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) et du cuivre (McMahon *et al.* 2001). L'absence de clivage β par altération des sites de clivage, après exposition des cellules à des ROS, augmente la sensibilité au stress oxydatif (Watt *et al.* 2005).

Ainsi, de nombreux résultats, bien que controversés (Waggoner *et al.* 2000, Hutter *et al.* 2003), impliquent la PrP^c dans des mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydant, en relation avec les ions métalliques. Le niveau d'expression de la PrP^c est augmenté par la présence de cuivre (Varela-Nallar *et al.* 2006, Toni *et al.* 2005) et a pu être corrélé à la résistance cellulaire au stress induit par des radicaux libres ou des ions métalliques (Frederikse *et al.* 2000). Cette résistance au stress oxydatif serait liée à une activation de

l'enzyme SuperOxyde Dismutase (SOD) dépendante du cuivre via la PrP^c et/ou à une activité de type SOD de la protéine prion elle-même (Brown *et al.* 1997, Brown *et al.* 1999a, Milhavel *et al.* 2000, Wong *et al.* 2000).

3. Recherche de partenaires, rôle dans l'adhérence et la survie cellulaire

La recherche de partenaires a permis d'identifier plusieurs molécules qui interagissent la protéine prion, suggérant l'implication de cette dernière dans divers mécanismes, tels que l'adhérence ou la survie cellulaire.

Un rôle anti-apoptotique de la PrP est suggéré par la découverte d'une protéine de 66 kDa qui a la capacité à se lier à la PrP^c, appelée STI1 pour « Stress-inducible protein 1 » (Zanata *et al.* 2002). Cette interaction induirait un signal de neuroprotection empêchant l'apoptose des neurones (Chiarini *et al.* 2002, Zanata *et al.* 2002). Un rôle anti-apoptotique de la protéine prion avait déjà été suggéré suite à l'identification d'une homologie de séquences des répétitions octapeptidiques de la PrP avec le domaine 2 de Bcl-2 (BH2), connu comme étant crucial pour la fonction anti-apoptotique de Bcl2. L'hypothèse que la PrP aurait un rôle dans la régulation de l'apoptose neuronale est également étayée par la liaison qu'elle peut établir avec la protéine pro-apoptotique Bax. Des études complémentaires ont montré que, comme Bcl-2, la PrP serait une protéine anti-apoptotique qui contrecarrerait la mort cellulaire médiée par Bax (Bounhar *et al.* 2001).

De façon inattendue, la protéine prion montre une forte affinité avec les acides nucléiques et présente une activité de protéine chaperon très similaire de celle de la protéine nucléocapside du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Gabus *et al.* 2001a, Gabus *et al.* 2001b, Derrington *et al.* 2002) ou encore de la nucléocapside du virus de l'immunodéficience féline (Moscardini *et al.* 2002). Ces données, associées au fait que la PrP^c a été détectée dans le noyau (Rybner *et al.* 2002), pourraient laisser penser que la protéine prion aurait la capacité à participer au métabolisme des acides nucléiques.

Par ailleurs, des études récentes (Moya *et al.* 2005) montrent que la PrP^c est sur-exprimée dans les axones en cours de formation. La PrP alors produite porte l'épitope HNK-1 (motif terminal glucuronyl sulfaté), glycomodification impliquée dans la reconnaissance et

l'adhérence cellulaire. La présence de PrP^c sialylée avec cet épitope sulfaté suggère un rôle de la protéine prion dans la croissance des axones *in vivo*, probablement là en tant que molécule d'adhérence (Moya *et al.* 2005). En effet, la PrP^c interagit de façon spécifique avec le domaine C-terminal de la chaîne $\gamma 1$ de la laminine de la matrice extracellulaire, ce qui suggère un rôle de la PrP dans l'adhérence neuronale et la croissance des neurites (Graner *et al.* 2000). De plus, le précurseur du LRP peut se lier à une protéine prion présente à la surface d'une autre cellule contribuant ainsi à la communication intercellulaire et la survie. Cette interaction est également possible avec la forme scrapie de la protéine prion, ce qui confère à LRP un rôle dans la propagation de l'infection. L'interaction LRP-PrP nécessite la présence de GlycosAminoGlycannes (GAG) et notamment des héparanes sulfates, molécules connues pour intervenir dans l'adhérence cellulaire (Hundt *et al.* 2001).

La protéine prion s'associerait également avec la molécule d'adhésion NCAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule) à la surface des cellules neuronales. Cette interaction régule l'activation de la kinase Fyn, une enzyme impliquée dans la signalisation par NCAM, et favorise la croissance des neurites (Santuccione *et al.* 2005). Ainsi, la protéine prion serait impliquée dans des voies de signalisation.

4. Rôle dans la transduction de signaux

De par sa localisation membranaire et les interactions qu'elle peut établir avec différents partenaires, la PrP est un acteur potentiel de la signalisation cellulaire.

Il a été montré que le rôle de la protéine prion dépend du type cellulaire étudié. Une fonction de signalisation de la protéine prion cellulaire PrP^c a été identifiée dans un modèle de différenciation neuronale 1C11, les cellules précurseur neuro-ectodermiques 1C11 pouvant être induites à se différencier en neurones bioaminergiques. Un couplage de la tyrosine kinase Fyn et de la PrP^c, via la cavéoline I, a été révélé après pontage de la PrP^c à l'aide d'anticorps. Les partenaires, Fyn, cavéoline et PrP^c sont présents dans 1C11 différencié ou non, pourtant l'activation de Fyn n'a lieu que dans les cellules ayant acquis une différenciation bioaminergique complète et pas dans le précurseur 1C11 (Mouillet-Richard *et al.* 2000).

La caractérisation des voies de signalisation recrutées par stimulation de la PrP^c, a par la suite montré un lien entre la PrP^c et la production de radicaux libres générés par activation

de la NADPH oxydase. Ces radicaux sont produits dans la lignée 1C11, quel que soit son état de différenciation mais aussi dans les lignées lymphocytaire T, BW5147 et hypothalamique neuroendocrine, GT1. Des cibles intracellulaires, communes aux cellules neuronales et lymphocytaires, aboutissent à la phosphorylation de la MAPK kinase ERK1/2 impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Les auteurs proposent une fonction ubiquitaire de la PrP^c dans le contrôle de l'équilibre redox cellulaire (Schneider *et al.* 2003). Toutefois, les cascades de signalisation recrutant ces cibles diffèrent dans les cellules neuronales bioaminergiques où les partenaires PrP-cavéoline-Fyn sont nécessaires à la signalisation. La kinase Fyn est alors en amont de 2 voies de signalisations parallèles qui convergent sur ERK1/2, l'une dépendante des ROS et l'autre non. Le contrôle par Fyn de la transduction de signaux dans les neurones bioaminergiques introduit donc une spécificité dépendante du contexte neuronal (Schneider *et al.* 2003).

D'autres études avaient par ailleurs très tôt montré un rôle de la PrP^c dans des cellules du système immunitaire (Cashman *et al.* 1990). Il est notable que l'expression la plus forte de PrP^c après le SNC se rencontre dans les tissus lymphoïdes, où elle est notamment détectée dans les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques folliculaires (FDC) des centres germinaux (McBride *et al.* 1992, Brown *et al.* 1999b, Jeffrey *et al.* 2000, Krebs *et al.* 2006).

Plusieurs éléments sont en effet en faveur d'un rôle de la PrP^c dans la signalisation au sein du système immunitaire. Par exemple, la prolifération des lymphocytes (induite par la concanavaline A) est réduite chez des souris n'exprimant pas la PrP comparativement aux souris sauvages (Mabbott *et al.* 1997) ; la prolifération des lymphocytes T humains (stimulée par des Ig monoclonales anti CD3) est inhibée par des anticorps monoclonaux anti-PrP^c (Li *et al.* 2001). De plus, le taux de protéines PrP^c exprimées à la surface des lymphocytes T humains est augmenté suite à l'activation cellulaire (Mabbott *et al.* 1997) et les cellules T mémoires expriment plus de PrP^c que les cellules T naïves (Li *et al.* 2001).

Très récemment, un rôle de la protéine prion cellulaire dans la transduction de signaux dans la fonction du macrophage, telle que la phagocytose, la migration cellulaire et la production de cytokines a également été mis en évidence (Krebs *et al.* 2006). Le rôle de la PrP dans les macrophages était pressenti, car des macrophages dérivés de souris sauvages (*Prnp*^{+/+}) et *Prnp*^{0/0} ont des capacités phagocytaires différentes (de Almeida *et al.* 2005). Des

analyses réalisées sur des splénocytes de souris KO ont montré que la protéine prion modulerait également la prolifération des cellules T et la production de cytokines (Bainbridge et Walker 2005). Dans les cellules lymphocytaires, la PrP interagirait avec le ganglioside GM3 dans les microdomaines membranaires (Mattei *et al.* 2002), où ces deux composants interviendraient dans un complexe de signalisation multimoléculaire impliqué dans l'activation des cellules T. En effet, la même équipe a suggéré deux années plus tard que la PrP^c jouerait un rôle dans la transduction de signaux dans les lymphocytes T, via les gangliosides (et principalement le GM3) et la molécule transductrice Fyn (Mattei *et al.* 2004).

En dépit du grand nombre d'études sur la fonction de la PrP^c, celle-ci n'est toujours pas clairement définie. Il semble au contraire que la protéine prion normale ne soit pas impliquée dans une seule fonction, mais dans une multitude de fonctions, qui diffèrent selon le contexte cellulaire : l'environnement et les partenaires de la protéine prion auraient donc un rôle prépondérant pour la fonction de la PrP.

E. Propagation de l'agent infectieux dans l'organisme

Bien que seul le SNC soit affecté de façon manifeste par la présence de protéines prion scrapie, l'étude du cheminement de la PrP^{Sc} dans l'organisme est nécessaire 1) pour espérer contrecarrer sa propagation et 2) pour prendre les mesures nécessaires pour éviter toute transmission inter-individus. Par exemple, la présence de la PrP^{Sc} dans le sang est préoccupante d'un point de vue de santé publique, deux cas de transmission par transfusion sanguine ayant déjà été répertoriés (Peden *et al.* 2004, Belay et Schonberger 2005). De même, en dépit de l'absence de réponse immunitaire, de nombreuses données attribuent un rôle crucial du système lymphoréticulaire (SLR) durant la longue période d'incubation, commune à toutes les ESST, qui précède l'atteinte neurologique. Durant cette phase silencieuse, l'agent des ESST s'y réplique.

1. Rôle du système lymphoréticulaire

Exprimée dans le SLR chez tous les mammifères étudiés, la PrP a un niveau d'expression nettement plus faible dans la rate que dans le cerveau : chez la souris le ratio d'expression de la PrP^c dans la rate comparativement au cerveau est de 1/125 (Caughey *et al.* 1988) et est estimé à 1/100 chez le mouton (Moudjou *et al.* 2001). Toutefois, l'accumulation de la PrP^{Sc} est en général détectée dans la rate et les ganglions lymphatiques bien avant de l'être dans le cerveau, en particulier lors d'une injection périphérique. La quantité de protéines PrP^{Sc} accumulées dans la rate reste cependant toujours bien inférieure à celle détectée dans le cerveau (4% par exemple dans des cas de vMCJ, Herzog *et al.* 2005).

La présence de protéines PrP^{Sc} dans la rate varie selon la souche de prion et l'espèce animale étudiées. Par exemple, chez les souris, la PrP^{Sc} est détectée dans la rate et les nœuds lymphatiques chez la majorité des animaux aux stades terminaux, mais également précliniques. De nombreux modèles (différant par les souris utilisées et les souches de tremblante ou du vMCJ inoculées) mettent tous en évidence le rôle remarquable du SLR dans ces maladies. Chez l'homme, la PrP^{Sc} est détectée dans la rate dans tous les cas du vMCJ et a également été retrouvée en quantité moindre dans des cas de MCJ sporadiques et iatrogéniques (Glatzel *et al.* 2003, Herzog *et al.* 2005). La protéine prion scrapie est également détectée de façon routinière dans les rates de moutons atteints de tremblantes naturelle ou expérimentale. Ce n'est que chez les bovins qu'il semble ne pas y avoir d'accumulation de PrP^{Sc} dans la rate (Somerville *et al.* 1997).

L'inoculation de l'agent de l'ESB, chez des modèles de souris adaptées pour l'infection à l'ESB, provoque ou non son accumulation dans la rate. Cette accumulation semble dépendre de la voie d'inoculation (l'infection par voie orale est plus efficace pour infecter la rate) ou des souches utilisées (Herzog *et al.* 2005). Des différents résultats obtenus, il a été supposé que l'agent de l'ESB, s'il est présent dans la rate au stade terminal de la maladie aurait un faible niveau d'accumulation (Daude 2004). Il est cependant troublant que l'infection de moutons par l'ESB conduise dans certains cas à la détection de protéines PrP^{Sc} dans la rate et que les hommes atteints de vMCJ accumulent également la PrP^{Sc} dans la rate. Cette absence aurait-elle un lien avec l'absence du transcrit ayant l'exon1a dans la rate (Horiuchi *et al.* 1997) ou d'autres facteurs spécifiques du bovin sont-ils impliqués ?

Après une infection par voie orale, l'accumulation a lieu dans un premier temps dans les plaques de Peyer, qui constituent alors une voie d'entrée, puis dans la rate. De façon intéressante, une injection intracérébrale de PrP^{Sc} conduit également à leur détection rapide dans la rate (Fraser et Dickinson 1970).

La forme PrP^{Sc} est donc communément détectée très tôt dans la rate lors des maladies à prions naturelles et expérimentales, excepté le cas plus litigieux de l'ESB chez le bétail.

Les titres infectieux de l'agent de l'ESST augmentent rapidement dans la rate les jours suivants l'inoculation de PrP^{Sc} exogènes, alors qu'aucune infectiosité n'est détectée dans le cerveau, ce qui suggère que les protéines prions infectieuses sont synthétisées dans la rate (Daude 2004). Cependant, aucune altération histopathologique n'apparaît dans la rate suite à la réplication et l'accumulation de protéines PrP^{Sc}, contrairement au cerveau. En dehors d'une réduction de taille et de poids, aucun autre dommage n'est en effet observé dans les rates de souris, hamster ou mouton atteints d'ESST (Fraser et Dickinson 1970, Ye et Carp 1995).

Le rôle majeur de la rate dans la propagation des ESST infectieuses a été mis en évidence lors de nombreuses expériences, en particulier de splénectomie (Fraser et Dickinson 1970) ou encore chez des souris atteintes d'asplénie génétique. Dans ces deux cas, les périodes d'incubation sont augmentées. De même, des souris immunodéficientes n'ayant ni lymphocytes B ni lymphocytes T matures ne peuvent pas développer la maladie, mais y deviennent sensibles après restitution de splénocytes normaux.

Le rôle de la rate et des organes lymphoïdes est donc désormais reconnu, mais les cellules incriminées ne sont pas encore nettement définies. Toutefois, les FDC différenciées jouent un rôle certain dans la propagation et la réplication de la PrP^{Sc} (Mohan *et al.* 2005, Ierna *et al.* 2006). Ces cellules, qui expriment fortement la PrP^c dès le 10^{ème} jour post natal (avant ce stade, les souris sont résistantes à l'infection, Ierna *et al.* 2006), sont des cellules accessoires présentes uniquement dans les centres germinaux, où elles piègent et retiennent les antigènes sous la forme native et complexée à des anticorps et au complément. Les récepteurs de surface des FDC leur permettraient de capturer les prions (Klein *et al.* 2001), une interaction cellulaire similaire à celle décrite pour la rétention des virus HIV (Joling *et al.* 1993). Il est également possible que la PrP agisse comme un auto-ligand (Kaneko *et al.* 1995, Huang et MacPherson 2004). Quant aux lymphocytes B, leur présence serait nécessaire pour induire une maturation fonctionnelle des FDC. Etant donné l'association forte entre les FDC

et les lymphocytes B dont les membranes sont finement liées, la PrP pourrait facilement circuler entre les macrophages, les cellules B et les FDC (Daude 2004).

Les macrophages pourraient alors avoir un double rôle : éliminer des agents infectieux, mais également intervenir dans leur propagation (Prinz *et al.* 2002). Les macrophages des follicules lymphoïdes contiennent ainsi de la PrP^{Sc} aussi bien dans les premiers stades d'une ESST que lors des stades terminaux (Forloni, 2004). Tout comme les macrophages, les cellules dendritiques interviendraient de façon ambiguë lors d'une infection. Grâce à leurs propriétés de migration, les cellules dendritiques pourraient transporter les prions scrapie du site d'exposition (comme le tractus gastro-intestinal, suite à une contamination par voie orale) aux tissus lymphoïdes, voir jusqu'à proximité des extrémités neuronales (Forloni, 2004). Bien que l'absence de cellules dendritiques n'affecte apparemment pas l'infectiosité de la tremblante (Oldstone *et al.* 2002), il est néanmoins possible que ces cellules accumulent la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoïdes en l'absence de FDC (Klein *et al.* 2001). Les cellules M (cellules épithéliales membranaires), déjà incriminées dans l'entrée de pathogènes par transport transépithélial pourrait y avoir un rôle (Wolf et Bye 1984, Owen *et al.* 1986). Les exosomes pourraient également être des vecteurs de l'infection, notamment par le sang (Robertson *et al.* 2006).

Le lymphotropisme permettrait à l'agent infectieux de subir une étape de réplication primaire efficace dans les tissus du SLR ce qui permettrait d'obtenir un taux infectieux supérieur. La PrP^{Sc} pourrait alors être soit transmise aux terminaisons nerveuses soit entrer dans le sang, conduisant à la neuro-invasion (Herzog *et al.* 2005).

2. Propagation jusqu'au système nerveux central

La longue période d'incubation observée suite à une inoculation périphérique pourrait correspondre, au moins pour partie, au temps mis par les prions scrapie pour atteindre l'organe cible de l'infection, le SNC. Ce processus, par lequel la PrP^{Sc} regagne le SNC est généralement appelé phase de neuroinvasion. L'intervalle de temps entre la réplication du prion dans les organes lymphoïdes (rate) et l'atteinte du SNC serait en adéquation avec une propagation via le système nerveux périphérique (SNP) (Haik *et al.* 2004). Bien que controversé, le terme de synapse neuro-immunologique a été proposé comme interface entre

le système immunitaire et les neurones du système sympathique (Tournier et Hellmann 2003, Haik *et al.* 2004). Une voie possible de propagation est intra-axonale, des organes lymphoïdes jusqu'à la moelle épinière thoracique, site d'entrée des nerfs sympathiques dans le SNC vers le cerveau (Daude 2004). Les nerfs sympathiques semblent en effet être de bons candidats pour la propagation de la PrP^{Sc}, car leur suppression retarde ou empêche le développement de la maladie (Glatzel *et al.* 2001).

IV. Rôle de la glycosylation dans la physiologie et la pathologie du prion

Il semble de plus en plus clair que des facteurs cellulaires influeraient sur la physiologie et la pathologie du prion. La glycosylation cellulaire, modification co- et post-traductionnelle des protéines et lipides, pourrait être le ou l'un de ces facteurs. La glycosylation est un processus régulé, spécifique de chaque espèce et, pour une espèce donnée, de chaque type cellulaire. Les nombreuses structures glycaniques possibles contribuent à la variabilité phénotypique.

Sous le terme générique de glycosylation cellulaire se distinguent divers types de glycosylation, dont la plus connue est la *N*-glycosylation des glycoprotéines. Les *N*-glycannes, liés à l'amide de la chaîne latérale d'une Asn présente dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X est un aa autre que la proline ou l'aspartate), peuvent être subdivisés en trois groupes distincts : les glycannes riches en mannoses, les glycannes dits hybrides et les glycannes complexes. Ces derniers peuvent être mono-, bi-, tri- ou tétra-antennés.

La *O*-glycosylation constitue un deuxième type de glycosylation des protéines. Les glycannes *O*-liés sont fixés au groupe hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine (ou d'une hydroxylysine ou une hydroxyproline dans le cas des collagènes), mais les signaux qui déterminent les sites de *O*-glycosylation ne sont pas aussi bien connus que pour la *N*-glycosylation. Les oligosaccharides *O*-liés sont généralement courts (un à quatre sucres), bien que ceux des mucines peuvent comporter jusqu'à 15 oses.

Les protéoglycannes de la matrice extracellulaire présentent également des carbohydrates *O*-liés. Ces derniers sont formés de GAG (répétitions d'unités disaccharidiques sur lesquelles l'un ou les deux sucres sont sulfatés) liés de façon covalente à un cœur protéique.

Par ailleurs, l'ancrage membranaire de nombreuses protéines se fait grâce à une ancre lipidique glycosylée : le GPI.

Ainsi, les protéines ne sont donc pas les seules structures à pouvoir être glycosylées, comme en témoigne également l'existence de glycolipides, tels que les gangliosides.

A. Les glycosylations de la PrP

1. La PrP, une protéine *N*-glycosylée

Durant sa synthèse, les 22 acides aminés constituant le peptide signal N-terminal de la PrP naissante sont clivés et des *N*-glycannes riches en mannoses sont greffés non obligatoirement sur les Asn 181 et 197 (numérotation humaine). A ce stade, les glycannes présents sur la chaîne polypeptidique en cours d'élongation sont homogènes et relativement simples (Glc₃-Man₉-GlcNAc₂). Après maturation dans le RE puis l'appareil de Golgi, les glycannes de la PrP sont de type complexe et très hétérogènes. En effet, l'analyse des *N*-glycannes de la PrP^c a mis en évidence une grande variabilité des *N*-glycannes des deux sites de la PrP^c, avec plus de 50 structures glycaniques différentes recensées (Endo *et al.* 1989, Rudd *et al.* 1999).

De plus, les deux sites de *N*-glycosylation de la PrP peuvent être occupés de façon variable, ce qui conduit à la présence de trois glycoformes de la protéine prion mature : la forme biglycosylée (d'environ 30 à 35 kDa) majoritaire (70%), une forme monoglycosylée, sur l'une ou l'autre des Asn (d'environ 26 à 30 kDa) et présente à 25% et la forme non glycosylée (de 24 kDa) habituellement largement minoritaire (5%) (Capellari *et al.* 1999). Une forme hyper-glycosylée de 35-38 kDa, qui serait due à une proportion accrue de glycannes tri- et tétra-antennés, a été observée dans des cultures cellulaires (Monnet *et al.* 2003). Cette forme hyperglycosylée pourrait être l'isoforme de 38 kDa décrite comme

prédominante dans le transport axonal antérograde rapide (Rodolfo *et al.* 1999). Par ailleurs, une analyse des *N*-glycannes présents sur chaque site montre que l'Asn 197 contient une proportion plus importante de glycannes tri- et tétra-antennés que l'Asn 181 (Stimson *et al.* 1999).

Les glycoformes seraient différemment exprimés en réponse à des stimuli biologiques, tels que la différenciation, la croissance, la densité cellulaire et le type cellulaire (ou les régions tissulaires observées) et auraient des propriétés physiologiques distinctes en terme de trafic cellulaire ou d'interactions avec des partenaires (Monnet *et al.* 2003, Moya *et al.* 2005).

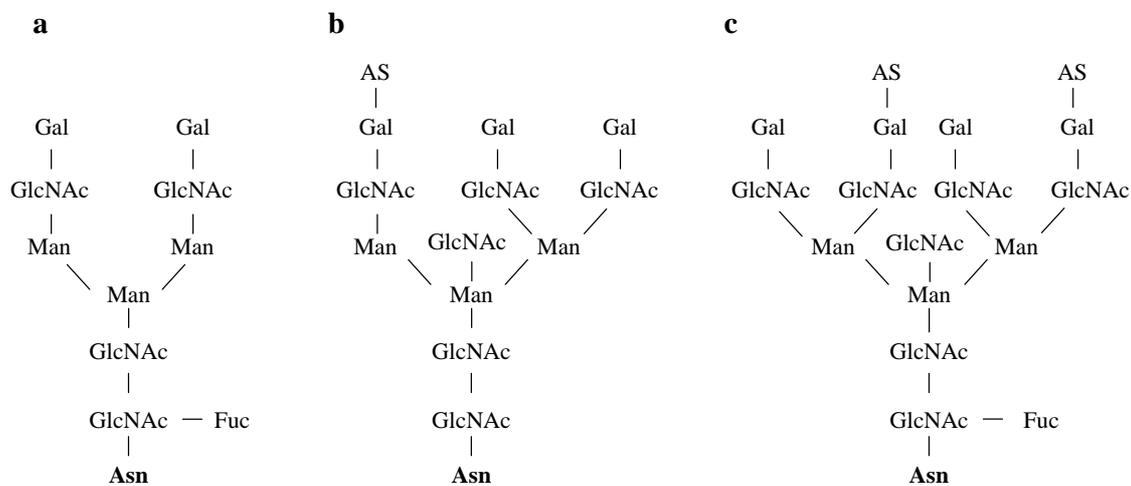


Figure 10 : Exemples de glycannes bi- (a), tri- (b) et tétra- (c) antennés présents sur les Asn 181 et 197 de la PrP. La majorité des glycannes présente un GlcNAc à la bissection (représenté pour les glycannes tri- et tétra-antennés).

La PrP^{Sc}, également di-, mono-, ou non-glycosylée, présente le même pool de *N*-glycannes que la PrP^C (Endo *et al.* 1989, Rudd *et al.* 1999). Cependant, la forme scrapie a globalement plus de formes tri- et tétra-antennées que la forme cellulaire, ce qui pourrait être attribuable à une diminution d'activité d'une enzyme, la *N*-acétylglucosaminyltransférase III, Mgat3 (Rudd *et al.* 1999, Rudd *et al.* 2001). Cette enzyme catalyse l'addition d'un GlcNAc à la bissection du cœur tri-mannoses des *N*-glycannes. Par sa présence, le GlcNAc de la bissection inhiberait l'action ultérieure des GlcNAc-transférases responsables de l'augmentation du nombre d'antennes. Une moindre présence de GlcNAc à la bissection, due

par exemple à une diminution de l'activité de Mgat3, conduirait en effet à une augmentation du taux d'antennage.

La modification de la distribution des *N*-glycannes suggère que la machinerie de glycosylation serait perturbée lors de la pathologie. Cette information a été appuyée par la description, au cours d'une tremblante expérimentale chez la souris, d'un changement dans la distribution et le profil de glycosylation de la protéine prion (Russelakis-Carneiro *et al.* 2002). Tout comme dans le cas d'autres maladies neurodégénératives (telle que la maladie d'Alzheimer, Maguire et Breen 1995, Guevara *et al.* 1998, Lefebvre *et al.* 2005), les mécanismes de la glycosylation seraient donc altérés lors d'une maladie à prions.

2. La PrP, une protéine *O*-glycosylée ?

La PrP présente de nombreux sites potentiels de *O*-glycosylation, cependant, aucun *O*-glycane n'a été décrit à ce jour sur la PrP^c ou la PrP^{Sc}. Néanmoins, il n'est pas exclu qu'une fraction minime des protéines prion soit *O*-glycosylée, en particulier par le greffage d'un seul sucre, comme le *O*-GlcNAc (liaison réalisée par l'enzyme OGT). La présence d'un *O*-GlcNAc sur des protéines cytosoliques et nucléaires est un élément régulateur fondamental, notamment par sa capacité à contrecarrer la phosphorylation et pourrait être un signal de résidence nucléaire (Guinez *et al.* 2005). De façon surprenante, bien que l'adressage principal de PrP^c soit la membrane plasmique, deux lectines nucléaires, CBP70 et la galectine 3, reconnaissant la *N*-acétylglucosamine et le galactose respectivement, ont été colocalisées avec la protéine prion dans le noyau (Rybner *et al.* 2002). La capacité de ces lectines à reconnaître des *O*-glycannes n'est toutefois pas démontrée. La localisation nucléaire de la protéine prion s'expliquerait par la présence de deux signaux d'adressage au noyau (NLS : Nuclear Localization signal) identifiés dans la partie N-terminale de la PrP (Gu *et al.* 2003). Il a été montré que des protéines prions mutées ayant un codon stop à l'acide aminé 145 ou 160 s'accumulent dans le noyau, dans des modèles cellulaires de maladies à prions familiales (Lorenz *et al.* 2002). La translocation de la PrP dans le noyau est bloquée si les protéines tronquées comportent un ou deux *N*-glycane(s) (Gu *et al.* 2003). Comment expliquer alors la détection par des lectines de protéines PrP dans le noyau ?

Par ailleurs, la *O*-glycosylation est très abondante dans les terminaisons nerveuses, sur des protéines impliquées dans la transduction de signaux (Cole et Hart 2001). De nombreuses protéines neuronales sont modifiées par l'ajout de *O*-GlcNAc et certaines d'entre elles, dont la protéine Tau ou l'APP (Protéine Précurseur β amyloïde) sont impliquées dans des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) (Lefebvre *et al.* 2005). Une *O*-glycosylation de la PrP pourrait donc être envisagée.

Malgré l'absence de preuves d'une *O*-glycosylation, des expériences sur l'implication de *O*-GalNAc sur des peptides représentant la protéine prion (aa 108-144) ont été entreprises (Chen *et al.* 2002). Ces études montrent que la présence d'un *O*-GalNAc sur la Ser135 entraîne une suppression de la formation de plaques amyloïdes, tandis que la même addition sur la Ser132 a l'effet opposé. Cet effet majeur de la *O*-glycosylation est spécifique du *O*-GalNAc, et n'est pas observé si un autre sucre (GlcNAc) est greffé sur ces mêmes sites (Chen *et al.* 2002).

La présence d'une *O*-glycosylation sur une partie du pool des PrP n'est donc pas exclue et pourrait avoir des conséquences importantes sur sa localisation cellulaire (et donc sa fonction ?) et sur sa capacité à se transconformer.

3. La PrP, une protéine glypiée

Rapidement après la translocation complète de la protéine prion dans la lumière du RE, une ancre GPI est transférée sur la sérine 231, après clivage du peptide signal C-terminal. L'ancre GPI contient un cœur conservé qui consiste en une éthanoline phosphate (EtN-P) liée à l'extrémité C-terminale de la protéine, en trois résidus mannoses, une glucosamine et un phosphatidylinositol (Bate et Williams 2004) (figure 11, page suivante). Plusieurs variations de cette structure sont observées pour le GPI de la PrP^c, qui contient en effet de grandes quantités de galactoses, mannoses et acides sialiques, 30% des GPI de PrP^c étant ainsi sialylés (figure 11, Stahl *et al.* 1992, Baldwin 2005). La protéine prion n'est pas l'unique protéine à avoir une ancre GPI sialylée (Brewis *et al.* 1995), mais ce phénomène est rare et son implication inconnue (Baldwin 2005).

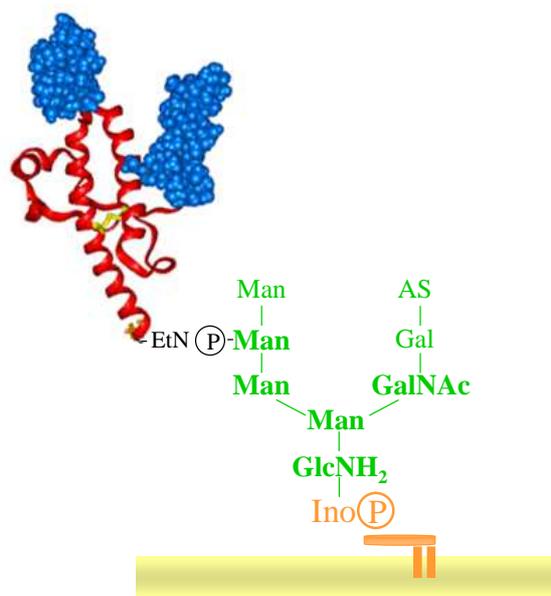


Figure 11 : Exemple de composition glycannique de l'ancre GPI de la protéine prion. Les sucres constitutifs des GPI de toutes les PrP sont représentés en gras (d'après Baldwin 2005).

B. Influence de la glycosylation sur la PrP

1. Glycosylation et contrôle du repliement

En général, la glycosylation est connue pour orienter le repliement des protéines et empêcher l'agrégation d'intermédiaires du repliement.

L'effet indirect le plus important des *N*-glycannes sur le repliement est l'implication du système de protéines chaperon présent dans le RE, appelé cycle calnexine-calréticuline. Calnexine (Canx) et calréticuline (Calr), en interaction possible avec la chaperonne ERp57 (une isomérase disulfide également appelée Grp58), interagissent avec les glycannes de la glycoprotéine après action des glucosidases I et II : le glycanne est alors riche en mannose ($\text{Glc}_1\text{Man}_{9,6}\text{GlcNAc}_2$). Même si ce système n'est pas absolument nécessaire pour le repliement de la protéine, les lectines retiennent les conformères mal repliés dans le RE et servent ainsi de contrôle-qualité qui régule le transport du RE à l'appareil de Golgi et probablement aussi les processus de dégradation.

Il semble que la calréticuline et la calnexine puissent également interagir avec des chaînes polypeptidiques non glycosylées (Helenius et Aebi 2001). Cependant, seule la protéine prion glycosylée a été coimmunoprécipitée avec la calnexine, la calréticuline, ERp57 et BIP (Capellari *et al.* 1999, Jin *et al.* 2000, Hetz *et al.* 2005), ce qui semble indiquer que les sucres et les protéines chaperon du RE ont un rôle dans la conformation de la PrP.

Les protéines ayant acquis leur repliement correct sont dirigées vers l'appareil de Golgi, tandis que les protéines prion mal conformées (sauvages ou mutantes) sont normalement éliminées de façon sélective par le système de dégradation associé au RE (ERAD). Après rétrotransport de la glycoprotéine dans le cytosol où elle subit une ubiquitination, la protéine mal conformée est dégradée par le protéasome (Yedidia *et al.* 2001).

Pour être dégradées par le protéasome, les protéines doivent obligatoirement être solubles dans le cytosol. Cependant les protéines prion cellulaires mal repliées qui échappent au contrôle-qualité ne peuvent rejoindre la membrane plasmique et s'accumulent dans le cytosol sous forme d'agrégats insolubles résistants au protéasome (Singh *et al.* 1997). La présence d'inhibiteurs du protéasome ou un excès de substrats du protéasome produisent une quantité accrue de PrP^c cytosoliques, qui s'accumulent et s'agrègent et sont alors responsables d'une neurotoxicité typique des maladies à prions (Ma et Lindquist 2002, Ma *et al.* 2002, Fornai *et al.* 2006). 10% des protéines prions nouvellement synthétisées seraient ainsi dirigées dans le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome (Yedidia *et al.* 2001). Les protéines prion cytosoliques ont une masse de 26 kDa et sont donc non glycosylées, ce qui permet plusieurs hypothèses : soit (1) ces protéines sont passées par le RE mais n'ont pas subies de *N*-glycosylation ou ont été déglycosylées suite à la rétrotranslocation dans le cytosol, soit (2) ces protéines n'ont pu être dirigées vers le RE.

L'appareil de Golgi, où les *N*-glycannes subissent une maturation, pourrait être un second site de contrôle. Les protéines prion possédant une conformation anormale seraient redirigées vers les lysosomes pour y être dégradées (Gilch *et al.* 2001).

Par ailleurs, un lien est établi entre le statut oxydoréducteur de la cellule où la PrP est produite et donc la formation du pont disulfure (Cys 179-Cys 214), le degré de glycosylation de la protéine prion et son trafic intracellulaire. Quand la formation du pont disulfure est empêchée (par ajout de DTT ou par mutation des Cys), toutes les protéines prion produites

sont diglycosylées et atteignent la surface cellulaire normalement. Au contraire, des conditions favorisant la formation du pont disulfure empêche la *N*-glycosylation de la protéine, ce qui pourrait augmenter le risque de développer une maladie à prions (Capellari *et al.* 1999).

2. Influence de la glycosylation sur la conformation

Afin de connaître le rôle possible de la *N*-glycosylation sur la conformation de la protéine prion, des simulations bio-informatiques de l'impact du greffage de glycannes tétra-antennés et partiellement sialylés sur la structuration de la protéine ont été réalisées (Zuegg et Gready 2000). Les résultats suggèrent que la glycosylation de l'Asn 197 a un rôle stabilisateur de la protéine (par réduction de la mobilité des molécules d'eau), alors que le glycanne de l'Asn 181, qui est présent dans une structure secondaire déjà stable aurait un rôle plus fonctionnel (Zuegg et Gready 2000). Ces structures glycaniques créent une charge électrostatique négative qui couvre la majorité de la région C-terminale de la PrP, ce qui pourrait avoir une incidence sur les interactions avec d'autres facteurs.

Le rôle de la *N*-glycosylation a été également très étudié *in vitro*. L'importance de la glycosylation dans le maintien de la structure de la PrP a ainsi été montrée sur le fragment 179-195. Ce dernier a une tendance amoindrie à former des fibrilles quand il est glycosylé, en particulier sur l'Asn 181 (Bosques et Imperiali 2003). Le blocage de la *N*-glycosylation par un traitement à la tunicamycine ou par mutations ponctuelles dans des cultures cellulaires provoque la formation spontanée de protéines prion présentant une résistance partielle à la digestion par des protéinases et une insolubilité (Lehmann et Harris 1997). Des études récentes montrent également que les mutations T183A et F198S, qui affectent chacune un site de *N*-glycosylation et sont associées à des formes familiales d'ESST, conduisent toutes deux à un mauvais repliement et à une conformation partiellement résistante à la PK (Kiachopoulos *et al.* 2005). Cependant, ces effets pourraient être liés à la déstabilisation de la région C-terminale provoquée par la/les mutation(s) plutôt que par l'abolition des sites de *N*-glycosylation (Riek *et al.* 1998, Kiachopoulos *et al.* 2005). Ainsi, d'autres mutations (correspondant à N181T et N197T chez l'homme) qui empêchent également la *N*-glycosylation à l'un ou l'autre ou sur les deux sites ne conduisent pas aux mêmes résultats (Cancellotti *et al.* 2005).

Des expériences de conversion acellulaire confortent la notion que les molécules de PrP non glycosylées seraient un substrat préférentiel de la forme scrapie de la PrP (Kocisko *et al.* 1994, Bossers *et al.* 1997). De façon intéressante, les formes non glycosylées des protéines prions ovines ARR, dites résistantes peuvent, dans une certaine mesure, être converties (Bossers *et al.* 1997). De plus, la troncature de la partie N-terminale limite la conversion des molécules glycosylées, mais pas de celles non glycosylées (Lawson *et al.* 2001) et la PrP^c non glycosylée facilite la conversion entre espèces (Lawson *et al.* 2001). Il semble donc que les formes non glycosylées aient une tendance plus forte à la conversion en PrP^{Sc} et à l'agrégation (Taraboulos *et al.* 1990, Winklhofer *et al.* 2003a). L'absence de glycosylation n'est cependant pas suffisante pour provoquer une transconformation, puisque des souris transgéniques présentant des protéines prions exclusivement non glycosylées (ou mono-glycosylées) ne génèrent pas spontanément des protéines prion de type PrP^{Sc} (Wiseman *et al.* 2005).

Les raisons pour lesquelles les PrP non glycosylées favoriseraient la conversion ne sont pas bien connues ; une moindre stabilité, des interactions facilitées avec la PrP^{Sc} ou d'autres facteurs cellulaires sont toutefois des hypothèses avancées (Ermonval *et al.* 2003). Les études réalisées par Moudjou *et al.* sur le mouton montrent que le 1^{er} glycanne (porté par l'Asn 184 chez le mouton soit l'Asn 181 humaine) a une influence certaine sur l'accessibilité de l'Asn 171 (acide aminé 168 chez l'homme), connu pour être un déterminant majeur de la susceptibilité chez le mouton. Cet acide aminé fait partie d'un épitope qui pourrait interagir avec un facteur cellulaire et intervenir dans la conversion (Moudjou *et al.* 2004).

Des études récentes montrent que la PrP^c de cerveau de souris non infectée comme infectée est majoritairement présente sous forme diglycosylée, alors que la PrP^{Sc} est à un taux élevé sous forme non glycosylée (Muller *et al.* 2005). De plus, selon les ESST et les souches de prions, les taux des différents glycoformes de PrP^{Sc} varient fortement. Comment expliquer de telles variations des proportions des formes di- mono- et non glycosylées de PrP^{Sc} alors que la PrP^c est principalement di-glycosylée ?

3. La glycosylation dans le typage des souches

Les souches de prions, qui se propagent au sein d'hôtes génétiquement identiques et qui conduisent à des caractéristiques cliniques et pathologiques différentes (Schoch *et al.* 2006), présentent en effet des taux de PrP di- mono- et non-glycosylées très variables d'une souche à l'autre mais identiques pour une même souche. De ce fait, les quantités relatives de chaque glycoforme associé à la taille des fragments de la PrP après digestion à la protéinase K permettent de différencier les souches d'ESST (Ermonval *et al.* 2003). L'analyse de ces deux critères majeurs est ainsi l'une des principales méthodes de diagnostic différentiel des ESST humaines. Bien qu'il existe des disparités et que la situation soit en fait plus complexe (Cardone *et al.* 1999, Thomzig *et al.* 2004, Ironside *et al.* 2005, Schoch *et al.* 2006), les souches de MCJ peuvent être classées en 4 types, qui se distinguent après migration des extraits sur gel SDS-PAGE. Cette classification a contribué à l'établissement d'une corrélation entre le vMCJ et l'ESB, et est également utilisée dans l'identification de tremblante atypique du mouton (issus d'ESB ?).

Dans le but d'expliquer les variations du niveau de glycosylation des PrP^{Sc} selon les souches et les différentes ESST, plusieurs modèles sont proposés (Somerville 1999, Vorberg et Priola 2002, Somerville *et al.* 2005). Le modèle biosynthétique stipule que les protéines prion destinées à constituer la fraction PrP^{Sc} suivent une voie de biosynthèse séparée ou modifiée comparativement à celle suivie par PrP^c (DeArmond *et al.* 1997). Une seconde hypothèse, dite modèle de sélection postule que la PrP susceptible de se transconformer est sélectionnée dans un pool de PrP matures (DeArmond *et al.* 1999, Rudd *et al.* 1999, Pan *et al.* 2001). Selon le dernier modèle, appelé modèle de dégradation, les glycanes de la PrP^{Sc} sont supprimés durant sa conversion à partir d'une PrP^c mature.

Les souches se distinguent également par des différences de taille de la PrP^{res} non glycosylée après digestion par la protéinase K. Ces variations sont dues à une diversité de conformation, qui permet un accès différent des sites de clivage. Somerville *et al.* proposent, selon le modèle biosynthétique, que la conformation des précurseurs des PrP^{Sc} est déterminée durant la maturation post-traductionnelle de la protéine, le repliement aberrant dans le RE affectant alors la glycosylation (Somerville *et al.* 2005). Les études de Tanaka *et al.* sur la levure suggèrent également que les différences de conformation des protéines infectieuses déterminent la variabilité des souches de prion (Tanaka *et al.* 2004).

4. Ancrage glycosylé, le GPI

Grâce à la flexibilité de l'ancrage GPI, au moins deux orientations de la protéine prion glypiée vis-à-vis de la membrane sont possibles (figure 12, Rudd *et al.* 1999, Zuegg et Gready 2000), ce qui lui permettrait notamment d'interagir avec différents partenaires à la membrane plasmique.

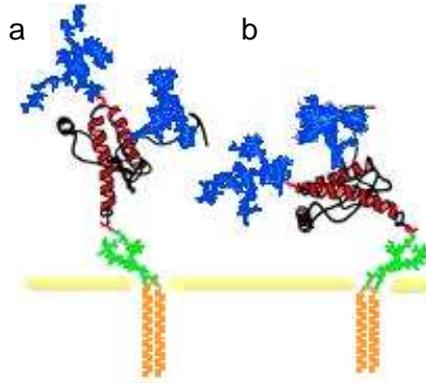


Figure 12 : La flexibilité de l'ancrage GPI permet deux orientations de la PrP vis-à-vis de la membrane, la première où la protéine est éloignée de la membrane, la seconde où elle est rapprochée. Les *N*-glycannes de la PrP^c sont représentés en bleu, la protéine en rouge, la partie glycanne de l'ancrage GPI en vert et la partie lipidique de l'ancrage en jaune-orangé (d'après Rudd *et al.* 1999).

Plusieurs éléments suggèrent que l'ancrage GPI pourrait jouer un rôle dans la conversion et la pathogénicité de la PrP. Tout d'abord, les protéines prion PrP^c et PrP^{Sc}, bien que glypiées, diffèrent par leur sensibilité au clivage par la phospholipase C, sans toutefois que les mécanismes sous-jacents soient identifiés.

De plus, une déstabilisation de la région globulaire de la PrP provoquée par exemple par les mutations T183A et F198S chez l'homme (mutations qui suppriment chacune un site consensus de *N*-glycosylation) ou par une déstabilisation de l'hélice $\alpha 1$, empêche la fixation de l'ancrage GPI et la maturation des *N*-glycannes en glycannes de type complexe. Cette maturation ne peut en effet avoir lieu que si la PrP est ancrée à la membrane (Winklhofer *et al.* 2003b, Kiachopoulos *et al.* 2005). Cependant, cet ancrage ne doit pas nécessairement être une ancre GPI, puisqu'un domaine hydrophobe placé dans la région C-terminale permet également la glycosylation (Walmsley *et al.* 2001).

L'association étroite entre *N*-glycosylation et ancrage GPI est également mise en évidence par l'existence des deux formes transmembranaires ^{Ctm}PrP et ^{Ntm}PrP (figure 5, page 39). La forme ^{Ctm}PrP contient une ancre GPI et peut être glycosylée, alors que la forme ^{Ntm}PrP, non glypiée, ne présente jamais de *N*-glycannes (Walmsley *et al.* 2001, Walmsley et Hooper 2003). La forme ^{Ctm}PrP, détectée *in vivo*, est normalement retenue dans de RE et dégradée par le protéasome (Stewart *et al.* 2001), mais s'accumule dans certaines ESST.

Un argument de plus en faveur d'une implication de l'ancrage GPI dans les processus de conversion est que l'absence d'ancres GPI dans des cellules infectées réduit les taux de conversion (Rogers *et al.* 1993). Néanmoins, ces formes solubles peuvent être converties en forme PrP^{Sc} *in vitro* (Lawson *et al.* 2001). Des souris transgéniques n'exprimant pas de PrP glypiée ne développent pas de signes cliniques après infection, bien que leur cerveau contienne des plaques de PrP^{Sc} (Chesebro *et al.* 2005). De plus, l'expression combinée de protéines prion sans ancre et ancrée par un GPI accélère l'évolution de la tremblante (Chesebro *et al.* 2005), ce qui suggère là encore un rôle de l'ancrage dans la pathogénie des maladies à prions.

Enfin, un rôle fondamental de l'ancrage GPI est qu'il dirige la PrP dans des microdomaines membranaires spécifiques, sites privilégiés de conversion : les rafts.

5. Interaction de la PrP avec des partenaires glycosylés

Les protéines prion PrP^C et PrP^{Sc} sont généralement associées aux rafts (Naslavsky *et al.* 1997). Bien que de nombreuses protéines glypiées soient, comme la protéine prion, associées aux rafts, l'association de la PrP dans ces microdomaines présente de nombreuses particularités. Tout d'abord, la localisation de la protéine prion dans les rafts s'opère plus précocement dans le trafic cellulaire que pour les autres protéines glypiées : la PrP^C est présente dans des rafts dès le RE, alors qu'elle est encore immature (Sarnataro *et al.* 2004). Cette association serait même nécessaire au repliement correct des protéines prion (Sarnataro *et al.* 2004). De plus, contrairement aux autres protéines glypiées, l'association de la PrP^C dans les rafts serait réalisée non pas uniquement par son ancre GPI mais également par sa région N-terminale (Walmsley *et al.* 2003), ce qui expliquerait que la PrP^C puisse interagir avec des membranes de façon indépendante du GPI.

Par ailleurs, la composition des rafts où est concentrée la protéine prion est singulière. Comparées aux microdomaines où sont principalement présentes les protéines glypiées Thy1 (protéines glypiées majeures des neurones matures), les rafts de PrP, étudiés dans des cultures primaires de neurones, ont des lipides avec des chaînes plus longues et contiennent 5 fois plus d'hexosylceramide (probablement du glucosylceramide, précurseur des gangliosides, Brugger *et al.* 2004). La présence de nombreux glycolipides dans les rafts contenant la PrP est intéressante car leurs carbohydrates influent sur leurs propriétés membranaires et leur interaction avec les protéines glypiées ; les glycolipides protégeraient la PrP^c de la conversion conformationnelle en PrP^{Sc} (Brugger *et al.* 2004). Les rafts semblent donc jouer un rôle protecteur de la PrP^c, en stabilisant sa structure (Sanghera et Pinheiro 2002), potentiellement grâce au domaine de liaison de la PrP aux sphingolipides, nommé domaine V3-like (Mahfoud *et al.* 2002).

Le rôle des rafts est toutefois ambivalent, car de nombreux éléments suggèrent que la localisation de la PrP dans les rafts est primordiale pour la conversion. Ainsi, une déplétion en cholestérol diminue la formation de protéines PrP^{Sc} dans des cellules de neuroblastomes infectées (Taraboulos *et al.* 1995). Le même groupe a montré qu'au contraire, une déplétion en sphingolipides facilite la conversion (Naslavsky *et al.* 1999). Ces résultats, qui semblent contradictoires, ont très récemment trouvé une explication par les travaux de Gilch, qui montrent que la déplétion en cholestérol empêche la PrP d'accéder à la surface cellulaire (Gilch *et al.* 2006). De plus, des formes transmembranaires recombinantes de PrP^c localisées hors des rafts ne servent pas de substrats à la formation des PrP^{Sc} (Taraboulos *et al.* 1995). D'autre part, la présence de sphingolipides, galactosylcéramide et sphingomyéline, éléments constitutifs des rafts, dans les agrégats de prions scrapie identifie là encore les rafts comme lieu de conversion (Klein *et al.* 1998).

Au sein de la membrane plasmique, la protéine prion peut également interagir avec d'autres glycoconjugués, présents dans la matrice extracellulaire, tels que les GAG (Ben-Zaken *et al.* 2003). Parmi ces structures glycosylées, les héparanes sulfates ont une double fonction : ils ont un rôle dans les processus d'adhérence cellulaire, via la liaison qu'ils établissent entre la PrP (par les trois sites d'interaction de PrP avec les GAG : 23-35, 53-93 et 110-128, Warner *et al.* 2002) et le LRP. Les héparanes sulfates ont également une influence sur la capacité de la protéine prion à se transconformer et sont d'ailleurs associés aux plaques amyloïdes des maladies à prions (et de la maladie d'Alzheimer). De plus, leur métabolisme

est altéré durant une ESST (Papakonstantinou *et al.* 1999, Barret *et al.* 2005). Enfin, la présence de GAG faciliterait l'incorporation par la cellule de PrP^{Sc} exogènes, impliquant là encore ces composés glycosylés dans les pathologies à prions (Hijazi *et al.* 2005).

En raison de l'environnement lipidique, glycosylé et donc chargé qu'ils créent, les rafts où sont concentrées les protéines prion semblent jouer un rôle majeur non seulement pour la fonction de la PrP^c, mais également pour sa conversion et sa propagation.

Les rafts pourraient être des sites importants de la propagation initiale intercellulaire de la PrP^{Sc}. Des expériences en milieu acellulaire ont montré que la conversion de la PrP^c associée aux membranes nécessite l'insertion contiguë de protéines PrP^{Sc} dans la membranaire cellulaire (Eberl *et al.* 2004), peut-être par un échange de particules membranaires ou via des processus liés au GPI (Baron *et al.* 2002, Collins *et al.* 2004). La présence de PrP scrapie à la surface des cellules infectées pourrait, par contacts de membrane à membrane déclencher les premiers évènements de conversion à la surface des cellules cibles. L'infection pourrait alors progresser de proche en proche entre cellules adjacentes (Porto-Carreiro *et al.* 2005). Les exosomes pourraient également intervenir dans ces processus de propagation intercellulaire (Fevrier *et al.* 2005, Robertson *et al.* 2006). En effet, les deux isoformes de la PrP sont associées à de petites vésicules possédant les caractéristiques des exosomes. Ces vésicules de 50 à 90 nm de diamètre, d'origine endosomique, sont sécrétées lors de la fusion des endosomes tardifs par certaines cellules hématopoïétiques (lymphocytes B et T, cellules dendritiques...) et non hématopoïétiques (cellules épithéliales intestinales par exemple) (Fevrier *et al.* 2005, Porto-Carreiro *et al.* 2005), et il est connu que la PrP subit des cycles d'endocytose dans son cycle de vie.

Résultats

Bien que la protéine prion soit indiscutablement au cœur des pathologies à prions, plusieurs éléments suggèrent l'implication de facteurs supplémentaires. La difficulté de mise en évidence de l'hypothèse de la protéine seule, la conversion facilitée en présence d'éléments endogènes font partie des données qui laissent fortement présager un rôle de certains constituants de l'hôte. Nous faisons l'hypothèse que la glycosylation de la protéine prion elle-même ou de l'un de ses partenaires participe directement à sa transconformation et à la propagation de la PrP^{Sc}. En effet, la protéine prion est *N*-glycosylée, et cette *N*-glycosylation influe sur son repliement et sa capacité à se transconformer. Les protéines prion cellulaires et scrapie ne présentent pas le même niveau de *N*-glycosylation : la protéine prion cellulaire est très majoritairement di-glycosylée, alors que le taux de glycosylation de la PrP^{Sc} est liée à la souche infectante. De plus, même di-glycosylée, les *N*-glycannes de la protéine scrapie ont des taux d'antennage plus élevés.

La *N*-glycosylation de la PrP n'est pas le seul aspect de la glycosylation impliqué dans le métabolisme de la protéine prion. L'ancrage glycosylé de PrP est également un élément important de la protéine, notamment pour sa localisation membranaire et donc son rôle dans la transduction de signaux. Concentrée dans les rafts lipidiques de la membrane plasmique, la protéine prion interagit avec des partenaires glycosylés, tels que les gangliosides. Cette association aurait un rôle stabilisateur de la structure tridimensionnelle de la PrP^c et interviendrait également dans la signalisation. De plus, les GAG de la matrice extracellulaire, eux aussi impliqués dans la fonction de la PrP, seraient également importants et affectés lors du développement d'une ESST (Papakonstantinou *et al.* 1999, Barret *et al.* 2005, Hijazi *et al.* 2005).

Pour ces diverses raisons, nous nous interrogeons sur l'implication potentielle des glycannes et des glycoconjugués dans l'ensemble des processus à l'origine des maladies à prions. A une étude biochimique des variations des sucres présents dans une situation normale et pathologique, difficile à mettre en œuvre d'une manière exhaustive et donc très restrictive, nous avons préféré une analyse des taux de transcrits des gènes dont les produits interviennent dans la synthèse des glycoconjugués. Pour ce faire, le laboratoire qui m'a accueillie et qui travaille depuis de nombreuses années sur les thématiques liées à la glycosylation a opté pour une analyse du glycotranscriptome par la technologie des micro-réseaux d'ADN.

La première partie de mes travaux a donc consisté en la construction de ce micro-réseau d'ADN chez la souris. La construction d'un tel outil, qui nécessite la connaissance des séquences des transcrits de chaque gène représenté n'était pas possible chez le mouton ou la vache, les données de séquences disponibles à ce moment-là étant largement insuffisantes. De telles données auraient pu être obtenues chez l'homme (comme cela a d'ailleurs été le cas quelques temps après la construction de la puce murine), mais le problème résidait alors dans l'obtention de tissus infectés. Le choix d'un micro-réseau murin s'est alors imposé, de nombreuses séquences de gènes étant disponibles et les modèles murins d'ESST nombreux.

Cet outil a dans un premier temps été utilisé sur des lignées cellulaires murines, dérivant de la région hypothalamo-hypophysaire, infectées ou non par du prion scrapie (cellules ScGT1 et GT1, travaux de thèse d'Agnès Barret). Une modification d'expression de 12 gènes a été mise en évidence. Parmi ces gènes, deux (*ChGn1* et *Chst8*) ont des taux d'expression bouleversés : *ChGn1* est sur-exprimé 30 fois tandis que *Chst8* est fortement sous-exprimé (d'un facteur 17) (Barret *et al.* 2005). L'altération spécifique de l'expression de ces deux gènes marque une altération de la synthèse des héparanes sulfates en faveur de chondroïtines hyposulfatées, ce qui favoriserait l'accumulation de protéines scrapie dans les cellules atteintes (Barret *et al.* 2005). L'utilisation de lignées cellulaires a donc permis d'identifier de façon précise une voie de biosynthèse altérée dans une situation de pathologie à prions.

En complément de ces analyses réalisées sur un modèle cellulaire, il semblait nécessaire d'étudier les variations possibles de la glycosylation sur un modèle animal d'ESST. L'étude sur animaux présente en effet l'avantage précieux de reproduire aux plus proches les situations réelles de pathologie, où les interactions/inter-connexions entre types cellulaires et organes sont conservées.

En raison de la faible transmissibilité due à la barrière d'espèce et des longues périodes d'incubation observées lors d'expérimentations sur des souris « sauvages » (en général plus de 400-500 jours avant l'apparition des signes cliniques, Lasmezas *et al.* 2001, Vilotte *et al.* 2001), l'utilisation de souris transgéniques capables de développer la maladie beaucoup plus rapidement après infection s'est imposée. Nous avons opté pour un modèle murin de tremblante du mouton. Les souris utilisées, dites Tg338, ont leur gène *Prnp* endogène invalidé mais possèdent six copies d'un transgène de *Prnp* ovin (allèle VRQ) inséré

dans leur génome. Par le KO du gène *Prnp* endogène et la surexpression de l'allèle sensible du gène ovin d'une part et le mode d'inoculation (intracrânien) d'autre part, ces souris sont très sensibles à la tremblante du mouton et développent très rapidement les symptômes de la maladie (en 60 jours environ). Produites à l'INRA de Jouy-en-Josas, des échantillons de souris témoins et atteintes de tremblante (inoculées respectivement par un extrait de cerveau de souris saine ou atteinte de tremblante), nous ont été transmis grâce à une collaboration avec Jean-Luc Vilotte (LGBC-INRA), Annick LeDur (VIM-INRA) et Hubert Laude (VIM-INRA).

Nous avons choisi d'analyser les taux d'expression des gènes de la glycosylation sur deux organes : (1) le cerveau, organe majeur de l'accumulation de protéines prion scrapie, où les altérations sont les plus manifestes (2) la rate, car bien que cet organe ne présente pas de modifications histopathologiques lors d'une infection à prions, il est fortement impliqué dans la réplication et la propagation de la PrP^{Sc} aux stades précoces de la maladie. Les événements moléculaires s'y déroulant, peu étudiés, pourraient avoir des répercussions majeures sur l'évolution de l'infection.

L'analyse de l'expression du glycotranscriptome au stade terminal de la maladie a pour but de cibler rapidement le(s) aspect(s) de la glycosylation affecté(s) lors d'une maladie à prions. Les gènes dont l'expression est dérégulée lors de la tremblante constitueront ainsi des marqueurs des événements moléculaires liés à l'évolution (fatale) de l'infection.

I. Matériels et méthodes

A. Modèle biologique

Le matériel biologique utilisé pour nos analyses sont des souris transgéniques (lignée Tg338) atteintes ou non de tremblante. Des échantillons tissulaires (cerveaux et rates) de ces souris nous ont été fournis par Jean-Luc Vilotte (LGBC, INRA), Annick LeDur (VIM, INRA) et Hubert Laude (VIM, INRA).

Les souris Tg338 n'expriment pas le gène *Prnp* murin, mais un transgène *Prnp* ovin, codant pour la protéine dite VRQ (possédant aux positions 136, 154 et 171 les acides aminés V, R et Q qui confèrent une grande sensibilité à l'infection par la protéine prion scrapie PrP^{Sc}). Ces souris ont été obtenues en deux étapes : (1) interruption, dans des cellules ES, d'un allèle du gène *Prnp* grâce à une recombinaison homologue avec un plasmide contenant le gène de résistance à la néomycine. Le croisement des souris F1 hétérozygotes a fourni les individus homozygotes n'exprimant plus de protéines prion murines fonctionnelles (Bueler *et al.* 1992); (2) micro-injection de chromosomes artificiels bactériens contenant le gène *Prnp* ovin dans le pronucleus femelle des souris KO précédemment obtenues. L'intégration aléatoire de 6 exemplaires du BAC (Chromosome Artificiel de Bactérie) contenant le gène *Prnp* ovin (allèle VRQ) dans le génome de ces souris leur permet de surexprimer la protéine prion ovine (Vilotte *et al.* 2001).

Les souris, âgées de 6 à 8 semaines, ont été inoculées intra-cérébralement avec des extraits de cerveaux de souris saines ou atteintes de tremblante. La souche de prion utilisée (127S) est adaptée à la souris et dérive de l'isolat PG127 issu de moutons atteints de tremblante naturelle. L'inoculum consiste en un homogénat complet de cerveau de souris en solution dans du glucose 5% (p/v). Les 20 µL de l'homogénat de cerveau à 10% sont inoculés dans le lobe pariétal droit du cerveau, et après 5, 10, 15, 20, 30, 40, 44 ou 60 jours d'incubation les souris témoins et d'intérêt sont tuées par dislocation cervicale. Les cerveaux ainsi que les rates sont prélevés et leurs ARN extraits. Des extraits protéiques sont également

réalisés sur les rates de souris saines et scrapie à 5, 10, 20, 30, 40 et 60 jours post-inoculation (jpi).

B. Création d'un microréseau d'ADN murin dédié à la glycosylation

La création du microréseau s'est déroulée en plusieurs étapes. Tout d'abord, nous avons établi la liste des gènes de la glycosylation dont les taux de transcrits pourront être analysés grâce au microréseau. Le choix d'amorces nichées nous a permis d'amplifier une partie spécifique de chacun des transcrits préalablement sélectionnés. Chacune des cibles étant ainsi produites, le dépôt des unités d'hybridation sur lames était alors possible : le micro-réseau était créé.

1. Sélection des cibles

Le prototype de microréseau a été conçu pour que les principaux gènes murins de la glycosylation soient représentés par au moins une unité d'hybridation spécifique. Les gènes de la glycosylation sont définis par leur implication dans diverses étapes du métabolisme (synthèse et dégradation) des glycannes de glycoconjugués, mais ils comprennent également les gènes codant les protéines de reconnaissance des sucres que sont les lectines. Ne sont pas pris en compte dans les premières versions du microréseau ADN les gènes impliqués dans la synthèse des oses.

Les séquences des gènes murins ont été obtenues, pour l'essentiel, par analogie avec leurs homologues humains, grâce aux données disponibles sur les sites Internet spécialisés (tableau 6, page suivante). Lorsque le transcrit du gène murin n'était pas caractérisé, sa séquence a été reconstituée à partir des EST (*Expressed Sequence Tags*) disponibles.

Sites	Adresses Internet
CAZY	http://www.cazy.org/CAZY/
NCBI	http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/
Unigène	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/
Locus Link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/
Expasy	http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html
GDB	http://gdbwww.gdb.org/gdb/
TIGR	http://www.tigr.org/tdb/tgi.shtml
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMedOld/medline.html

Tableau 6 : Sites Internet utilisés pour sélectionner les gènes représentés sur le microréseau d'ADN.

2. Fabrication des sondes ADNc

Les unités d'hybridation (sondes ADN simple brin) correspondent à des amplifiats PCR d'une taille moyenne de 450 à 500 pb. Les amorces utilisées pour créer ces unités ont été choisies, lorsque cela était possible, dans la région 3' non codante du gène considéré, grâce au logiciel Primer express (Applied Biosystems). Le niveau généralement très faible d'expression des transcrits des gènes de la glycosylation a nécessité l'emploi de la technique de PCR nichée. Les PCR externes ont été réalisées avec comme matrice initiale des ADNc commerciaux de souris (Clontech) de différents tissus. Le produit d'amplification de la première PCR a servi de matrice pour les amplifications internes.

Les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 1,5%, et les amplifiats purifiés grâce au kit GFX (Amersham). Les unités d'hybridation obtenues ont été clonées dans un vecteur T (TOPO Cloning, Invitrogen) et séquencées selon le protocole fourni par Perkin Elmer sur le séquenceur automatique (ABI PRISM Cycle sequencing 310, Perkin Elmer). Les clones bactériens sont conservés à -80°C dans du glycérol 50% (v/v).

3. Dépôts sur lames des unités d'hybridation

Le microréseau d'ADN est un bloc de 201 unités d'hybridation, répété trois fois. Chaque bloc contient 178 unités d'hybridation spécifiques de 165 gènes de la glycosylation, et 23 sondes contrôles réparties en témoins de normalisation (10 unités), témoins d'élongation (7 unités), témoin positif (1 unité) et témoins négatifs (5 unités). Le microréseau contient également 6 dépôts d'oligonucléotides fluorescents utilisés comme repères.

Pour être déposées, les sondes sont déshydratées par évaporation pour être remises en suspension à 100 ng/ μ L dans le tampon de dépôt (3X SSC). Le dépôt des unités sur la lame de verre recouverte de poly-lysine est réalisé par un robot (Arrayer GMS417, MWG-Biotech). Pour que les conditions du dépôt soient stables, cette étape est accomplie en atmosphère confinée à une température de 20°C et un taux d'humidité supérieur à 60%. Les spots sont alors réhydratés de façon homogène en présence de vapeur d'eau chaude (à 58°C) pendant 5 minutes. Les lames sont uniformément déshydratées par un passage à 80°C durant 5 secondes puis soumises à une irradiation aux UV (65 mJ) afin de fixer les acides nucléiques sur le support polylysine par établissement de liaisons covalentes. Les sites polylysines n'ayant pas réagi avec les acides nucléiques sont inactivés par une incubation de 15 minutes dans une solution à 1,7% d'anhydride succinique de *N*-methyl-2-pyrrolidone ajustée à 42,8 mM de borate de sodium (pH8). Les sondes sont ensuite dénaturées par un passage dans de l'eau bouillante pour être sous forme simple brin. Enfin, les lames sont séchées par un bref rinçage à l'éthanol 95%, suivi d'une centrifugation de 2 min à 500 rpm. Les lames alors prêtes à l'emploi sont stockées à température ambiante dans le noir.

C. Utilisation du microréseau

L'utilisation du micro-réseau se fait grâce au kit MicroMax cDNA Microarray Systems. Succinctement, les cibles correspondent aux ARN totaux rétro-transcrits en ADNc ayant incorporé soit des dCTP couplés à la fluorescéine, soit des dCTP couplés à la biotine. Lors de cette étape, des ARN standard d'*Arabidopsis thaliana* sont ajoutés en vue de la normalisation des lectures de fluorescence. Les ADNc produits sont alors mélangés en quantités équimoléculaires et hybridés sur le micro-réseau. Les dCTP-fluorescéine sont révélés par un anticorps anti-fluorescéine couplé à la peroxydase. Cette enzyme réagit ensuite avec la tyramide couplée à la cyanine 3. Cette étape permet une amplification du signal car la peroxydase peut fixer plusieurs molécules de cyanine 3. La peroxydase est ensuite inactivée par ajout de son substrat avant de procéder à la révélation des ADNc marqués à la biotine. La révélation des dCTP-biotine est basée sur l'affinité de la streptavidine (couplée à la peroxydase) pour la biotine. Comme la streptavidine est également couplée à la peroxydase,

l'ajout de tyramide couplé à la cyanine 5 permet la fixation de plusieurs molécules de cyanine 5 sur une même peroxydase.

La lame est lue à deux longueurs d'onde : 635 nm (dans le rouge) pour la cyanine 5 et 532 nm (dans le vert) pour la cyanine 3. L'intensité de fluorescence de chaque dépôt hybridé est analysée par le logiciel Array-Pro en soustrayant le bruit de fond, de façon à dégager le signal spécifique de chaque spot. L'analyse des taux de fluorescence après normalisation sur les standards exogènes d'*Arabidopsis thaliana* permet la mise en évidence des gènes sur-exprimés ou sous-exprimés lorsque le rapport de leur intensité de fluorescence est respectivement au moins égale à 2 ou 0,5.

D. RT-PCR semi-quantitative en temps réel

Les analyses en RT-PCR semi-quantitative ont été réalisées en utilisant la technique basée sur le fluorochrome SYBR Green I, un intercalant fluorescent de l'ADN. Chaque analyse est réalisée en triplicat dans une plaque de 96 puits (Applied Biosystems). Toutes les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil 5700 Sequence Detection System (Perkin Elmer) dans un volume de 25 µL. Le programme d'amplification est de 10 min à 95°C suivi de 40 cycles de 15 sec à 95°C puis 1 min à 65°C.

Pour chaque gène d'intérêt, un couple d'oligonucléotides est choisi préférentiellement dans la région proche de la queue poly-A du transcrit d'intérêt (tableau 7, page 93). Les oligonucléotides sont dessinés à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems) afin de donner un produit d'amplification de 50 à 150 pb. Leur spécificité vis-à-vis du gène d'intérêt est contrôlée par alignement informatique (blast).

Différentes concentrations en oligonucléotides sont testées afin de déterminer la concentration qui donne le meilleur signal de fluorescence (précocité). Les concentrations finales d'amorces testées sont 50, 300 ou 900 nM. Pour tous les couples testés, la concentration optimale en amorces est 900 nM.

En fin d'amplification une courbe de dissociation est réalisée en effectuant une montée en température de 60 à 95°C en 20 min. L'obtention d'une courbe unique permet d'attester la spécificité des amorces choisies. Les amorces validées par cette première étape doivent ensuite être contrôlées pour leur efficacité d'amplification. Cette analyse consiste à vérifier la relation : nombre de cycles (Ct) nécessaires pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil en fonction du logarithme de la concentration en ADN matrice. Pour cela, cinq dilutions successives au 1/4 de l'ADNc matrice sont réalisées. Pour une réaction de PCR efficace à 100%, la pente de la droite qui représente le Ct en fonction du \log_{10} de la concentration en ADN matrice est égale à $-3,32$. Les couples d'amorces choisis (tableau 7, page suivante) sont tous proches de cette valeur.

Pour les analyses de quantification relative, le mélange réactionnel dans chaque puits renferme 5 μL d'ADNc (dilué au 1/20) ; 12,5 μL de MIX SYBR Green ; 3 μL d'amorces à 7,5 μM ; et 1,5 μL d'eau. Le gène de référence utilisé est *TFIID*, gène de ménage dont l'expression est invariante lors d'une tremblante (Beringue *et al.* 2000) et le taux d'expression du gène d'intérêt est déterminé par rapport à ce gène de référence. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux tissus (issus de souris scrapie et saine) est obtenue par le calcul :

$$\text{Ratio d'expression} = \frac{2^{(-\text{Ct gène d'intérêt situation à calibrer} - \text{Ct gène d'intérêt situation témoin})}}{2^{(-\text{Ct gène de référence situation à calibrer} - \text{Ct gène de référence situation témoin})}}$$

Un gène est considéré sur-exprimé quand ce rapport est supérieur à 2 et sous-exprimé quand ce rapport est inférieur à 0,5.

Nom du Gène	N° accession	Amorce sens	Amorce antisens
<i>β3galt5</i>	NM_033149	tcagattccggatatagactgcaa	cggccagctgcttgta
<i>β3GnT1</i>	BC009075	aagacacccccagaggacaac	ggatgtcctggcttgctca
<i>β4galt6</i>	NM_019737	aatthtctatatctctgtgtgca	ctgaaaagaattccaggctgaatta
<i>Calr : Clr</i>	NM_007591	cactaccctccaacttaggaacag	tcctctgagatgcaggaagga
<i>Canx : Cnx</i>	BC012408	cctctggagcacaaggcttt	caacacagtggaacaagtgtgtaatt
<i>ERp57 : Grp58</i>	NM_007952	aaccagagaggacagaatggataaa	tgtattttcaaacagtgcagctaaga
		ggcttggccctgagtatgaa	ttgtgtggcagtgcaatcc
<i>Fut8</i>	BC010666	caagcgggaaccctcagat	ggcaccacagcccttcata
<i>Galnt6</i>	AJ133523	tgcaggcagcaaagatggt	gctgctccctgagctgaagt
<i>Gcs1</i>	NM_020619	cttgggtttctggtctcattgt	cagagctatatgggatgacaataagg
<i>Gcs2a : G2an</i>	NM_008060	ggacacicaagatagagacatgagttg	cctcagctcttctcccagcaa
<i>Gcs2b : Prksch</i>	NM_008925	cctgctgtgtggcaaaga	ctggtgtcatcagctccatga
<i>Ggtb3</i>	D37791	ggcctggagcacaaggcttt	caacacagtggaacaagtgtgtaatt
<i>Hexb</i>	NM_010422	catggccctgctagattt	cgcactctgactcagggtaa
<i>Hprt</i>	NM_012556	acagcccaaaatggttaagg	aacaagctctggcctgtatccaa
<i>Lfn3</i>	AK004642 / AF015768	agccagacagcttggcttt	ggattccagatactggaaggcata
<i>Man2a1</i>	NM_008549	cctccagatgccagaaca	cggatacggaacgtgctgat
<i>Mgat3</i>	L39373	ggctagggtgtgcacttc	gataaggaggagcctaagataaca
<i>Neu1</i>	NM_010893	ctggcactacggcactgga	aatcgtgatcgtttgggc
		ggcctacgagctccagatg	tcagcggcaatgta
<i>Ogt</i>	NM_139144	gcttctcagcttactgtctaggatgt	cccagtttcacagctatgtcttcat
<i>Pigq</i>	BC0142287	ggtaccctgtgccgaaagc	ccagctcctcagctctgtttg
<i>Pofut1</i>	AF375885	tggcccagatcgacctgta	gaacgaggagacacagttccaat
<i>ST3Gal II</i>	BC015264	cctccccgggatgct	ttcgttggtttgttgacttg
<i>ST3Gal V</i>	AF119416	gttctcctgaagctcctcaag	tttccgtgttccgagttc
<i>ST6Gal I</i>	NM_145933	catctgtcccacactgatca	aatcactgagcgcacggaat
<i>ST6GalNAc VI</i>	NM_016973	agcagacgccggagagaga	tgaggcgaagaggatcaciaa
<i>Prnp ovin</i>	AJ567988	tttgtggccatgtggagta	cggctccccagctga
<i>TFIID</i>	BC012685	ttgacctaaagaccattgcactc	catgatgactgcagcaaatc

Tableau 7 : Amorces utilisées en RT-PCR semi-quantitative pour valider les modifications d'expression mises en évidence par le microréseau.

II. Analyse du glycotranscriptome de cerveaux de souris saines et scrapie

A. Au stade terminal de la maladie (60 jpi)

Les ARN totaux issus de souris saines (2 individus) et malade (1 individu) ont été analysés à l'aide du microréseau d'ADN (voir Matériels et méthodes pour la fabrication et l'utilisation de cet outil). Les ARN totaux de souris témoin sont rétrotranscrits en ADNc en présence de dCTP-biotine et ceux de souris malades en présence de dCTP-fluorescéine. Puis l'expérience est répétée en inversant le marquage des dCTP. Les données de fluorescence Cy3 et Cy5 obtenues sont ensuite croisées pour chaque expérience. Les expériences doublées ont été répétées trois fois. Au total six lames (3 lames Cy3/Cy5 et 3 lames Cy5/Cy3) ont été analysées.

De façon intéressante, sur l'ensemble des 165 gènes murins représentés, seuls trois gènes apparaissaient surexprimés dans les cerveaux de souris malades au stade sub-terminal sur au moins 4 des 6 lames analysées : *Hexb*, *ST3Gal II* et *ST6GalNAc VI* (tableau 8, page suivante). Sept autres gènes (*β 3galt5*, *Galnt6*, *Ggtb3*, *Lfng*, *Mgat3*, *Ogt* et *ST6Gal I*) sont également identifiés sur certaines analyses seulement, en raison notamment du faible niveau d'expression de ces gènes. Aucun transcrit n'est apparu sous-exprimé. Nous avons alors entrepris de confirmer les observations faites à partir du micro-réseau d'ADN par RT-PCR semi-quantitative en temps réel (voir matériels et méthodes). La surexpression de huit gènes a été confirmée. Seules les sur-expressions de *Ggtb3* et *Ogt* n'ont pas été considérées comme significatives.

Nom du gène	Protéine codée et fonction	Analyse Microréseau	Analyse RT-PCR
<i>β3galt5</i>	UDP-galactose : Beta-N-acétyl-glucosamine -β-1,3 - galactosyltransferase V <i>Greffe Gal sur GlcNAc (glycane O-liés de core3) ou sur GalNAc (du globoside Gb4)</i>	4,0 ± 1,5	5,25 ± 0,9
<i>Galnt6</i>	UDP-N-Acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 <i>Greffe GalNAc sur OH et Ser ou Thr (O-glycosylation)</i>	2,36 ± 0,2	4,88 ± 1,52
<i>Ggtb3</i>	UDP-galactose:N-acetylglucosaminylglycopeptide β-1,4-galactosyltransferase <i>Greffe un Gal sur un GlcNAc de protéine ou lipide</i>	2,58 ± 1,02	1,83 ± 0,34
<i>Hexb</i>	Hexosaminidase B, polypeptide beta <i>Code la sous-unité β de l'hexosaminidase pouvant former un dimère αβ (HEXB) ou ββ (HEXS), enzymes lysosomales qui clivent des résidus N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine terminaux</i>	2,01 ± 0,5	3,66 ± 1,1
<i>Lfng</i>	Lunatic fringe, O-fucosylpeptide 3β N-acétylglucosaminyltransférase <i>Greffe un GlcNAc sur fucose O-lié</i>	2,21 ± 0,2	2,34 ± 0,27
<i>Mgat3</i>	Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein β-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase <i>Greffe GlcNAc en β(1,4) sur Man β(1,4) GlcNAc (N-glycosylation)</i>	3,1 ± 0,5	3,51 ± 0,7
<i>Ogt</i>	O-linked-N-acetylglucosamine(GlcNAc)transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-acétylglucosaminyltransférase) <i>Addition de GlcNAc sur Ser ou Thr du polypeptide : O-glycosylation</i>	1,89 ± 0,53	1,57 ± 0,64
<i>ST3Gal II</i>	β-galactoside α-2,3-sialyltransferase (Sialyltransférase 5) <i>Greffe un NeuAc en α(2,3) sur Gal de Gal-β(1,3)-GalNAc des glycolipides (asialo-GM1 et GM1a) ou des glycoprotéines ; greffe aussi sur GalNAc</i>	2,44 ± 0,58	2,48 ± 0,46
<i>ST6Gal I</i>	β-galactoside α-2,6-sialyltransferase (Sialyltransférase 1) <i>Greffe NeuAc en α(2,6) sur le disaccharide Gal-β(1,4)-GlcNAc libre ou présent sur des oligosaccharides N- ou O-liés.</i>	3,1 ± 0,5	3,5 ± 1,1
<i>ST6GalNAc VI</i>	(α-N-acetylneuraminyl 2,3-β-galactosyl-1,3)- N-acetyl galactosaminide α-2,6-sialyltransférase F <i>Greffe NeuAc en α(2,6) sur gangliosides GM1b, GT1b et GD1a pour donner du GD1a, GQ1ba et GT1aa respectivement</i>	2,15 ± 0,38	5,13 ± 1,81

Tableau 8: Gènes mis en évidence par l'analyse par microréseau d'ADN du glycotranscriptome de cerveaux de souris atteintes de tremblante comparativement à ceux de souris saines, au stade sub-terminal de 60 jpi. Les ratios d'expression obtenus respectivement avec le microréseau et par RT-PCR semi-quantitative sont indiqués colonnes de droite.

Nous nous sommes également intéressés aux gènes intervenant dans le système réticulaire de contrôle du repliement des glycoprotéines (système Calnexine-Calréticuline). Bien qu'ils n'aient pas été préalablement identifiés, leur expression hors de la gamme d'analyse pouvait en effet être modifiée sans être nécessairement révélée par la sonde du microréseau. Nous avons donc analysé l'expression des gènes codant les lectines calréticuline et calnexine, la protéine chaperon ERp57, et les glucosidases 1 et 2 (Gcs1, Gcs2 α et Gcs2 β). Seul le gène codant la calréticuline est significativement sous-exprimé (ratio de $0,35 \pm 0,05$).

B. Etude cinétique des gènes mis en évidence

Pour chacun des gènes dont l'expression est modifiée au stade sub-terminal de la maladie, nous avons entrepris une analyse de l'expression en fonction du temps : 15, 30, 44 et 60 jours post-inoculation. Les résultats obtenus sont représentés figure 13.

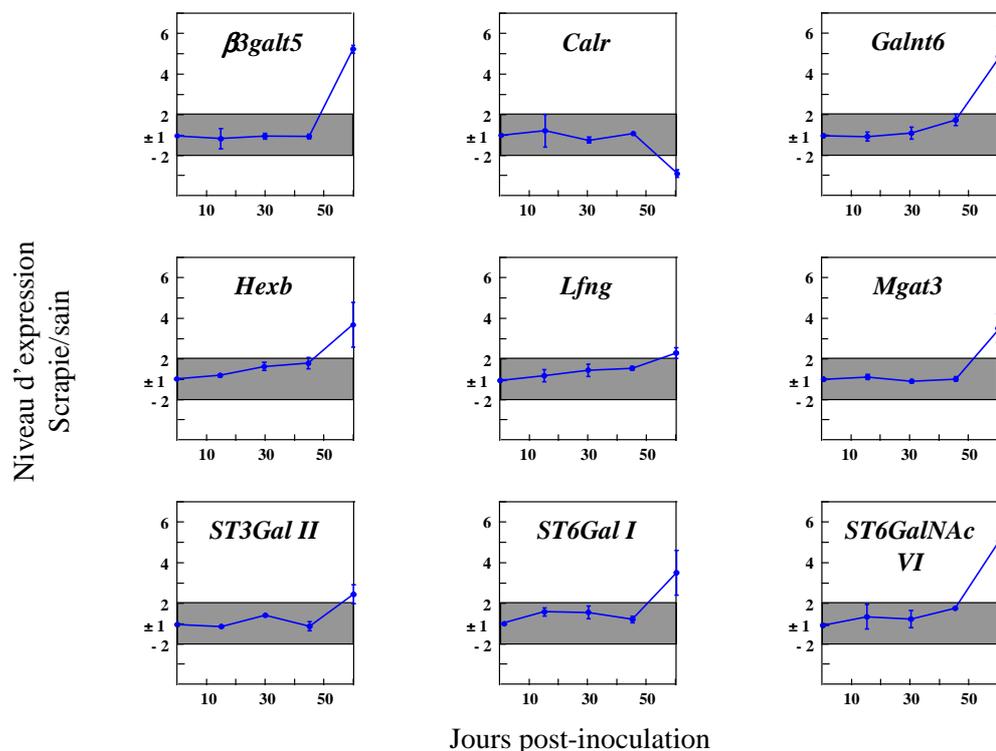


Figure 13 : Cinétique d'expression des gènes de la glycosylation dont l'expression est modifiée dans le cerveau au stade sub-terminal d'une tremblante murine expérimentale.

Nous constatons que les modifications d'expression ne sont observables qu'au stade sub-terminal de la maladie, de façon quasi concomitante à l'apparition des premiers signes cliniques. L'analyse des taux de PrPres met en évidence une accumulation tardive (45 jpi) de protéines scrapie dans le cerveau (figure 14). La présence, décroissante, de PrPres aux stades 10, 20 et 30 jpi pourrait être due à l'inoculum résiduel, ou à une digestion incomplète par la protéinase K. Quant à la PrP^{Sc} synthétisée *de novo*, elle est clairement visible à 45 et 60 jpi.

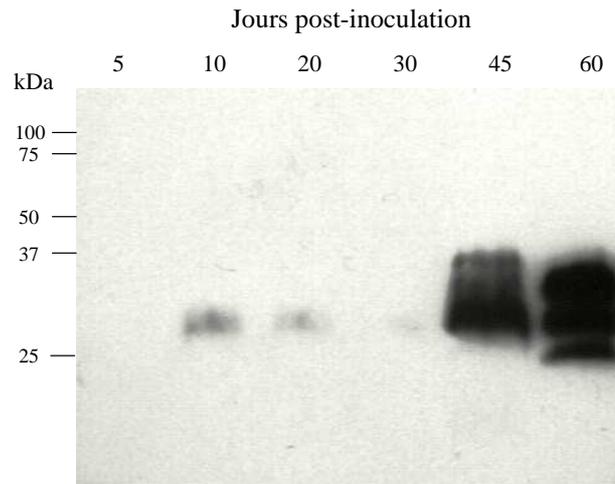


Figure 14 : Western blot d'apparition de protéines prions scrapie dans le cerveau de souris Tg338 après inoculation intracrânienne d'un homogénat de cerveau de souris atteinte de tremblante.

Les modifications d'expression observées dans le cerveau seraient une réponse de l'organe à l'accumulation de PrP^{Sc}. Ainsi, la sur-expression de *Hexb*, également décrite dans un autre modèle d'ESST (souris atteintes de la MCJ, Kopacek *et al.* 2000) souligne par exemple une activation du système lysosomal. Une telle activation est observée dans d'autres maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (Emiliani *et al.* 2003). Une autre similitude avec la maladie d'Alzheimer est suggérée par nos analyses. En effet, la sur-expression de *Lfng* (Lunatic fringe) impliquerait le récepteur Notch dans les maladies à prions, car la seule fonction connue de *Lfng* est le greffage d'un GlcNAc sur les fucoses *O*-liés des motifs EGF like du récepteur Notch. La *O*-glycosylation de ce dernier influe sur son activité, or cette activité est impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Nakajima *et al.* 2000), et a récemment été montrée modifiée durant une maladie à prions (Ishikura *et al.* 2005).

La sur-expression tardive de $\beta 3\text{galt}5$ pourrait avoir plusieurs implications. En effet, $\beta 3\text{galt}5$ est l'une des rares glycosyltransférases capables de transférer un galactose sur des accepteurs monosaccharidiques différents. Elle peut ainsi transférer un galactose sur le motif GlcNAc ($\beta 1,3$)GalNAc, de préférence sur les glycanes *O*-liés de core 3, mais elle peut aussi greffer un galactose sur le GalNAc terminal du globoside Gb4, créant le globoside Gb5 (Zhou *et al.*, 2000). De façon très intéressante, la sialyltransférase ST3Gal II, dont le gène est également sur-exprimé dans les cerveaux de souris atteintes de tremblante, a la capacité de greffer un acide sialique sur le globoside Gb5, créant ainsi le monosialoGb5 (ou motif antigénique SSEA-4). Tout comme $\beta 3\text{galt-V}$, ST3Gal II est multifonctionnelle, puisqu'elle peut greffer un acide sialique aussi bien sur un galactose qu'une N-acétylgalactosamine (Toivonen *et al.* 2001). En plus de son activité SSEA-4 synthase, ST3Gal II a également une activité $\alpha 2,3$ sialyltransférase sur les gangliosides accepteurs asialoGM1 et GM1a (Saito *et al.* 2003). L'état de sialylation des glycolipides est également probablement affecté par la sur-expression de ST6GalNAc VI, connue pour son activité dans la biosynthèse des gangliosides complexes de la série α (GD1 α , GT1 α , GQ1 α , Okajima *et al.* 2000). Ces diverses sur-expressions suggèrent une augmentation de l'état de sialylation des cellules infectées, avec une implication particulière des glycolipides.

La sur-expression tardive de *Mgat3* est inattendue au vu des taux d'antennage des *N*-glycannes de la PrP^c et de la PrP^{Sc} décrits par les travaux de Rudd (Rudd *et al.* 1999). *Mgat3* catalyse en effet l'addition d'un GlcNAc sur le mannose localisé à la bissection du cœur trimannoses des *N*-glycannes (figure 10 page 69). Par sa présence, le GlcNAc inhiberait l'action de *Mgat2*, *Mgat4* et/ou *Mgat5*, des *N*-acétylglucosaminyl transférases qui construisent les antennes des glycannes tri- et tétra-antennés. A partir de données structurales sur les *N*-glycannes de la PrP, Rudd *et al.* formulent l'hypothèse que l'activité de *Mgat3* serait abaissée dans les infections à prions, ce qui expliquerait l'augmentation du taux d'antennage des oligosaccharides rencontrés sur la PrP^{Sc} (Rudd *et al.* 1999). Nos propres résultats (sur-expression du gène *Mgat3*), en apparence contradiction avec cette hypothèse, amènent à supposer qu'une telle diminution de l'activité enzymatique, si elle est effective, ne serait pas liée à un défaut de transcription du gène *Mgat3*. La dégradation des ARNm et/ou des épissages alternatifs pourraient, parmi d'autres causes, être mis en rapport avec la quantité d'enzymes et par voie de conséquences avec son activité. Une moindre présence du sucre donneur, l'UDP-GlcNAc pourrait également expliquer la faible activité de *Mgat3*.

Alors que la mise en évidence de la sur-expression de *Hexb* dans notre modèle permet de confirmer des résultats obtenus sur d'autres modèles, nos travaux n'ont pas révélés de modification d'expression de ERp57 (nommée également Grp58), comme cela a récemment été décrit (Hertz *et al.* 2005). Nos études impliquent cependant également le système réticulaire de contrôle du repliement des protéines via la sous-expression de la chaperonne calréticuline.

Les variations d'expression étant tardives, nous n'avons pas poussé plus loin nos investigations sur les gènes mis en évidence à ce stade sub-terminal. Une attention particulière devrait toutefois être portée à *Galnt6*. Ce gène code en effet une O-GalNAc transférase qui initie la synthèse des O-glycannes (de type mucine en général) (Bennett *et al.* 1999), ce qui pourrait être mis en relation avec une possible O-glycosylation de la PrP, modification soupçonnée, mais jamais mise en évidence à ce jour.

La même approche a été employée sur les rates de souris saines et atteintes de tremblante, ce tissu ayant une action précoce et majeure dans l'évolution des ESST.

III. Analyse du glycotranscriptome de rates de souris saines et scrapie

L'analyse des taux d'expression des gènes impliqués dans la glycosylation par micro-réseau d'ADN, au stade terminal de la maladie, a mis en évidence une altération de seulement cinq gènes : trois sont sur-exprimés : *ST6Gal I*, *ERp57* et *Man2a1* et deux autres sont sous-exprimés : *Pigq* et *ST3Gal V*. L'analyse par RT-PCR a montré que les sur-expressions n'étaient pas significatives, par contre, les sous-expressions ont été confirmées.

Le gène *ST3Gal V*, ou *Siat9*, code la GM3 synthase / *ST3Gal V* (CMP-NeuAc : lactosylcéramide α 2,3 sialyltransférase, EC 2.4.99.9), protéine constituée de 359 acides aminés, pour une masse molaire théorique de 41,245 kDa (Ishii *et al.* 1998). Cette sialyltransférase, comme la plupart des glycosyltransférases est une glycoprotéine transmembranaire de type II (domaine N-terminal cytoplasmique), constituée d'une courte

région cytoplasmique, d'une région transmembranaire, d'une tige (« *Stem* »), prolongée par un large domaine C-terminal catalytique. La région tige et le domaine catalytique sont localisés dans la lumière golgienne.

A l'instar des autres sialyltransférases, la ST3GalV possède 4 régions très conservées : les sialylmotifs. Le sialylmotif L (Large) participe à la liaison du substrat donneur CMP-Neu5Ac et le sialylmotif S (Short) participe à la liaison des substrats donneur et accepteur. Le sialylmotif VS (Very Short), proche de l'extrémité C-terminale, est nécessaire à l'activité enzymatique (Datta et Paulson 1995, Datta *et al.* 1998). Plus récemment, un dernier motif appelé sialylmotif III, situé entre les sialylmotifs S et VS, a été identifié et serait également nécessaire à l'activité de l'enzyme et à sa conformation fonctionnelle (Jeanneau *et al.* 2004).

La ST3GalV a comme substrat donneur le nucléotide-sucres CMP-NeuAc, et comme accepteur le lactosylcéramide (figure 15, page suivante). Des études réalisées sur l'enzyme purifiée extraite de cerveau de rat (mais d'une masse moléculaire de 76 kDa !) montrent que dans une moindre mesure, GalCer et GA2 (GalNAc-Gal-Glc-Cer) pourraient être des accepteurs de faible affinité (Preuss *et al.* 1993). Des études plus récentes effectuées sur l'enzyme humaine recombinante montrent que le lactosylcéramide est l'unique accepteur de ST3GalV, conduisant à la synthèse du ganglioside GM3 (Ishii *et al.* 1998). Inversement, la ST3GalV / GM3 synthase est la seule enzyme capable de synthétiser le GM3. Ainsi, une perte de fonction de ST3GalV par mutation conduit à l'absence totale de gangliosides GM3 et de ses dérivés biosynthétiques (soit tous les gangliosides des séries a, b et o, figure 15), et à une augmentation du taux de lactosylcéramide et de ses dérivés (Simpson *et al.* 2004). Comme tous les gangliosides, GM3 est constitué d'un sphingolipide simple, le céramide, molécule hydrophobe qui sert d'ancrage membranaire, et d'une chaîne oligosaccharidique hydrophile.

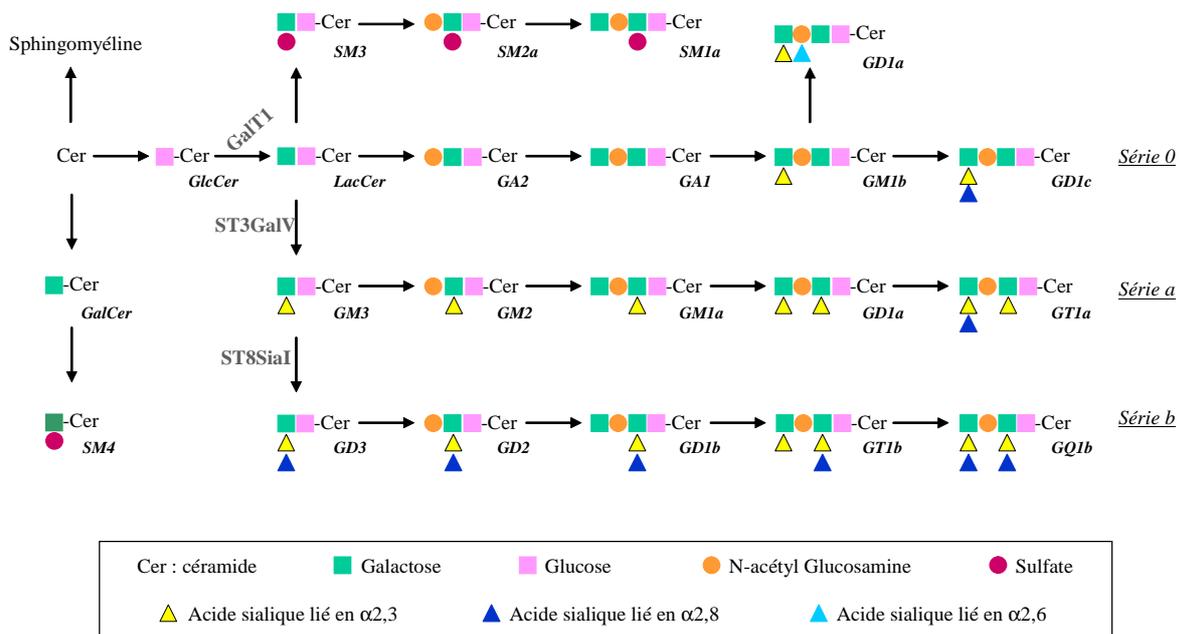


Figure 15 : Voies de biosynthèse des glycosphingolipides (d'après Yamashita *et al.* 2005)

Organisés en 7 exons (Zeng *et al.* 2003), les transcrits des *ST3GalV* humains et murins ont 3 codons initiateurs de la traduction en phase. Par homologie avec les autres sialyltransférases, la 3^{ème} méthionine, présente dans l'exon 2, est considérée comme le premier acide aminé (Kapitonov *et al.* 1999). Chez la souris, deux séquences sont présentes dans les banques (NM_011375 et AF119416). Elles se distinguent par leur premier exon (figure 16, page suivante). Lors de nos analyses, seul le transcrit ayant l'exon 1 (et non 1') a pu être amplifié de façon systématique en PCR nichées.

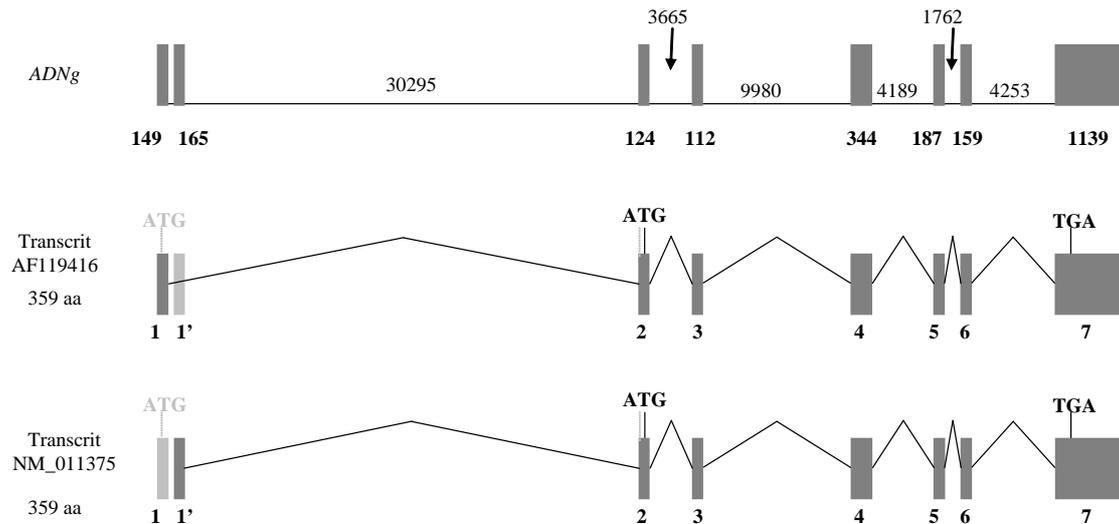


Figure 16 : Organisation du gène *ST3GalV* murin et épissage alternatif des exons 1' et 1.

Le second gène dont une altération de l'expression est mise en évidence par le micro-réseau d'ADN, au stade terminal de la tremblante expérimentale murine, est *Pigq*.

Le gène *Pigq* code une protéine de 581 acides aminés (appelée PigQ ou GPI1, EC 2.4.1.198) qui possède six domaines transmembranaires. Cette protéine intervient dans un complexe qui comprendrait 6 protéines, les 5 autres protéines étant codées par les gènes *Piga*, *Pigc*, *Pigh*, *Pigp* et *Dpm2* chez l'homme (Watanabe *et al.* 2000, Tiede *et al.* 2001). Ce complexe, présent dans le RE, a une activité *N*-acétylglucosaminyltransférase. Il intervient lors de la 1^{ère} étape de la biosynthèse des ancres GPI, en transférant une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) d'un UDP-GlcNAc sur un phosphatidylinositol (Watanabe *et al.* 1998). Dans ce complexe, la protéine PigQ a un rôle stabilisateur en maintenant la protéine PigC en interaction avec le dimère PigA-PigH (Hong *et al.* 1999). Il a été montré que PigQ a la capacité de se lier à PigA, PigC, PigH et PigP. PigQ n'interviendrait pas dans le processus catalytique, la capacité de transfert du GlcNAc étant probablement liée à PigA, car cette protéine contient le site de liaison à l'UDP-GlcNAc. Par la suite, la *N*-acétylglucosamine greffée sur le phosphatidylinositol est désacétylée.

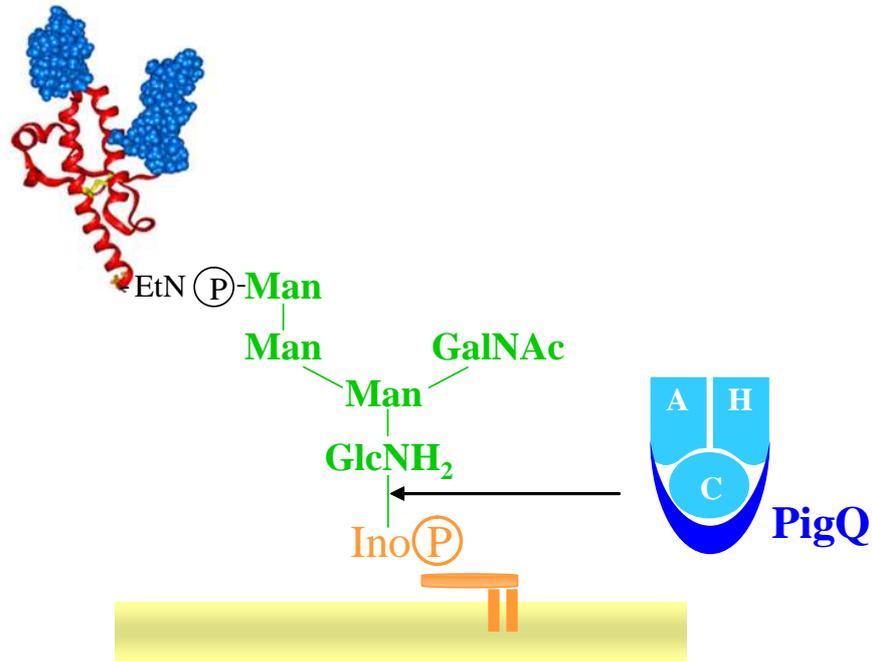


Figure 17 : La protéine PigQ, en complexe avec les protéines PigA, H, C (ainsi que Dmp2 et PigP, non représentés) intervient dans la première étape de la biosynthèse de la partie glycanique des ancres GPI.

Le gène *Pigq* murin, comme son homologue humain, est organisé en 11 exons, dont le 1^{er} exon est non codant. Deux transcrits, variants par l'épissage de l'exon 10 ont été décrits chez l'homme, mais un tel épissage alternatif n'a pas été décrit chez la souris.

La mise en évidence de l'altération d'expression hautement significative des deux gènes *ST3GalV* et *Pigq* nous a conduit à entreprendre des études plus approfondies sur la réalité de ce phénomène et sa signification biologique. Nos travaux, qui ont porté en particulier sur *ST3GalV* sont présentés dans les publications suivantes.

Article 1

Alterations of GM3 synthase gene expression
are critical events of prion disease propagation

A. Article 1

Alterations of GM3 synthase gene expression are critical events of prion disease progression

Soumis à FEBS letter le 7 Mars 2006.

Alterations of GM3 synthase gene expression are critical events of prion disease progression

Florence Guillerme¹, Lionel Forestier¹, Jean-Luc Vilotte², Jacques Portoukalian³, Annick Le Dur⁴, Paul-François Gallet^{1§} and Raymond Julien^{1§}

1 : UMR 1061, Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges cedex, France.

2 : LGBC, INRA, 78352 Jouy-en-Josas, France.

3: INSERM U346, Université Lyon-I, Hôpital E. Herriot, 69437 Lyon cedex, France.

4: VIM, INRA, 78352 Jouy-en-Josas, France.

Abstract Cell glycoconjugates are known to play a role in prion infection. However, the mechanisms by which they participate to the evolution of disease are still poorly understood. Here, we overcome this difficulty by proceeding to a transcriptomic analysis of 403 glycosylation-related genes. It allowed us to evidence a specific up- and down-regulation of *ST3GalV* (*GM3 synthase*) expression in scrapie-infected transgenic mouse overexpressing sheep PrP. Indeed we show that alterations of GM3 synthase and gangliosides biosynthesis are early critical events associated to the prion particle formation and disease progression.

Keywords : scrapie ; prion ; gangliosides ; GM3 synthase ; PigQ.

Conclusions Article 1

Par ces travaux, nous avons établi que la sous-expression de *ST3GalV* et *Pigq* est concomitante de la réplication de la PrP^{Sc}. En effet, *ST3GalV* et *Pigq* présentent une évolution de l'expression similaire durant une infection : sur-exprimés dans un premier temps, ils sont ensuite fortement sous-exprimés dans les 15 derniers jours.

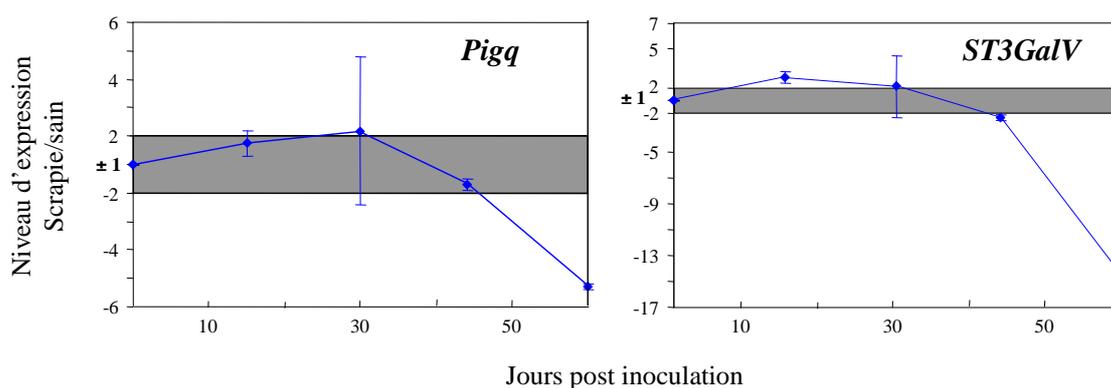


Figure 18 : Cinétique d'expression des gènes *Pigq* et *ST3GalV* dans la rate lors d'une tremblante expérimentale.

La variation d'expression de *Pigq* engendre une moindre synthèse des protéines PigQ, ce qui aurait pour conséquence une déstabilisation du complexe enzymatique assurant le transfert de GlcNAc, avec pour conséquence ultime une altération de la synthèse des ancres GPI. La glypiation des protéines cellulaires en serait affectée lors de l'infection. De plus, la sous-expression de *ST3GalV* se manifesterait par une altération de la synthèse du ganglioside GM3, de ses précurseurs et de ses dérivés. La dérégulation de *ST3GalV* aurait des répercussions sur le statut des microdomaines riches en GM3 (rafts) où se trouve précisément localisée la PrP, dont la glypiation serait de plus altérée. Ces deux événements moléculaires soulignent le rôle joué par l'environnement membranaire et l'état de glypiation de la PrP dans le processus de transconformation en PrP^{Sc}.

La présence intrigante de plusieurs isoformes de la protéine ST3GalV/ GM3synthase nous a conduit à poursuivre nos investigations sur cette enzyme majeure de la biosynthèse des gangliosides afin d'identifier l'origine de ces isoformes et d'appréhender leurs fonctions putatives respectives. Ce travail fait l'objet de l'article 2.

Article 2

Golgian and non-Golgian ST3GalV isoforms
are differently down-regulated in scrapie-
infected mice spleen

B. Article 2

Golgian and non-Golgian ST3GalV isoforms are differently down-regulated in scrapie-infected mice spleen

En préparation, pour être soumis à Glycobiology.

Title: Golgian and non-Golgian ST3GalV isoforms are differently down-regulated in scrapie-infected mice spleen.

Florence Guillerme, Aurélien LeDuc, Paul-François Gallet and Raymond Julien

UMR 1061, Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges cedex, France.

Keywords: prion, GM3 synthase, gangliosides, raft, ST3GalV

Abstract

Cellular prion protein (PrP^c) interact with gangliosides especially GM3 in membrane microdomains (rafts) and this association is thought to be involved in signalisation. Here, we show that during an experimental scrapie, an early depletion of lactosylceramide α 2,3 sialyltransferase (GM3 synthase) is tightly associated to ganglioside depletion and seems to improve accumulation of β -sheet altered PrP conformers (PrP^{Sc}). We identify three isoforms of ST3GalV protein (called FLE, I1 and I2), corresponding to alternative spliced transcripts. Each isoform seems to be differently implicated in prion pathogenesis, as their activity, localization and regulation in presence of PrP^{Sc} are different. Our results suggest that the specific down regulation of the full length (FLE) and I1 truncated ST3GalV isoforms in lymphoid organs may lead to a reorganization of raft microdomains. We suggest that GM3 synthase isoforms changes alter the remodelling of gangliosides, may modulate PrP signaling pathways and favour the propagation of PrP^{Sc}.

Conclusions Article 2

L'analyse approfondie des transcrits et protéines ST3GalV nous a permis de corréler les isoformes protéiques (visibles par western blots) et les transcrits alternatifs. Le premier transcrit, correspondant à la forme référencée (ici appelée FLE) code une protéine de la membrane golgienne possédant 359 acides aminés. Cette forme active est déplétée lors de l'infection et se localise comme attendu dans la fraction microsomale. L'isoforme I1, probablement issue de la traduction d'un transcrit où les exons 2 et 3 ne sont pas présents, s'avère également active. Elle est présente dans la fraction microsomale, bien que sa région transmembranaire soit probablement absente, ce qui suggère qu'elle pourrait être emprisonnée dans des vésicules. La troisième isoforme, appelée I2, ne posséderait pas de région transmembranaire, en raison de la suppression de l'exon 2. Elle est logiquement soluble. L'absence d'activité CMP-NeuAc : lactosylcéramide α 2,3 sialyltransférase dans cette fraction ne renfermant que l'isoforme I2 serait la conséquence de l'absence de l'exon 6, qui supprime la région en amont du sialylmotif S.

L'altération spécifique de ST3GalV, en particulier de ses isoformes FLE et I1, lors d'une infection, montre une régulation fine des taux de transcrits et des épissages. Associée aux processus infectieux du prion, l'altération des mécanismes d'épissage des messagers de *ST3GalV* met en lumière un échelon potentiel supplémentaire dans la chaîne de causalité liant la tremblante expérimentale et les défauts de biosynthèse des gangliosides constitutifs des rafts membranaires.

Discussion

I. Les altérations de la glycosylation, une conséquence des maladies à prions ?

La présence de protéines prions scrapie dans une cellule ou un organisme induit des troubles du fonctionnement cellulaire. Les évènements moléculaires consécutifs à l'apparition de PrP^{Sc} peuvent notamment être appréhendés par l'identification de gènes dont l'expression est modifiée lors de l'infection. Une telle méthodologie a été employée par plusieurs équipes (Dandoy-Dron *et al.* 1998, Dandoy-Dron *et al.* 2000, Kopacek *et al.* 2000, Park *et al.* 2000, Miele *et al.* 2001, Booth *et al.* 2004, Skretting *et al.* 2004). Ces études, réalisées principalement sur le SNC, ont mis en évidence plusieurs processus tels qu'une activation astrocytaire et microgliale (Dandoy-Dron *et al.* 1998) et l'engagement des lysosomes (Kopacek *et al.* 2000). Cependant, les gènes dont les produits sont impliqués dans la glycosylation, qui représentent entre 0,5 et 1% des gènes humains (Freeze 1998) n'ont à notre connaissance pas fait l'objet d'études particulières, et du fait de leur faible niveau d'expression, ne sont généralement pas analysables lors d'études exhaustives : c'est ainsi que seules les isoformes de la β -N-acétylhexosaminidase lysosomale ont été remarquées par ces différentes analyses (Kopacek *et al.* 2000), bien qu'il ait été suggéré que la machinerie de glycosylation soit altérée durant une ESST (Rudd *et al.* 1999, Rudd *et al.* 2001, Russelakis-Carneiro *et al.* 2002). Nous avons donc entrepris au laboratoire la création d'un microréseau d'ADN spécifiquement dédié à l'analyse de l'expression des gènes de la glycosylation. La nécessité d'un tel outil d'analyse a également été ressentie par d'autres spécialistes de la glycosylation, qui ont récemment créé un microréseau d'ADN similaire (Comelli *et al.* 2006).

L'utilisation de notre outil sur des lignées cellulaires dérivant de la région hypothalamo-hypophysaire infectées par des prions scrapie a mis en évidence une perturbation du métabolisme des GAG (Barret *et al.* 2005).

Les analyses que nous avons menées pour notre part sur le cerveau de souris n'ont pas montré de modifications significatives de l'expression de gènes précédemment mis en évidence dans les lignées cellulaires issues des Tg338. Cette contradiction n'est qu'apparente, et souligne en réalité la spécificité de réponse de chaque type cellulaire. Les observations

faites sur tissus totaux révèlent les réponses combinées de différents types cellulaires et masqueraient les réponses plus spécifiques de certaines sous-populations cellulaires.

Une altération de l'état de glycosylation a également été décrite lors d'analyses menées sur une autre lignée cellulaire (N2a et ScN2a) dérivée de neuroblastomes (Nielsen *et al.* 2004). Ces études décrivent une glycosylation anormale des sous-unités alpha et bêta du récepteur à l'insuline, ce qui prouve, s'il en était besoin, que des modifications de l'état de glycosylation ne sont pas seulement observables au niveau des *N*-glycannes de la PrP, mais peuvent toucher très spécifiquement d'autres composants cellulaires.

Toutes ces altérations de la glycosylation ont été décrites soit directement sur des tissus (Kopacek *et al.* 2000, Russelakis-Carneiro *et al.* 2002) ou sur les lignées cellulaires dérivées du SNC (Nielsen *et al.* 2004, Barret *et al.* 2005). Cependant, peu d'études sont basées sur l'analyse des modifications d'expression dans des organes du système lymphoréticulaire, telle que la rate, pourtant connus pour être impliqués dès le début de la maladie. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à analyser dans cet organe les modifications moléculaires engendrées par la présence de PrP^{Sc} dans l'organisme. Deux évènements moléculaires associés semblent importants dès les stades précoces de la maladie à prions : une sur-expression suivie d'une forte sous-expression de deux gènes (seulement) liés à la glycosylation : *ST3GalV* et *Pigq*.

L'analyse quantitative de l'expression des gènes *Pigq* et *ST3GalV* révèle une certaine variabilité entre individus dans les temps de réponse à l'infection. Cette variabilité n'est pas très surprenante car elle est également observée pour l'apparition des premiers signes cliniques précédant la mort des individus qui peut être décalée de quelques jours. Comme il est pour l'instant impossible de suivre les taux de transcrits de *Pigq* et *ST3GalV* et de protéines PrP^{Sc} sur un même individu au fil d'une ESST (!), les résultats présentés ne sont qu'une moyenne des données obtenues avec les différents individus testés. Ainsi, par exemple, à 30 jpi, deux souris d'intérêt sur trois sous-exprimaient *Pigq* et *ST3GalV*, alors que la troisième les sur-exprimait faiblement, laissant penser que cette souris a réagi moins rapidement que les deux autres à l'infection. Cependant, le profil général : faible sur-expression précoce suivie d'une sous-expression plus importante semble respecté pour chaque souris. La variabilité entre individus provient bien de la réponse à l'infection (et non à l'inoculation), les souris témoins ne présentant pas de modification d'expression.

Malgré les valeurs de sur- et sous-expressions, qui peuvent sembler faibles comparées aux ratios obtenus en culture cellulaire, nous considérons ces modifications comme importantes car elles ne touchent vraisemblablement pas tous les types cellulaires présents dans la rate. L'altération ciblée de l'expression de ces deux seuls gènes, dont les produits sont des enzymes clés respectivement impliquées dans la biosynthèse des gangliosides et des ancras GPI, ont certainement des répercussions non négligeables sur l'évolution de l'infection.

II. Les altérations de la glycosylation influent-elles sur l'évolution des maladies à prions ?

L'analyse des transcrits de *ST3GalV* a permis de dévoiler la présence d'épissages alternatifs qui semblent correspondre, même si cela doit être confirmé par immunoprécipitation, aux isoformes mises en évidence par western blot. Les trois isoformes FLE, I1 et I2 seraient issues respectivement de la traduction (1) du transcrit possédant les sept exons, (2) d'un transcrit où les exons 2 et 3 sont épissés, et (3) d'un transcrit ne possédant ni l'exon 2 ni l'exon 6. L'isoforme FLE correspond à la forme *ST3GalV* de référence : c'est une sialyltransférase golgienne, transmembranaire. Les deux isoformes supplémentaires, révélées par notre étude, n'ont plus leur domaine hydrophobe (domaine transmembranaire) en raison de l'épissage de l'exon 2. Les isoformes I1 et I2 ne sont donc pas ancrées dans la membrane golgienne. L'isoforme I1 est cependant détectée dans la fraction microsomale, tandis que l'isoforme I2 est retrouvée dans le cytosol (article 2).

D'autres auteurs (Stern et Tiemeyer 2001) avaient déjà rapporté la présence d'un pool de *ST3GalV* non golgienne, sans toutefois l'identifier. Son existence avait été mise en évidence dans les tissus cérébraux et cellules neuronales par l'utilisation d'un anticorps reconnaissant l'extrémité C-terminale de la protéine. Cependant, leur autre anticorps, dirigé contre les aa 227 à 272, soit la partie située en amont du sialylmotif S, ne détectait pas cette isoforme (Stern et Tiemeyer 2001). L'existence de transcrits alternatifs, mise en évidence dans la rate, rend envisageable l'hypothèse que cette isoforme de *ST3GalV* soit issue d'un

épissage spécifique, et en particulier une déplétion de l'exon 6, qui conduirait à la suppression de la partie située en amont du sialylmotif S.

De façon surprenante, des recherches chez la souris sur les homologues de la glilectine de *Drosophila* ont conduit à l'identification de ST3GalV (Stern *et al.* 2000). En effet, ces protéines ont une homologie significative dans la région située autour du sialylmotif S de ST3GalV. Le point commun entre ST3GalV et la glilectine étant leur intervention dans la synthèse ou la reconnaissance des glycolipides, il a été suggéré que la région à proximité du sialylmotif S était responsable de leur spécificité. L'isoforme I2 perdrait cette fonction, ce qui pourrait expliquer la faible activité GM3 synthase associée à la fraction soluble, où elle est observée (article 2). Plusieurs hypothèses sont envisageables : (1) I2 conserverait une faible activité α 2,3sialyltransférase, mais serait moins spécifique et pourrait reconnaître par exemple le motif Gal β 1,4 présent sur des protéines, les lipides... Cette fraction aurait alors un rôle dans l'état de sialylation de la cellule (2) la perte d'une partie du domaine catalytique déstabiliserait la structure générale de l'enzyme et la rendrait peu ou pas active. Elle pourrait alors avoir un rôle de lectine. Néanmoins, quelle que soit l'hypothèse privilégiée, l'expression de cette isoforme I2 étant peu modifiée lors d'une tremblante, son influence sur les maladies peut être considérée comme mineure.

Par contre, la décroissance des isoformes FLE et I1 lors d'une tremblante expérimentale peut avoir des répercussions sérieuses sur l'évolution de la maladie. L'isoforme FLE de la GM3 synthase est responsable de la synthèse, dans l'appareil de Golgi, du ganglioside GM3, ganglioside simple lui-même utilisé comme substrat pour la synthèse de la majorité des autres gangliosides (figure 15 page 101). La forte sous-expression de cette isoforme induit une diminution du taux de GM3 synthétisés. De ce fait, les souris atteintes de tremblante présentent un déficit en GM3 comparées à leurs homologues sains (article 1). Comme la majorité des autres gangliosides est synthétisée à partir du GM3 et que le GM3 est lui-même un ganglioside majeur des membranes cellulaires, les gangliosides totaux s'en trouvent également altérés. De plus, un effondrement de la quantité de glucosylcéramide, précurseur du lactosylcéramide, lui-même substrat du GM3 est mis en évidence (article 1). Cette chute de la quantité pourrait être mise en relation avec la propriété des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des gangliosides à s'organiser en complexes multienzymatiques (Giraudo et Maccioni 2003). Ainsi, la ST3GalV fait partie d'un complexe de trois enzymes comprenant la galactosyltransférase GalT1 (qui permet la synthèse du

LacCer à partir du GlcCer), et la sialyltransférase ST8SiaI (GD3 synthase)(Giraud et Maccioni 2003). Le déficit en ST3GalV suggère une déstabilisation de ce complexe multi-enzymatique, dont le substrat de départ, le glucosylcéramide s'accumulerait (figure 15 page 101). Par une rétro-inhibition liée au produit final, la synthèse de glucosylcéramides serait dans un second temps inhibée, d'où la forte diminution du taux de glucosylcéramide observée au stade terminal de la tremblante expérimentale (article 1).

La présence importante de glucosylcéramide dans les rafts contenant la protéine prion (5 fois plus importante que dans les rafts où est présente la protéine Thy-1, Brugger *et al.* 2004) associée à la forte représentation du ganglioside GM3 (qui représente 70% des gangliosides dans les cellules lymphoblastoïdes) suggère une modification drastique de l'environnement membranaire de la protéine prion lors d'une infection. Il est possible alors que les voies de biosynthèses alternatives (notamment de GalCer, figure 15 page 101) soit légèrement privilégiées, ce qui expliquerait que les analyses préliminaires des taux de gangliosides montrent que la diminution des gangliosides totaux est un peu moins faible que ce que l'on pouvait attendre (6,1% alors que la quantité de GM3, ganglioside majoritaire, diminue de 9,9%, article 1).

La déplétion de l'isoforme I1 peut également contribuer au bouleversement de la composition lipidique autour de la PrP. En effet, cette isoforme protéique, issue du transcrit où les exons 2 et 3 sont absents (ce qui supprime le domaine hydrophobe), conserve une région catalytique intacte. Son activité spécifique s'avère même supérieure à celle de FLE (article 2). En dépit de l'absence de région transmembranaire, cette isoforme retrouvée dans la fraction microsomale pourrait être séquestrée dans des vésicules. Nous n'excluons pas que I1 puisse être présente, comme la PrP, dans des exosomes. Quant à la fonction de I1, nous faisons l'hypothèse qu'elle participerait au maintien (remodelage) de la sialylation des gangliosides lors de leur trafic intracellulaire. En effet, les gangliosides présents à la surface cellulaire, sont, avec la PrP, endocytés via les vésicules à clathrine, et tout comme la protéine prion, peuvent être recyclés à la membrane cellulaire ou être dirigés vers les lysosomes pour être dégradés. L'effondrement de I1 lors de l'infection induirait un défaut de sialylation qui renforcerait l'effet de la déplétion de la forme FLE.

Les déplétions spécifiques des isoformes FLE et I1 induiraient donc un défaut de composition de l'environnement de la protéine prion et un réarrangement des rafts. La

déstabilisation de l'organisation membranaire pourrait agir sur la stabilité de la structure en hélices alpha de la PrP et altérer son rôle dans la transduction de signaux. En effet, la formation du complexe PrP-GM3, qui serait réalisé grâce au domaine V3-like de la PrP (Mahfoud *et al.* 2002), est vraisemblablement altérée en raison de la diminution de GM3. En absence de GM3 disponible, ce domaine pourrait servir à la liaison de la PrP avec le GalCer et la sphingomyéline (Mahfoud *et al.* 2002), ce qui expliquerait pourquoi ces deux composés sont détectés dans les agrégats de PrP (Klein *et al.* 1998), et non le GM3 qui en temps normal est pourtant bien représenté. Une conséquence, majeure, de la diminution de ce complexe GM3-PrP serait une perte de fonction de ce complexe de signalisation.

La signalisation membranaire via la PrP est également mise à mal par la déplétion de *Pigq*, second gène mis en évidence par nos analyses. La moindre expression de *Pigq* suggère que le complexe PI-GlcNAcTransférase est moins actif d'où un probable déficit de synthèse des ancras GPI. Dans ce complexe, l'activité catalytique est portée par la protéine *PigA*, *PigQ* ayant une fonction régulatrice. Une mutation somatique du gène *PIG-A* chez l'homme provoque une maladie, l'hémoglobinurie nocturne paroxystique (PNH). Dans cette maladie, la biosynthèse des ancras GPI est bloquée et les cellules affectées (les cellules du sang) n'expriment pas à la membrane les protéines habituellement glypiées. Ainsi, il a été montré que les cellules de patients atteints de PNH n'expriment plus de PrP^c membranaires, mais conservent un taux de PrP^c intracellulaires normal (Risitano *et al.* 2003). Il a été également suggéré que les protéines prion issues de ces cellules exprimeraient les formes transmembranaires ^{Ntm}PrP (Holada *et al.* 2002). Il est également possible que la proportion de PrP solubles soit augmentée. Contrairement au KO du gène *Piga* qui conduit à l'absence totale d'ancras GPI, l'inactivation du gène *Pigq* dans des cellules murines conduit à une forte diminution de la synthèse des ancras GPI, sans toutefois que la production soit totalement abolie (Hong *et al.* 1999). La sous-expression de *Pigq* que nous enregistrons lors d'une tremblante expérimentale suggère donc une diminution de la synthèse des ancras, ce qui entraînerait un déficit partiel en protéines glypiées et un excès de protéines solubles.

Les modifications d'expression de *ST3GalV* et *Pigq* observées dans la rate au stade sub-terminal de la tremblante expérimentale conduisent ainsi toutes deux à une réorganisation de la localisation membranaire de la protéine prion et à une altération de sa signalisation.

Il semble donc qu'il y ait une unité et une cohérence dans la dérégulation spécifique des gènes *Pigq* et *ST3GalV* au cours d'une tremblante expérimentale. Une hypothèse synthétique serait que la dérégulation de ces deux gènes pourrait être en rapport avec les voies de biosynthèse des sucres et des nucléotides-sucres. Ainsi, un défaut dans la disponibilité de l'UDP-GlcNAc, précurseur majeur du métabolisme des sucres, pourrait conduire par compensation, dans les phases précoces de l'infection, à la sur-expression de *Pigq*, gène régulateur de l'introduction de GlcNAc dans les ancrés GPI, et de *ST3GalV*. Le rapport avec *ST3GalV* est plus ténu. Outre le fait que l'UDP-GlcNAc est un précurseur du CMP-NeuAc, il existe un lien étroit entre le GM3 et le métabolisme des sucres, comme en témoigne le seul phénotype observable chez des souris ayant le gène *ST3GalV* invalidé : une sensibilité augmentée à l'insuline (Yamashita *et al.* 2003, Tagami *et al.* 2002). De façon intéressante, les récepteurs à l'insuline sont également touchés lors d'une l'infection à prions (Ostlund *et al.* 2001a, Ostlund *et al.* 2001b, Nielsen *et al.* 2004), ce qui laisse supposer l'existence d'une relation entre le GM3, l'insuline et le métabolisme des sucres.

Par ailleurs, des analyses préliminaires semblent indiquer que comme *Prnp*, les gènes *mST3GalV* et *mPigq* ne possèderaient pas dans leur région promotrice les boîtes canoniques TATA et CAAT (Xia *et al.* 2005). Par contre, plusieurs facteurs de transcription leurs sont communs, tels que CREB, HSF, AP-4 ou encore Sp1 (ce dernier ayant également des sites de fixation dans la région promotrice de *Prnp*). La régulation similaire de la transcription de *Pigq* et *ST3GalV* dans notre modèle de maladies à prions pourrait donc être liée à un facteur de transcription commun, qui conduirait dans un premier temps à la sur-expression des gènes, puis à leur sous-expression.

Dans le cerveau, un tel mécanisme pourrait également exister, mais avec un décalage important dans le temps, qui ne laisserait observer que la phase compensatrice de sur-expression des gènes concernés. En réponse au déficit en UDP-GlcNAc, le gène *Mgat3* serait sur-exprimé (voir partie II Résultats), mais la baisse de nucléotide-sucre donneur ne serait pas compensée par la sur-expression du gène, d'où l'augmentation du nombre d'antennes des *N*-glycannes observée par certains auteurs (Rudd *et al.* 1999).

Bien que les mécanismes régulateurs restent à identifier, la sous-expression des deux gènes *Pigq* et *ST3GalV*, qui est amorcée dans la rate avant l'apparition de protéines PrP^{Sc} dans le cerveau, est associée à l'augmentation exponentielle de la production de protéines scrapie

(et de ses oligomères) dans la rate. En effet, la présence de protéines prions glypiées et solubles serait un facteur accélérant significativement l'évolution de la tremblante (Aguzzi 2005, Chesebro *et al.* 2005). La sous-expression spécifique de *Pigq*, par la diminution de la synthèse des ancras GPI et non son abolition, assure précisément la présence simultanée de protéines prion glypiées et solubles. Les protéines non ancrées conservent la capacité de se transconformer, mais leur accumulation ne provoque pas de signes cliniques (Chesebro *et al.* 2005). Les PrP^c solubles, produits de la diminution de la synthèse des ancras GPI, seraient des substrats de PrP^{Sc}, qui, à la suite de leur transconformation pourraient s'accumuler et se propager. Le maintien d'un pool de PrP^c glypiées permet la production de PrP^{Sc} elles-mêmes glypiées, la formation de ces dernières étant favorisée par l'environnement membranaire altéré, hyposialylé, où la présence de gangliosides (et en particulier du ganglioside GM3) est réduite. La transduction de signaux via PrP^c serait donc non seulement amoindrie (ce qui ne provoque pas en lui-même de signaux pathologiques, comme le montre les souris KO), mais également altérée. En effet, en raison de la diminution de gangliosides GM3, le complexe comprenant la PrP^c et le GM3 serait moins représenté. Dans ce complexe, PrP^c pourrait être « remplacée » par la PrP^{Sc} et le GM3 par le GalCer ou la shingomyéline par exemple. La substitution des deux éléments (PrP^c et GM3) induirait la formation d'un complexe fonctionnel mais produisant une signalisation pathologique. L'altération du signal serait amplifiée au fur et à mesure des sous-expressions de *ST3GalV* et *Pigq*, ce qui favoriserait en retour leur propre sous-expression, et la production exponentielle de PrP scrapie. Une schématisation succincte des conséquences supposées des dérégulations de *ST3GalV* et *Pigq* est présentée page suivante (figure 19).

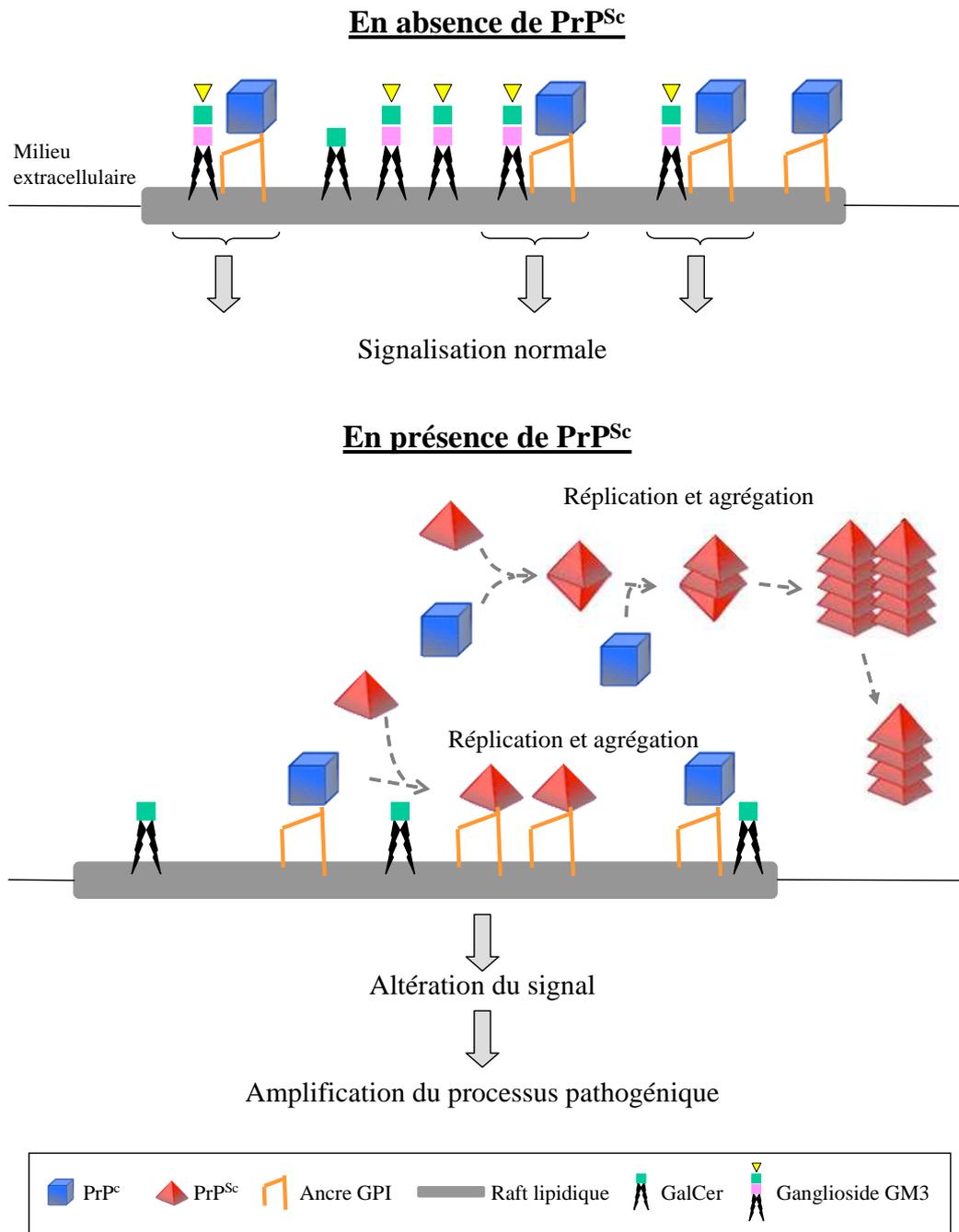


Figure 19 : Schéma illustrant l'impact potentiel des dérégulations des gènes *ST3GalV* et *Pigq* lors d'une tremblante expérimentale. En absence de PrP^{Sc}, la protéine prion cellulaire, glypiée, est présente dans les rafts où elle peut interagir avec le ganglioside GM3, dans un complexe de signalisation fonctionnel. En présence de PrP^{Sc}, la dérégulation de *Pigq* et des isoformes FLE et I1 de *ST3GalV* induit une déstabilisation des rafts lipidiques et une altération dans la transduction de signaux, par une moindre présence du complexe GM3-PrP^c et la présence de PrP^{Sc} glypiée. L'altération du signal favoriserait la poursuite et l'amplification du phénomène. De plus, la présence de PrP non ancrées permettrait un recrutement aisé pour la formation d'agrégats pathologiques et la dissémination de l'infection.

Conclusions-Perspectives

L'étude des modifications du glycotranscriptome a permis de mettre en évidence une altération spécifique de l'expression de deux gènes de la glycosylation dans les rates de souris développant une tremblante expérimentale. Ces deux gènes, *Pigq* et *ST3GalV*, sont régulés de manière similaire au cours de la maladie et semblent agir de concert dans la propagation de la pathologie. De plus, nous avons montré que la régulation fine de l'expression n'était pas seulement quantitative, mais également qualitative. Il en résulterait une augmentation de protéines prion solubles, une hyposialylation des glycolipides et probablement une déstabilisation des rafts lipidiques où est préférentiellement localisée la protéine prion. L'ensemble de ces altérations favoriserait l'établissement de signaux de transduction inhabituels et pathologiques, l'agrégation et la propagation de PrP^{Sc}. Le rôle des gangliosides dans les maladies à prions ne serait donc pas direct, ce qui explique pourquoi l'ajout de gangliosides ne semble pas modifier la capacité de conversion de PrP (Deleault *et al.* 2005) mais principalement indirect, via la composition membranaire des cellules infectées.

Les gangliosides des rafts ont déjà été impliqués dans une maladie neurodégénérative qui présente de nombreuses similarités avec les maladies à prions : la maladie d'Alzheimer. Par exemple, la liaison du β -amyloïde aux gangliosides conduit à une conformation transitoire du β amyloïde en une structure riche en feuilletts β (Ariga *et al.* 2001, Campana *et al.* 2005). Cette liaison semble nécessiter la présence d'un acide sialique en α 2,3 sur un cœur glycosphingolipide neutre (Ariga *et al.* 2001), liaison que ST3GalV est précisément capable de réaliser. Les analogies entre les maladies neurodégénératives conformationnelles pourraient donc être plus largement exploitées.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la présence d'acide sialique en α 2,3 semble favoriser la transconformation. Or il semble, d'après nos résultats, que dans le cadre des maladies à prions, ce soit la sous-représentation de cet acide sialique qui favoriserait la propagation de la maladie. Il serait donc intéressant de vérifier que la sur-expression de *ST3GalV* consécutive à l'inoculation de PrP^{Sc} exogènes modifie ou non la quantité de GM3 (ainsi que celle de LacCer et des autres gangliosides) et si l'augmentation putative des charges négatives qui serait engendrée par la sur-expression de ST3GalV favorise la transconformation de la PrP (Kuroda *et al.* 2003) ? De la même manière, la sur-expression précoce de *Pigq* est-elle compensatrice, ou a-t-elle un effet sur l'ancrage des protéines glypiées ?

Afin d'étudier plus finement les relations de causalité entre ces différents intervenants moléculaires, il serait utile d'identifier le ou les type(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans les modifications d'expression du glycogénome. Les cellules FDC sont des cibles potentielles, car elles sont impliquées dans la propagation des protéines prions, mais elles ne représentent que 1% des cellules des organes lymphoïdes secondaires (Parizek *et al.* 2001). Les modifications d'expression qui s'y déroulent sont soit extrêmement fortes (pour être mesurables sur un organe total comme nous l'observons), soit d'autres types cellulaires présentent également les mêmes variations. Les lymphocytes (ou cellules lymphoblastoïdes) pourraient aussi être impliquées, le complexe GM3-PrP ayant été détecté dans ces cellules (Mattei *et al.* 2002, Mattei *et al.* 2004).

Le travail en culture cellulaire devrait permettre une analyse plus fine des localisations subcellulaires de la protéine prion, mais également des isoformes FLE, I2 et surtout I1 de ST3GalV. Dans un premier temps, il faudrait authentifier le lien entre les transcrits alternatifs et les isoformes protéiques observées. Par la suite, des études d'ARN interférence par exemple pourraient permettre d'observer les conséquences des sous- (et sur-) expressions des gènes *Pigq* et *ST3GalV* sur la localisation cellulaire de la PrP, la composition des rafts lipidiques, la transconformation et l'accumulation de la PrP^{Sc}. De telles analyses conduiraient idéalement à la confirmation que l'élément initiateur des maladies à prions serait l'apparition (spontanée, exogène) de la protéine mal conformée. La présence de cette dernière dans des cellules spléniques induirait des modifications d'expression de gènes spécifiques, dont *ST3GalV* et *Pigq*. En retour, ces altérations favoriseraient la propagation de la forme infectieuse.

Références

- Adler, V., B. Zeiler, V. Kryukov, R. Kascsak, R. Rubenstein et A. Grossman (2003). "Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro." J Mol Biol **332**(1): 47-57.
- Aguzzi, A. et M. Polymenidou (2004). "Mammalian prion biology: one century of evolving concepts." Cell **116**(2): 313-27.
- Aguzzi, A. (2005). "Cell biology. Prion toxicity: all sail and no anchor." Science **308**(5727): 1420-1.
- Alper, T., D. A. Haig et M. C. Clarke (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." Biochem Biophys Res Commun **22**(3): 278-84.
- Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig et M. C. Clarke (1967). "Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?" Nature **214**(90): 764-6.
- Apetri, A. C., K. Surewicz et W. K. Surewicz (2004). "The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein." J Biol Chem **279**(17): 18008-14.
- Ariga, T., K. Kobayashi, A. Hasegawa, M. Kiso, H. Ishida et T. Miyatake (2001). "Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein." Arch Biochem Biophys **388**(2): 225-30.
- Arnold, M. E. et J. W. Wilesmith (2004). "Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain." Prev Vet Med **66**(1-4): 35-47.
- Azzalin, A., I. Del Vecchio, L. R. Chiarelli, G. Valentini, S. Comincini et L. Ferretti (2005). "Absence of interaction between doppel and GFAP, Grb2, PrPc proteins in human tumor astrocytic cells." Anticancer Res **25**(6B): 4369-74.
- Bainbridge, J. et K. B. Walker (2005). "The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses." Immunol Lett **96**(1): 147-50.
- Baldwin, M. A., F. E. Cohen et S. B. Prusiner (1995). "Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations." J Biol Chem **270**(33): 19197-200.
- Baldwin, M. A. (2005). "Analysis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors: the prion protein." Methods Enzymol **405**: 172-87.
- Baron, G. S., K. Wehrly, D. W. Dorward, B. Chesebro et B. Caughey (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**(5): 1031-40.
- Barret, A., L. Forestier, J. P. Deslys, R. Julien et P. F. Gallet (2005). "Glycosylation-related gene expression in prion diseases: PrPSc accumulation in scrapie infected GT1 cells

- depends on beta-1,4-linked GalNAc-4-SO₄ hyposulfation." J Biol Chem **280**(11): 10516-23.
- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner et C. Weissmann (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." Cell **46**(3): 417-28.
- Bastian, F. O. (2005). "Spiroplasma as a candidate agent for the transmissible spongiform encephalopathies." J Neuropathol Exp Neurol **64**(10): 833-8.
- Bate, C. et A. Williams (2004). "Role of glycosylphosphatidylinositols in the activation of phospholipase A2 and the neurotoxicity of prions." J Gen Virol **85**(Pt 12): 3797-804.
- Belay, E. D. et L. B. Schonberger (2005). "The public health impact of prion diseases." Annu Rev Public Health **26**: 191-212.
- Bennett, E. P., H. Hassan, U. Mandel, M. A. Hollingsworth, N. Akisawa, Y. Ikematsu, G. Merkx, A. G. van Kessel, S. Olofsson et H. Clausen (1999). "Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy." J Biol Chem **274**(36): 25362-70.
- Ben-Zaken, O., S. Tzaban, Y. Tal, L. Horonchik, J. D. Esko, I. Vlodayvsky et A. Taraboulos (2003). "Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions." J Biol Chem **278**(41): 40041-9.
- Beringue, V., F. Lamoury, K. T. Adjou, T. Maignien, M. Demoy, P. Couvreur et D. Dormont (2000). "Pharmacological manipulation of early PrPres accumulation in the spleen of scrapie-infected mice." Arch Virol Suppl(16): 39-56.
- Bocharova, O. V., L. Breydo, V. V. Salnikov, A. C. Gill et I. V. Baskakov (2005). "Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrPSc from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease." Protein Sci **14**(5): 1222-32.
- Bolton, D. C. et P. E. Bendheim (1988). "A modified host protein model of scrapie." Ciba Found Symp **135**: 164-81.
- Booth, S., C. Bowman, R. Baumgartner, G. Sorensen, C. Robertson, M. Coulthart, C. Phillipson et R. L. Somorjai (2004). "Identification of central nervous system genes involved in the host response to the scrapie agent during preclinical and clinical infection." J Gen Virol **85**(Pt 11): 3459-71.

- Bosques, C. J. et B. Imperiali (2003). "The interplay of glycosylation and disulfide formation influences fibrillization in a prion protein fragment." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7593-8.
- Bossers, A., P. Belt, G. J. Raymond, B. Caughey, R. de Vries et M. A. Smits (1997). "Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 4931-6.
- Bounhar, Y., Y. Zhang, C. G. Goodyer et A. LeBlanc (2001). "Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis." J Biol Chem **276**(42): 39145-9.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brewis, I. A., M. A. Ferguson, A. Mehlert, A. J. Turner et N. M. Hooper (1995). "Structures of the glycosyl-phosphatidylinositol anchors of porcine and human renal membrane dipeptidase. Comprehensive structural studies on the porcine anchor and interspecies comparison of the glycan core structures." J Biol Chem **270**(39): 22946-56.
- Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt et H. A. Kretzschmar (1997). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." Exp Neurol **146**(1): 104-12.
- Brown, D. R., B. S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S. J. Haswell et I. M. Jones (1999a). "Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase." Biochem J **344 Pt 1**: 1-5.
- Brown, D. R. (2005). "Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence." Folia Neuropathol **43**(4): 229-43.
- Brown, K. L., K. Stewart, D. L. Ritchie, N. A. Mabbott, A. Williams, H. Fraser, W. I. Morrison et M. E. Bruce (1999b). "Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1308-12.
- Brown, P., E. H. Rau, B. K. Johnson, A. E. Bacote, C. J. Gibbs, Jr. et D. C. Gajdusek (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**(7): 3418-21.
- Broxmeyer, L. (2004). "Is mad cow disease caused by a bacteria?" Med Hypotheses **63**(4): 731-9.

- Brugger, B., C. Graham, I. Leibrecht, E. Mombelli, A. Jen, F. Wieland et R. Morris (2004). "The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition." J Biol Chem **279**(9): 7530-6.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet et C. Weissmann (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**(6370): 577-82.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet et C. Weissmann (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**(7): 1339-47.
- Buschmann, A., A. G. Biacabe, U. Ziegler, A. Bencsik, J. Y. Madec, G. Erhardt, G. Luhken, T. Baron et M. H. Groschup (2004a). "Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests." J Virol Methods **117**(1): 27-36.
- Buschmann, A., G. Luhken, J. Schultz, G. Erhardt et M. H. Groschup (2004b). "Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR)." J Gen Virol **85**(Pt 9): 2727-33.
- Campana, V., D. Sarnataro et C. Zurzolo (2005). "The highways and byways of prion protein trafficking." Trends Cell Biol **15**(2): 102-11.
- Cancellotti, E., F. Wiseman, N. L. Tuzi, H. Baybutt, P. Monaghan, L. Aitchison, J. Simpson et J. C. Manson (2005). "Altered glycosylated PrP proteins can have different neuronal trafficking in brain but do not acquire scrapie-like properties." J Biol Chem **280**(52): 42909-18.
- Capellari, S., S. I. Zaidi, C. B. Urig, G. Perry, M. A. Smith et R. B. Petersen (1999). "Prion protein glycosylation is sensitive to redox change." J Biol Chem **274**(49): 34846-50.
- Cardone, F., Q. G. Liu, R. Petraroli, A. Ladogana, M. D'Alessandro, C. Arpino, M. Di Bari, G. Macchi et M. Pocchiari (1999). "Prion protein glycoform analysis in familial and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients." Brain Res Bull **49**(6): 429-33.
- Carlson, G. A., S. J. DeArmond, M. Torchia, D. Westaway et S. B. Prusiner (1994). "Genetics of prion diseases and prion diversity in mice." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **343**(1306): 363-9.
- Casalone, C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco et M. Caramelli (2004). "Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3065-70.

- Cashman, N. R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton et P. E. Bendheim (1990). "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." Cell **61**(1): 185-92.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz et C. Soto (2005a). "In vitro generation of infectious scrapie prions." Cell **121**(2): 195-206.
- Castilla, J., P. Saa et C. Soto (2005b). "Detection of prions in blood." Nat Med **11**(9): 982-5.
- Caughey, B., R. E. Race et B. Chesebro (1988). "Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines." J Gen Virol **69** (Pt 3): 711-6.
- Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes et W. S. Caughey (1991). "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy." Biochemistry **30**(31): 7672-80.
- Chen, P. Y., C. C. Lin, Y. T. Chang, S. C. Lin et S. I. Chan (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**(20): 12633-8.
- Chen, S. G., D. B. Teplow, P. Parchi, J. K. Teller, P. Gambetti et L. Autilio-Gambetti (1995). "Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases." J Biol Chem **270**(32): 19173-80.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, J. M. Keith et et al. (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain." Nature **315**(6017): 331-3.
- Chesebro, B., M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah et M. Oldstone (2005). "Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie." Science **308**(5727): 1435-9.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins et R. Linden (2002). "Cellular prion protein transduces neuroprotective signals." Embo J **21**(13): 3317-26.
- Chien, P., J. S. Weissman et A. H. DePace (2004). "Emerging principles of conformation-based prion inheritance." Annu Rev Biochem **73**: 617-56.
- Cole, R. N. et G. W. Hart (2001). "Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals." J Neurochem **79**(5): 1080-9.
- Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." Annu Rev Neurosci **24**: 519-50.

- Collins, S. J., V. A. Lawson et C. L. Masters (2004). "Transmissible spongiform encephalopathies." Lancet **363**(9402): 51-61.
- Comelli, E. M., S. R. Head, T. Gilmartin, T. Whisenant, S. M. Haslam, S. J. North, N. K. Wong, T. Kudo, H. Narimatsu, J. D. Esko, K. Drickamer, A. Dell et J. C. Paulson (2006). "A focused microarray approach to functional glycomics: transcriptional regulation of the glycome." Glycobiology **16**(2): 117-31.
- Comincini, S., M. G. Foti, M. A. Tranulis, D. Hills, G. Di Guardo, G. Vaccari, J. L. Williams, I. Harbitz et L. Ferretti (2001). "Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND)." Mamm Genome **12**(9): 729-33.
- Concepcion, G. P., M. P. David et E. A. Padlan (2005). "Why don't humans get scrapie from eating sheep? A possible explanation based on secondary structure predictions." Med Hypotheses **64**(5): 919-24.
- Concepcion, G. P. et E. A. Padlan (2005). "The codon for the methionine at position 129 (M129) in the human prion protein provides an alternative initiation site for translation and renders individuals homozygous for M129 more susceptible to prion disease." Med Hypotheses **65**(5): 865-7.
- Cordeiro, Y., F. Machado, L. Juliano, M. A. Juliano, R. R. Brentani, D. Foguel et J. L. Silva (2001). "DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation." J Biol Chem **276**(52): 49400-9.
- Cosseddu, G. M., A. Oustry-Vaiman, B. Jago, C. Moreno, S. Taourit, E. P. Cribiu, J. M. Elsen et D. Vaiman (2002). "Sheep/human comparative map in a chromosome region involved in scrapie incubation time shows multiple breakpoints between human chromosomes 14 and 15 and sheep chromosomes 7 and 18." Chromosome Res **10**(5): 369-78.
- Cotto, E., M. Andre, J. Fogue, H. J. Fleury et P. J. Babin (2005). "Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*)." Febs J **272**(2): 500-13.
- Dandoy-Dron, F., F. Guillo, L. Benboudjema, J. P. Deslys, C. Lasmezas, D. Dormont, M. G. Tovey et M. Dron (1998). "Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts." J Biol Chem **273**(13): 7691-7.

- Dandoy-Dron, F., L. Benboudjema, F. Guillo, A. Jaegly, C. Jasmin, D. Dormont, M. G. Tovey et M. Dron (2000). "Enhanced levels of scrapie responsive gene mRNA in BSE-infected mouse brain." Brain Res Mol Brain Res **76**(1): 173-9.
- Datta, A. K. et J. C. Paulson (1995). "The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc." J Biol Chem **270**(4): 1497-500.
- Datta, A. K., A. Sinha et J. C. Paulson (1998). "Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates." J Biol Chem **273**(16): 9608-14.
- Daude, N., M. Marella et J. Chabry (2003). "Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2775-9.
- Daude, N. (2004). "Prion diseases and the spleen." Viral Immunol **17**(3): 334-49.
- de Almeida, C. J., L. B. Chiarini, J. P. da Silva, E. S. PM, M. A. Martins et R. Linden (2005). "The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response." J Leukoc Biol **77**(2): 238-46.
- De Bosschere, H., S. Roels, P. Dechamps et E. Vanopdenbosch (2005). "TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance." Vet J.
- De Fea, K. A., D. H. Nakahara, M. C. Calayag, C. S. Yost, L. F. Mirels, S. B. Prusiner et V. R. Lingappa (1994). "Determinants of carboxyl-terminal domain translocation during prion protein biogenesis." J Biol Chem **269**(24): 16810-20.
- DeArmond, S. J., H. Sanchez, F. Yehiely, Y. Qiu, A. Ninchak-Casey, V. Daggett, A. P. Camerino, J. Cayetano, M. Rogers, D. Groth, M. Torchia, P. Tremblay, M. R. Scott, F. E. Cohen et S. B. Prusiner (1997). "Selective neuronal targeting in prion disease." Neuron **19**(6): 1337-48.
- DeArmond, S. J., Y. Qiu, H. Sanchez, P. R. Spilman, A. Ninchak-Casey, D. Alonso et V. Daggett (1999). "PrPc glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains." J Neuropathol Exp Neurol **58**(9): 1000-9.
- Deleault, N. R., R. W. Lucassen et S. Supattapone (2003). "RNA molecules stimulate prion protein conversion." Nature **425**(6959): 717-20.
- Deleault, N. R., J. C. Geoghegan, K. Nishina, R. Kasczak, R. A. Williamson et S. Supattapone (2005). "Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions." J Biol Chem **280**(29): 26873-9.

- Derrington, E., C. Gabus, P. Leblanc, J. Chnaidermann, L. Grave, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, D. Marck, P. Nandi et J. L. Darlix (2002). "PrPC has nucleic acid chaperoning properties similar to the nucleocapsid protein of HIV-1." C R Acad Sci III **325**(1): 17-23.
- Di Martino, A., J. Safar, L. Callegaro, N. Salem, Jr. et C. J. Gibbs, Jr. (1993). "Ganglioside composition changes in spongiform encephalopathies: analyses of 263K scrapie-infected hamster brains." Neurochem Res **18**(8): 907-13.
- Diaz, C., Z. G. Vitezica, R. Rupp, O. Andreoletti et J. M. Elsen (2005). "Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock." J Gen Virol **86**(Pt 3): 849-57.
- Dickinson, A. G. et D. M. Taylor (1978). "Resistance of scrapie agent to decontamination." N Engl J Med **299**(25): 1413-4.
- Dickinson, A. G. et G. W. Outram (1988). "Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis." Ciba Found Symp **135**: 63-83.
- Doh-ura, K., T. Kitamoto, Y. Sakaki et J. Tateishi (1991). "CJD discrepancy." Nature **353**(6347): 801-2.
- Dormont, D. (1999). "Agents that cause transmissible subacute spongiform encephalopathies." Biomed Pharmacother **53**(1): 3-8.
- Eberl, H., P. Tittmann et R. Glockshuber (2004). "Characterization of recombinant, membrane-attached full-length prion protein." J Biol Chem **279**(24): 25058-65.
- Eghiaian, F., J. Grosclaude, S. Lesceu, P. Debey, B. Doublet, E. Treguer, H. Rezaei et M. Knossow (2004). "Insight into the PrPC-->PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10254-9.
- Elsen, J. M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J. V. Khang, J. P. Poivey, F. Lantier et J. L. Laplanche (1999). "Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov." Arch Virol **144**(3): 431-45.
- Emiliani, C., L. Urbanelli, L. Racanicchi, A. Orlacchio, G. Pelicci, S. Sorbi et G. Bernardi (2003). "Up-regulation of glycohydrolases in Alzheimer's Disease fibroblasts correlates with Ras activation." J Biol Chem **278**(40): 38453-60.

- Endo, T., D. Groth, S. B. Prusiner et A. Kobata (1989). "Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein." Biochemistry **28**(21): 8380-8.
- Ermonval, M., S. Mouillet-Richard, P. Codogno, O. Kellermann et J. Botti (2003). "Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications." Biochimie **85**(1-2): 33-45.
- Ersdal, C., M. J. Ulvund, A. Espenes, S. L. Benestad, P. Sarradin et T. Landsverk (2005). "Mapping PrPSc propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes." Vet Pathol **42**(3): 258-74.
- Everest, S. J., L. Thorne, D. A. Barnicle, J. C. Edwards, H. Elliott, R. Jackman et J. Hope (2006). "Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme." J Gen Virol **87**(Pt 2): 471-7.
- Fantini, J., N. Garmy, R. Mahfoud et N. Yahi (2002). "Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases." Expert Rev Mol Med **2002**: 1-22.
- Fevrier, B., D. Vilette, H. Laude et G. Raposo (2005). "Exosomes: a bubble ride for prions?" Traffic **6**(1): 10-7.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani et F. Tagliavini (1993). "Neurotoxicity of a prion protein fragment." Nature **362**(6420): 543-6.
- Forloni, G. (2004) "The contribution of the immune system to prion disease" Drug Discovery Today: Disease Mechanisms **1**(3): 351-355
- Fornai, F., M. Ferrucci, M. Gesi, A. B. di Poggio, F. S. Giorgi, F. Biagioni et A. Paparelli (2006). "A hypothesis on prion disorders: Are infectious, inherited, and sporadic causes so distinct?" Brain Res Bull **69**(2): 95-100.
- Fournier, J. G., F. Escaig-Haye et V. Grigoriev (2000). "Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications." Microsc Res Tech **50**(1): 76-88.
- Fraser, H. et A. G. Dickinson (1970). "Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen." Nature **226**(5244): 462-3.
- Frederikse, P. H., S. J. Zigler, Jr., P. N. Farnsworth et D. A. Carper (2000). "Prion protein expression in mammalian lenses." Curr Eye Res **20**(2): 137-43.
- Freeze, H. H. (1998). "Disorders in protein glycosylation and potential therapy: tip of an iceberg?" J Pediatr **133**(5): 593-600.

- Gabriel, J. M., B. Oesch, H. Kretzschmar, M. Scott et S. B. Prusiner (1992). "Molecular cloning of a candidate chicken prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9097-101.
- Gabus, C., S. Auxilien, C. Pechoux, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W. Surewicz, P. Nandi et J. L. Darlix (2001a). "The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein." J Mol Biol **307**(4): 1011-21.
- Gabus, C., E. Derrington, P. Leblanc, J. Chnaiderman, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W. K. Surewicz, D. Marc, P. Nandi et J. L. Darlix (2001b). "The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1." J Biol Chem **276**(22): 19301-9.
- Garcion, E., B. Wallace, L. Pelletier et D. Wion (2004). "RNA mutagenesis and sporadic prion diseases." J Theor Biol **230**(2): 271-4.
- Garnett, A. P. et J. H. Viles (2003). "Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism." J Biol Chem **278**(9): 6795-802.
- Garnett, A. P., C. E. Jones et J. H. Viles (2006). "A survey of diamagnetic probes for copper(2+) binding to the prion protein. (1)H NMR solution structure of the palladium(2+) bound single octarepeat." Dalton Trans(3): 509-18.
- Geldermann, H., S. Preuss, J. Eckert, Y. Han et K. Ollesch (2003). "Analysis of polymorphic microsatellites within the bovine and ovine prion protein (PRNP) genes." Anim Genet **34**(4): 283-9.
- Ghani, A. C., N. M. Ferguson, C. A. Donnelly et R. M. Anderson (2003). "Factors determining the pattern of the variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) epidemic in the UK." Proc Biol Sci **270**(1516): 689-98.
- Gilch, S., K. F. Winklhofer, M. H. Groschup, M. Nunziante, R. Lucassen, C. Spielhauer, W. Muranyi, D. Riesner, J. Tatzelt et H. M. Schatzl (2001). "Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease." Embo J **20**(15): 3957-66.
- Gilch, S., C. Kehler et H. M. Schatzl (2006). "The prion protein requires cholesterol for cell surface localization." Mol Cell Neurosci **31**(2): 346-53.
- Giraud, C. G. et H. J. Maccioni (2003). "Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells." J Biol Chem **278**(41): 40262-71.

- Glatzel, M., F. L. Heppner, K. M. Albers et A. Aguzzi (2001). "Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion." Neuron **31**(1): 25-34.
- Glatzel, M., E. Abela, M. Maissen et A. Aguzzi (2003). "Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **349**(19): 1812-20.
- Goldmann, W., N. Hunter, T. Martin, M. Dawson et J. Hope (1991). "Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon." J Gen Virol **72** (Pt 1): 201-4.
- Goldmann, W., G. O'Neill, F. Cheung, F. Charleson, P. Ford et N. Hunter (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.
- Grahn, A., G. S. Barkhordar et G. Larson (2004). "Identification of seven new alpha2,3-sialyltransferase III, ST3Gal III, transcripts from human foetal brain." Glycoconj J **20**(7-8): 493-500.
- Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, O. V. Forlenza, A. L. Cabral, S. S. Veiga, M. A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V. R. Martins et R. R. Brentani (2000). "Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis." Brain Res Mol Brain Res **76**(1): 85-92.
- Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." Nature **215**(105): 1043-4.
- Gu, Y., J. Hinnerwisch, R. Fredricks, S. Kalepu, R. S. Mishra et N. Singh (2003). "Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein." Neurobiol Dis **12**(2): 133-49.
- Guevara, J., B. Espinosa, E. Zenteno, L. Vazquez, J. Luna, G. Perry et R. Mena (1998). "Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **57**(10): 905-14.
- Guinez, C., W. Morelle, J. C. Michalski et T. Lefebvre (2005). "O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?" Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 765-74.
- Haik, S., B. A. Faucheux et J. J. Hauw (2004). "Brain targeting through the autonomous nervous system: lessons from prion diseases." Trends Mol Med **10**(3): 107-12.
- Harris, D. A., D. L. Falls, F. A. Johnson et G. D. Fischbach (1991). "A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7664-8.

- Hay, B., R. A. Barry, I. Lieberburg, S. B. Prusiner et V. R. Lingappa (1987). "Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1987 May;7(5):2035]." *Mol Cell Biol* **7**(2): 914-20.
- Heaton, M. P., K. A. Leymaster, B. A. Freking, D. A. Hawk, T. P. Smith, J. W. Keele, W. M. Snelling, J. M. Fox, C. G. Chitko-McKown et W. W. Laegreid (2003). "Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer." *Mamm Genome* **14**(11): 765-77.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner et V. R. Lingappa (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." *Science* **279**(5352): 827-34.
- Helenius, A. et M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* **291**(5512): 2364-9.
- Herms, J., T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schurmann, O. Windl, N. Brose et H. Kretzschmar (1999). "Evidence of presynaptic location and function of the prion protein." *J Neurosci* **19**(20): 8866-75.
- Hetz, C., M. Russelakis-Carneiro, S. Walchli, S. Carboni, E. Vial-Knecht, K. Maundrell, J. Castilla et C. Soto (2005). "The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity." *J Neurosci* **25**(11): 2793-802.
- Herzog, C., J. Riviere, N. Lescoutra-Etchegaray, A. Charbonnier, V. Leblanc, N. Sales, J. P. Deslys et C. I. Lasmezas (2005). "PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease." *J Virol* **79**(22): 14339-45.
- Hetz, C., M. Russelakis-Carneiro, S. Walchli, S. Carboni, E. Vial-Knecht, K. Maundrell, J. Castilla et C. Soto (2005). "The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity." *J Neurosci* **25**(11): 2793-802.
- Hijazi, N., Z. Kariv-Inbal, M. Gasset et R. Gabizon (2005). "PrPSc incorporation to cells requires endogenous glycosaminoglycan expression." *J Biol Chem* **280**(17): 17057-61.
- Hill, A. F., S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P. L. Lantos et J. Collinge (2000). "Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10248-53.
- Holada, K., J. Simak, A. M. Risitano, J. Maciejewski, N. S. Young et J. G. Vostal (2002). "Activated platelets of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria express cellular prion protein." *Blood* **100**(1): 341-3.

- Hong, Y., K. Ohishi, R. Watanabe, Y. Endo, Y. Maeda et T. Kinoshita (1999). "GPI1 stabilizes an enzyme essential in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis." J Biol Chem **274**(26): 18582-8.
- Horiuchi, M., N. Yamazaki, T. Ikeda, N. Ishiguro et M. Shinagawa (1995). "A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep." J Gen Virol **76** (Pt 10): 2583-7.
- Horiuchi, M., N. Ishiguro, H. Nagasawa, Y. Toyoda et M. Shinagawa (1997). "Alternative usage of exon 1 of bovine PrP mRNA." Biochem Biophys Res Commun **233**(3): 650-4.
- Hornemann, S., C. Schorn et K. Wuthrich (2004). "NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains." EMBO Rep **5**(12): 1159-64.
- Hornshaw, M. P., J. R. McDermott, J. M. Candy et J. H. Lakey (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides." Biochem Biophys Res Commun **214**(3): 993-9.
- Huang, F. P. et G. G. MacPherson (2004). "Dendritic cells and oral transmission of prion diseases." Adv Drug Deliv Rev **56**(6): 901-13.
- Huang, Z., S. B. Prusiner et F. E. Cohen (1996). "Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment." Fold Des **1**(1): 13-9.
- Humeny, A., K. Schiebel, S. Seeber et C. M. Becker (2002). "Identification of polymorphisms within the bovine prion protein gene (Prnp) by DNA sequencing and genotyping by MALDI-TOF-MS." Neurogenetics **4**(1): 59-60.
- Hundt, C., J. M. Peyrin, S. Haik, S. Gauczynski, C. Leucht, R. Rieger, M. L. Riley, J. P. Deslys, D. Dormont, C. I. Lasmezas et S. Weiss (2001). "Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor." Embo J **20**(21): 5876-86.
- Hunter, N. (1997). "PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE." Trends Microbiol **5**(8): 331-4.
- Hunter, N. (2003). "Scrapie and experimental BSE in sheep." Br Med Bull **66**: 171-83.
- Hutter, G., F. L. Heppner et A. Aguzzi (2003). "No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo." Biol Chem **384**(9): 1279-85.
- Ierna, M., C. F. Farquhar, G. W. Outram et M. E. Bruce (2006). "Resistance of neonatal mice to scrapie is associated with inefficient infection of the immature spleen." J Virol **80**(1): 474-82.

- Inoue, S., M. Tanaka, M. Horiuchi, N. Ishiguro et M. Shinagawa (1997). "Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron." J Vet Med Sci **59**(3): 175-83.
- Ironside, J. W., D. L. Ritchie et M. W. Head (2005). "Phenotypic variability in human prion diseases." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(6): 565-79.
- Ishii, A., M. Ohta, Y. Watanabe, K. Matsuda, K. Ishiyama, K. Sakoe, M. Nakamura, J. Inokuchi, Y. Sanai et M. Saito (1998). "Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase." J Biol Chem **273**(48): 31652-5.
- Ishikura, N., J. L. Clever, E. Bouzamondo-Bernstein, E. Samayoa, S. B. Prusiner, E. J. Huang et S. J. DeArmond (2005). "Notch-1 activation and dendritic atrophy in prion disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 886-91.
- Jackson, G. S., I. Murray, L. L. Hosszu, N. Gibbs, J. P. Waltho, A. R. Clarke et J. Collinge (2001). "Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8531-5.
- Jarrett, J. T. et P. T. Lansbury, Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" Cell **73**(6): 1055-8.
- Jeanneau, C., V. Chazalet, C. Auge, D. M. Soumpasis, A. Harduin-Lepers, P. Delannoy, A. Imberty et C. Breton (2004). "Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif." J Biol Chem **279**(14): 13461-8.
- Jeffrey, M., G. McGovern, S. Martin, C. M. Goodsir et K. L. Brown (2000). "Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep." Arch Virol Suppl(16): 23-38.
- Jeong, B. H., H. J. Sohn, J. O. Lee, N. H. Kim, J. I. Kim, S. Y. Lee, I. S. Cho, Y. S. Joo, R. I. Carp et Y. S. Kim (2005). "Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) and Holstein cattle." Genes Genet Syst **80**(4): 303-8.
- Jin, T., Y. Gu, G. Zanusso, M. Sy, A. Kumar, M. Cohen, P. Gambetti et N. Singh (2000). "The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome." J Biol Chem **275**(49): 38699-704.
- Joling, P., L. J. Bakker, J. A. Van Strijp, T. Meerloo, L. de Graaf, M. E. Dekker, J. Goudsmit, J. Verhoef et H. J. Schuurman (1993). "Binding of human immunodeficiency virus

- type-1 to follicular dendritic cells in vitro is complement dependent." J Immunol **150**(3): 1065-73.
- Jones, C. E., S. R. Abdelraheim, D. R. Brown et J. H. Viles (2004). "Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein." J Biol Chem **279**(31): 32018-27.
- Kaneko, K., D. Peretz, K. M. Pan, T. C. Blochberger, H. Wille, R. Gabizon, O. H. Griffith, F. E. Cohen, M. A. Baldwin et S. B. Prusiner (1995). "Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11160-4.
- Kaneko, K., M. Vey, M. Scott, S. Pilkuhn, F. E. Cohen et S. B. Prusiner (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**(6): 2333-8.
- Kapitonov, D., E. Bieberich et R. K. Yu (1999). "Combinatorial PCR approach to homology-based cloning: cloning and expression of mouse and human GM3-synthase." Glycoconj J **16**(7): 337-50.
- Kasper, K. C., D. P. Stites, K. A. Bowman, H. Panitch et S. B. Prusiner (1982). "Immunological studies of scrapie infection." J Neuroimmunol **3**(3): 187-201.
- Kazlauskaite, J. et T. J. Pinheiro (2005). "Aggregation and fibrillization of prions in lipid membranes." Biochem Soc Symp(72): 211-22.
- Kazlauskaite, J., A. Young, C. E. Gardner, J. V. Macpherson, C. Venien-Bryan et T. J. Pinheiro (2005). "An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 292-305.
- Kiachopoulos, S., J. Heske, J. Tatzelt et K. F. Winklhofer (2004). "Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis, intracellular retention and degradation." Traffic **5**(6): 426-36.
- Kiachopoulos, S., A. Bracher, K. F. Winklhofer et J. Tatzelt (2005). "Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor." J Biol Chem **280**(10): 9320-9.
- Kiguchi, K., C. B. Henning-Chubb et E. Huberman (1990). "Glycosphingolipid patterns of peripheral blood lymphocytes, monocytes, and granulocytes are cell specific." J Biochem (Tokyo) **107**(1): 8-14.

- Kimberlin, R. H. (1990). "Transmissible encephalopathies in animals." Can J Vet Res **54**(1): 30-7.
- King, A., L. Doey, M. Rossor, S. Mead, J. Collinge et P. Lantos (2003). "Phenotypic variability in the brains of a family with a prion disease characterized by a 144-base pair insertion in the prion protein gene." Neuropathol Appl Neurobiol **29**(2): 98-105.
- Klein, M. A., P. S. Kaeser, P. Schwarz, H. Weyd, I. Xenarios, R. M. Zinkernagel, M. C. Carroll, J. S. Verbeek, M. Botto, M. J. Walport, H. Molina, U. Kalinke, H. Acha-Orbea et A. Aguzzi (2001). "Complement facilitates early prion pathogenesis." Nat Med **7**(4): 488-92.
- Klein, T. R., D. Kirsch, R. Kaufmann et D. Riesner (1998). "Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry." Biol Chem **379**(6): 655-66.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury et B. Caughey (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." Nature **370**(6489): 471-4.
- Kono, M., S. Takashima, H. Liu, M. Inoue, N. Kojima, Y. C. Lee, T. Hamamoto et S. Tsuji (1998). "Molecular cloning and functional expression of a fifth-type alpha 2,3-sialyltransferase (mST3Gal V: GM3 synthase)." Biochem Biophys Res Commun **253**(1): 170-5.
- Kopacek, J., S. Sakaguchi, K. Shigematsu, N. Nishida, R. Atarashi, R. Nakaoke, R. Moriuchi, M. Niwa et S. Katamine (2000). "Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease." J Virol **74**(1): 411-7.
- Krebs, B., C. Dorner-Ciossek, R. Schmalzbauer, N. Vassallo, J. Herms et H. A. Kretzschmar (2006). "Prion protein induced signaling cascades in monocytes." Biochem Biophys Res Commun **340**(1): 13-22.
- Krishnan, R. et S. L. Lindquist (2005). "Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity." Nature **435**(7043): 765-72.
- Kuroda, Y., Y. Maeda, S. Sawa, K. Shibata, K. Miyamoto et T. Nakagawa (2003). "Effects of detergents on the secondary structures of prion protein peptides as studied by CD spectroscopy." J Pept Sci **9**(4): 212-20.
- Labat, M. L. (1997). "Possible retroviral origin of prion diseases." Med Hypotheses **49**(6): 461-4.

- Labat, M. L. (1999). "Possible retroviral origin of prion disease: could prion disease be reconsidered as a preleukemia syndrome?" Biomed Pharmacother **53**(1): 47-53.
- Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J. M. Peyrin, J. G. Fournier, J. J. Hauw, J. Rossier et D. Dormont (1997). "Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein." Science **275**(5298): 402-5.
- Lasmezas, C. I., J. G. Fournier, V. Nouvel, H. Boe, D. Marce, F. Lamoury, N. Kopp, J. J. Hauw, J. Ironside, M. Bruce, D. Dormont et J. P. Deslys (2001). "Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-- Jakob disease: implications for human health." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4142-7.
- Lawson, V. A., S. A. Priola, K. Wehrly et B. Chesebro (2001). "N-terminal truncation of prion protein affects both formation and conformation of abnormal protease-resistant prion protein generated in vitro." J Biol Chem **276**(38): 35265-71.
- Le Dur, A., V. Beringue, O. Andreoletti, F. Reine, T. L. Lai, T. Baron, B. Bratberg, J. L. Vilotte, P. Sarradin, S. L. Benestad et H. Laude (2005). "A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 16031-6.
- Leblanc, P., D. Baas et J. L. Darlix (2004). "Analysis of the interactions between HIV-1 and the cellular prion protein in a human cell line." J Mol Biol **337**(4): 1035-51.
- Ledoux, J. M. (2005). "Effects on the serotonergic system in sub-acute transmissible spongiform encephalopathies: current data, hypotheses, suggestions for experimentation." Med Hypotheses **64**(5): 910-8.
- Lee, I. Y., D. Westaway, A. F. Smit, K. Wang, J. Seto, L. Chen, C. Acharya, M. Ankener, D. Baskin, C. Cooper, H. Yao, S. B. Prusiner et L. E. Hood (1998). "Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species." Genome Res **8**(10): 1022-37.
- Lee, K. S., A. C. Magalhaes, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins et M. A. Prado (2001). "Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells." J Neurochem **79**(1): 79-87.
- Lefebvre, T., C. Guinez, V. Dehennaut, O. Beseme-Dekeyser, W. Morelle et J. C. Michalski (2005). "Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?" Expert Rev Proteomics **2**(2): 265-75.

- Leffers, K. W., J. Schell, K. Jansen, R. Lucassen, T. Kaimann, L. Nagel-Steger, J. Tatzelt et D. Riesner (2004). "The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites." J Mol Biol **344**(3): 839-53.
- Legname, G., I. V. Baskakov, H. O. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond et S. B. Prusiner (2004). "Synthetic mammalian prions." Science **305**(5684): 673-6.
- Lehmann, S. et D. A. Harris (1997). "Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells." J Biol Chem **272**(34): 21479-87.
- Leliveld, S. R., R. T. Dame, G. J. Wuite, L. Stitz et C. Korth (2006). "The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions." J Biol Chem **281**(6): 3268-75.
- Li, R., D. Liu, G. Zanusso, T. Liu, J. D. Fayen, J. H. Huang, R. B. Petersen, P. Gambetti et M. S. Sy (2001). "The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes." Cell Immunol **207**(1): 49-58.
- Liemann, S. et R. Glockshuber (1999). "Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein." Biochemistry **38**(11): 3258-67.
- Loberto, N., S. Prioni, A. Bettiga, V. Chigorno, A. Prinetti et S. Sonnino (2005). "The membrane environment of endogenous cellular prion protein in primary rat cerebellar neurons." J Neurochem **95**(3): 771-83.
- Lorenz, H., O. Windl et H. A. Kretzschmar (2002). "Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases." J Biol Chem **277**(10): 8508-16.
- Lysek, D. A., C. Schorn, L. G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolari, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Guntert et K. Wuthrich (2005). "Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 640-5.
- Ma, J. et S. Lindquist (2002). "Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol." Science **298**(5599): 1785-8.
- Ma, J., R. Wollmann et S. Lindquist (2002). "Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol." Science **298**(5599): 1781-5.
- Mabbott, N. A., K. L. Brown, J. Manson et M. E. Bruce (1997). "T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein." Immunology **92**(2): 161-5.

- Madec, J. Y., S. Simon, S. Lezmi, A. Bencsik, J. Grassi et T. Baron (2004). "Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock." J Gen Virol **85**(Pt 11): 3483-6.
- Maguire, T. M. et K. C. Breen (1995). "A decrease in neural sialyltransferase activity in Alzheimer's disease." Dementia **6**(4): 185-90.
- Mahal, S. P., E. A. Asante, M. Antoniou et J. Collinge (2001). "Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene." Gene **268**(1-2): 105-14.
- Mahfoud, R., N. Garmy, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver et J. Fantini (2002). "Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins." J Biol Chem **277**(13): 11292-6.
- Mange, A., O. Milhavet, H. E. McMahon, D. Casanova et S. Lehmann (2000). "Effect of amphotericin B on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells: putative mechanism of action in transmissible spongiform encephalopathies." J Neurochem **74**(2): 754-62.
- Mange, A., F. Beranger, K. Peoc'h, T. Onodera, Y. Frobert et S. Lehmann (2004). "Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein." Biol Cell **96**(2): 125-32.
- Manson, J., J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman et J. Hope (1992). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**(1): 117-22.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell et J. Hope (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." Mol Neurobiol **8**(2-3): 121-7.
- Manuelidis, L. (2003). "Transmissible encephalopathies: speculations and realities." Viral Immunol **16**(2): 123-39.
- Masel, J., V. A. Jansen et M. A. Nowak (1999). "Quantifying the kinetic parameters of prion replication." Biophys Chem **77**(2-3): 139-52.
- Masel, J., N. Genoud et A. Aguzzi (2005). "Efficient inhibition of prion replication by PrP-Fc(2) suggests that the prion is a PrP(Sc) oligomer." J Mol Biol **345**(5): 1243-51.
- Mattei, V., T. Garofalo, R. Misasi, C. Gizzi, M. T. Mascellino, V. Dolo, G. M. Pontieri, M. Sorice et A. Pavan (2002). "Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells." Neurochem Res **27**(7-8): 743-9.

- Mattei, V., T. Garofalo, R. Misasi, A. Circella, V. Manganelli, G. Lucania, A. Pavan et M. Sorice (2004). "Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation." FEBS Lett **560**(1-3): 14-8.
- McBride, P. A., P. Eikelenboom, G. Kraal, H. Fraser et M. E. Bruce (1992). "PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice." J Pathol **168**(4): 413-8.
- McCormack, J. E., H. N. Baybutt, D. Everington, R. G. Will, J. W. Ironside et J. C. Manson (2002). "PRNP contains both intronic and upstream regulatory regions that may influence susceptibility to Creutzfeldt-Jakob Disease." Gene **288**(1-2): 139-46.
- McKinley, M. P., B. Hay, V. R. Lingappa, I. Lieberburg et S. B. Prusiner (1987). "Developmental expression of prion protein gene in brain." Dev Biol **121**(1): 105-10.
- McMahon, H. E., A. Mange, N. Nishida, C. Creminon, D. Casanova et S. Lehmann (2001). "Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species." J Biol Chem **276**(3): 2286-91.
- Miele, G., J. Manson et M. Clinton (2001). "A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies." Nat Med **7**(3): 361-4.
- Miesbauer, M., T. Bamme, C. Riemer, B. Oidtmann, K. F. Winklhofer, M. Baier et J. Tatzelt (2006). "Prion protein-related proteins from zebrafish are complex glycosylated and contain a glycosylphosphatidylinositol anchor." Biochem Biophys Res Commun **341**(1): 218-24.
- Milhavet, O., H. E. McMahon, W. Rachidi, N. Nishida, S. Katamine, A. Mange, M. Arlotto, D. Casanova, J. Riondel, A. Favier et S. Lehmann (2000). "Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13937-42.
- Miura, T., A. Hori-i, H. Mototani et H. Takeuchi (1999). "Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence." Biochemistry **38**(35): 11560-9.
- Mobley, W. C., R. L. Neve, S. B. Prusiner et M. P. McKinley (1988). "Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9811-5.
- Mohan, J., M. E. Bruce et N. A. Mabbott (2005). "Follicular dendritic cell dedifferentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin." Immunology **114**(2): 225-34.

- Monnet, C., V. Marthiens, H. Enslin, Y. Frobert, A. Sobel et R. M. Mege (2003). "Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines." Eur J Neurosci **18**(3): 542-8.
- Moore, R. C., J. Hope, P. A. McBride, I. McConnell, J. Selfridge, D. W. Melton et J. C. Manson (1998). "Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent." Nat Genet **18**(2): 118-25.
- Moore, R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S. H. Pasternak, M. A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A. F. Smit, S. Katamine, G. A. Carlson, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. W. Melton, P. Tremblay, L. E. Hood et D. Westaway (1999). "Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel." J Mol Biol **292**(4): 797-817.
- Moreno, C. R., F. Lantier, I. Lantier, P. Sarradin et J. M. Elsen (2003). "Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice." Genetics **165**(4): 2085-91.
- Moscardini, M., M. Pistello, M. Bendinelli, D. Ficheux, J. T. Miller, C. Gabus, S. F. Le Grice, W. K. Surewicz et J. L. Darlix (2002). "Functional interactions of nucleocapsid protein of feline immunodeficiency virus and cellular prion protein with the viral RNA." J Mol Biol **318**(1): 149-59.
- Moudjou, M., Y. Frobert, J. Grassi et C. La Bonnardiere (2001). "Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures." J Gen Virol **82**(Pt 8): 2017-24.
- Moudjou, M., E. Treguer, H. Rezaei, E. Sabuncu, E. Neuendorf, M. H. Groschup, J. Grosclaude et H. Laude (2004). "Glycan-controlled epitopes of prion protein include a major determinant of susceptibility to sheep scrapie." J Virol **78**(17): 9270-6.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay et O. Kellermann (2000). "Signal transduction through prion protein." Science **289**(5486): 1925-8.
- Moya, K. L., R. Hassig, K. C. Breen, H. Volland et L. Di Giamberardino (2005). "Axonal transport of the cellular prion protein is increased during axon regeneration." J Neurochem **92**(5): 1044-53.
- Muller, H., A. Strom, G. Hunsmann et A. W. Stuke (2005). "Separation of native prion protein (PrP) glycoforms by copper-binding using immobilized metal affinity chromatography (IMAC)." Biochem J **388**(Pt 1): 371-8.

- Nakajima, M., T. Shimizu et T. Shirasawa (2000). "Notch-1 activation by familial Alzheimer's disease (FAD)-linked mutant forms of presenilin-1." J Neurosci Res **62**(2): 311-7.
- Nandi, P. K. et E. Leclerc (1999). "Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution." Arch Virol **144**(9): 1751-63.
- Nandi, P. K., E. Leclerc, J. C. Nicole et M. Takahashi (2002). "DNA-induced partial unfolding of prion protein leads to its polymerisation to amyloid." J Mol Biol **322**(1): 153-61.
- Naslavsky, N., R. Stein, A. Yanai, G. Friedlander et A. Taraboulos (1997). "Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform." J Biol Chem **272**(10): 6324-31.
- Naslavsky, N., H. Shmeeda, G. Friedlander, A. Yanai, A. H. Futerman, Y. Barenholz et A. Taraboulos (1999). "Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions." J Biol Chem **274**(30): 20763-71.
- Nielsen, D., H. Gyllberg, P. Ostlund, T. Bergman et K. Bedecs (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**(Pt 2): 571-9.
- Norstrom, E. M. et J. A. Mastrianni (2005). "The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrP^{Sc}-PrP^C complex that leads to prion propagation." J Biol Chem **280**(29): 27236-43.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood et et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-46.
- Oldstone, M. B., R. Race, D. Thomas, H. Lewicki, D. Homann, S. Smelt, A. Holz, P. Koni, D. Lo, B. Chesebro et R. Flavell (2002). "Lymphotoxin-alpha- and lymphotoxin-beta-deficient mice differ in susceptibility to scrapie: evidence against dendritic cell involvement in neuroinvasion." J Virol **76**(9): 4357-63.
- Okajima, T., H. H. Chen, H. Ito, M. Kiso, T. Tai, K. Furukawa et T. Urano (2000). "Molecular cloning and expression of mouse GD1alpha/GT1aalpha/GQ1balpha synthase (ST6GalNAc VI) gene." J Biol Chem **275**(10): 6717-23.

- O'Neill, G. T., D. Cairns, L. Toovey, W. Goldmann et N. Hunter (2005). "New ovine PrP gene haplotypes as a result of single nucleotide polymorphisms in the PrP gene promoter." J Anim Breed Genet **122**(2): 86-94.
- Orem, N. R., J. C. Geoghegan, N. R. Deleault, R. Kascsak et S. Supattapone (2006). "Copper (II) ions potently inhibit purified PrPres amplification." J Neurochem **96**(5): 1409-15.
- Ostlund, P., H. Lindegren, C. Pettersson et K. Bedecs (2001a). "Altered insulin receptor processing and function in scrapie-infected neuroblastoma cell lines." Brain Res Mol Brain Res **97**(2): 161-70.
- Ostlund, P., H. Lindegren, C. Pettersson et K. Bedecs (2001b). "Up-regulation of functionally impaired insulin-like growth factor-1 receptor in scrapie-infected neuroblastoma cells." J Biol Chem **276**(39): 36110-5.
- Owen, R. L., N. F. Pierce, R. T. Apple et W. C. Cray, Jr. (1986). "M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration." J Infect Dis **153**(6): 1108-18.
- Paisley, D., S. Banks, J. Selfridge, N. F. McLennan, A. M. Ritchie, C. McEwan, D. S. Irvine, P. T. Saunders, J. C. Manson et D. W. Melton (2004). "Male infertility and DNA damage in Doppel knockout and prion protein/Doppel double-knockout mice." Am J Pathol **164**(6): 2279-88.
- Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen et 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**(23): 10962-6.
- Pan, T., M. Colucci, B. S. Wong, R. Li, T. Liu, R. B. Petersen, S. Chen, P. Gambetti et M. S. Sy (2001). "Novel differences between two human prion strains revealed by two-dimensional gel electrophoresis." J Biol Chem **276**(40): 37284-8.
- Papakonstantinou, E., G. Karakiulakis, M. Roth, S. Vergheese-Nikolakaki, M. Dawson, O. Papadopoulos et T. Sklaviadis (1999). "Glycosaminoglycan analysis in brain stems from animals infected with the bovine spongiform encephalopathy agent." Arch Biochem Biophys **370**(2): 250-7.
- Parizek, P., C. Roeckl, J. Weber, E. Flechsig, A. Aguzzi et A. J. Raeber (2001). "Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells." J Biol Chem **276**(48): 44627-32.

- Park, K. W., J. S. Hahn, Q. Fan, D. Thiele et L. Li (2006). "De Novo Appearance and "Strain" Formation of Yeast Prion [PSI⁺] Are Regulated By the Heat Shock Transcription Factor." Genetics.
- Park, S. K., S. I. Choi, J. K. Jin, E. K. Choi, J. I. Kim, R. I. Carp et Y. S. Kim (2000). "Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent." Neuroreport **11**(8): 1677-82.
- Pastore, M., S. S. Chin, K. L. Bell, Z. Dong, Q. Yang, L. Yang, J. Yuan, S. G. Chen, P. Gambetti et W. Q. Zou (2005). "Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) with a Mutation at Codon 148 of Prion Protein Gene: Relationship with Sporadic CJD." Am J Pathol **167**(6): 1729-38.
- Patel, R. Y. et P. V. Balaji (2006). "Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases." Glycobiology **16**(2): 108-16.
- Pattison, I. H. et J. N. Jebbett (1971a). "Histopathological similarities between scrapie and cuprizone toxicity in mice." Nature **230**(5289): 115-7.
- Pattison, I. H. et J. N. Jebbett (1971b). "Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice." Res Vet Sci **12**(4): 378-80.
- Pauly, P. C. et D. A. Harris (1998). "Copper stimulates endocytosis of the prion protein." J Biol Chem **273**(50): 33107-10.
- Peden, A. H., M. W. Head, D. L. Ritchie, J. E. Bell et J. W. Ironside (2004). "Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient." Lancet **364**(9433): 527-9.
- Perera, W. S. et N. M. Hooper (2001). "Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region." Curr Biol **11**(7): 519-23.
- Peretz, D., R. A. Williamson, G. Legname, Y. Matsunaga, J. Vergara, D. R. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner et M. R. Scott (2002). "A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain." Neuron **34**(6): 921-32.
- Perini, F., R. Vidal, B. Ghetti, F. Tagliavini, B. Frangione et F. Prelli (1996). "PrP27-30 is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets." Biochem Biophys Res Commun **223**(3): 572-7.
- Peters, P. J., A. Mironov, Jr., D. Peretz, E. van Donselaar, E. Leclerc, S. Erpel, S. J. DeArmond, D. R. Burton, R. A. Williamson, M. Vey et S. B. Prusiner (2003).

- "Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway." J Cell Biol **162**(4): 703-17.
- Porto-Carreiro, I., B. Fevrier, S. Paquet, D. Vilette et G. Raposo (2005). "Prions and exosomes: from PrP^C trafficking to PrP^{Sc} propagation." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 143-8.
- Premzl, M., L. Sangiorgio, B. Strumbo, J. A. Marshall Graves, T. Simoncic et J. E. Gready (2003). "Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein." Gene **314**: 89-102.
- Preuss, U., X. Gu, T. Gu et R. K. Yu (1993). "Purification and characterization of CMP-N-acetylneuraminic acid:lactosylceramide (alpha 2-3) sialyltransferase (GM3-synthase) from rat brain." J Biol Chem **268**(35): 26273-8.
- Prinz, M., F. Montrasio, M. A. Klein, P. Schwarz, J. Priller, B. Odermatt, K. Pfeffer et A. Aguzzi (2002). "Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 919-24.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-44.
- Prusiner, S. B., D. C. Bolton, D. F. Groth, K. A. Bowman, S. P. Cochran et M. P. McKinley (1982). "Further purification and characterization of scrapie prions." Biochemistry **21**(26): 6942-50.
- Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson et et al. (1990). "Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication." Cell **63**(4): 673-86.
- Prusiner, S. B., M. R. Scott, S. J. DeArmond et F. E. Cohen (1998). "Prion protein biology." Cell **93**(3): 337-48.
- Quaglio, E., R. Chiesa et D. A. Harris (2001). "Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform." J Biol Chem **276**(14): 11432-8.
- Rachidi, W., J. Riondel, H. M. McMahon et A. Favier (2005). "[Prion protein and copper: a mysterious relationship]." Pathol Biol (Paris) **53**(4): 244-50.
- Re, L., F. Rossini, F. Re, M. Bordicchia, A. Mercanti, O. S. Fernandez et S. Barocci (2006). "Prion protein potentiates acetylcholine release at the neuromuscular junction." Pharmacol Res **53**(1): 62-8.

- Riek, R., G. Wider, M. Billeter, S. Hornemann, R. Glockshuber et K. Wuthrich (1998). "Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11667-72.
- Risitano, A. M., K. Holada, G. Chen, J. Simak, J. G. Vostal, N. S. Young et J. P. Maciejewski (2003). "CD34+ cells from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients are deficient in surface expression of cellular prion protein (PrPc)." Exp Hematol **31**(1): 65-72.
- Robertson, C., S. A. Booth, D. R. Beniac, M. B. Coulthart, T. F. Booth et A. McNicol (2006). "Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets." Blood **107**(10): 3907-11.
- Rodolfo, K., R. Hassig, K. L. Moya, Y. Frobert, J. Grassi et L. Di Giamberardino (1999). "A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport." Neuroreport **10**(17): 3639-44.
- Rogers, M., F. Yehiely, M. Scott et S. B. Prusiner (1993). "Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3182-6.
- Rohwer, R. G. (1984). "Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation." Nature **308**(5960): 658-62.
- Rossi, D., A. Cozzio, E. Flechsig, M. A. Klein, T. Rulicke, A. Aguzzi et C. Weissmann (2001). "Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain." Embo J **20**(4): 694-702.
- Rudd, P. M., T. Endo, C. Colominas, D. Groth, S. F. Wheeler, D. J. Harvey, M. R. Wormald, H. Serban, S. B. Prusiner, A. Kobata et R. A. Dwek (1999). "Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13044-9.
- Rudd, P. M., M. R. Wormald, D. R. Wing, S. B. Prusiner et R. A. Dwek (2001). "Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars." Biochemistry **40**(13): 3759-66.
- Russelakis-Carneiro, M., G. P. Saborio, L. Anderes et C. Soto (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**(39): 36872-7.
- Rybner, C., S. Finel-Szermanski, M. Felin, T. Sahraoui, C. Rousseau, J. G. Fournier, A. P. Seve et J. Botti (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**(2): 408-19.
- Sabuncu, E., S. Paquet, J. Chapuis, M. Moudjou, T. L. Lai, J. Grassi, U. Baron, H. Laude et D. Vilette (2005). "Prion proteins from susceptible and resistant sheep exhibit some distinct cell biological features." Biochem Biophys Res Commun **337**(3): 791-8.
- Saeki, K., Y. Matsumoto et T. Onodera (1996). "Identification of a promoter region in the rat prion protein gene." Biochem Biophys Res Commun **219**(1): 47-52.
- Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek et C. J. Gibbs, Jr. (1993). "Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein." J Biol Chem **268**(27): 20276-84.
- Safar, J. G., K. Kellings, A. Serban, D. Groth, J. E. Cleaver, S. B. Prusiner et D. Riesner (2005). "Search for a prion-specific nucleic acid." J Virol **79**(16): 10796-806.
- Saito, S., H. Aoki, A. Ito, S. Ueno, T. Wada, K. Mitsuzuka, M. Satoh, Y. Arai et T. Miyagi (2003). "Human alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal II) is a stage-specific embryonic antigen-4 synthase." J Biol Chem **278**(29): 26474-9.
- Sander, P., H. Hamann, I. Pfeiffer, W. Wemheuer, B. Brenig, M. H. Groschup, U. Ziegler, O. Distl et T. Leeb (2004). "Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds." Neurogenetics **5**(1): 19-25.
- Sander, P., H. Hamann, C. Drogemuller, K. Kashkevich, K. Schiebel et T. Leeb (2005). "Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility." J Biol Chem **280**(45): 37408-14.
- Sanghera, N. et T. J. Pinheiro (2002). "Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion." J Mol Biol **315**(5): 1241-56.
- Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyn'ska et M. Schachner (2005). "Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth." J Cell Biol **169**(2): 341-54.
- Sarnataro, D., V. Campana, S. Paladino, M. Stornaiuolo, L. Nitsch et C. Zurzolo (2004). "PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation." Mol Biol Cell **15**(9): 4031-42.
- Schneider, B., V. Mutel, M. Pietri, M. Ermonval, S. Mouillet-Richard et O. Kellermann (2003). "NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion

- protein signaling in neuronal and nonneuronal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13326-31.
- Schoch, G., H. Seeger, J. Bogousslavsky, M. Tolnay, R. C. Janzer, A. Aguzzi et M. Glatzel (2006). "Analysis of Prion Strains by PrP(Sc) Profiling in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease." PLoS Med **3**(2): e14.
- Scott, M. R., J. Safar, G. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F. E. Cohen, S. J. DeArmond et S. B. Prusiner (1997). "Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14279-84.
- Silveira, J. R., G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes et B. Caughey (2005). "The most infectious prion protein particles." Nature **437**(7056): 257-61.
- Simoncic, T., S. Duga, B. Strumbo, R. Asselta, F. Cecilianani et S. Ronchi (2000). "cDNA cloning of turtle prion protein." FEBS Lett **469**(1): 33-8.
- Simpson, M. A., H. Cross, C. Proukakis, D. A. Priestman, D. C. Neville, G. Reinkensmeier, H. Wang, M. Wiznitzer, K. Gurtz, A. Verganelaki, A. Pryde, M. A. Patton, R. A. Dwek, T. D. Butters, F. M. Platt et A. H. Crosby (2004). "Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase." Nat Genet **36**(11): 1225-9.
- Singh, N., G. Zanusso, S. G. Chen, H. Fujioka, S. Richardson, P. Gambetti et R. B. Petersen (1997). "Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation." J Biol Chem **272**(45): 28461-70.
- Singh, N., Y. Gu, S. Bose, S. Kalepu, R. S. Mishra et S. Verghese (2002). "Prion peptide 106-126 as a model for prion replication and neurotoxicity." Front Biosci **7**: a60-71.
- Skretting, G., A. Espenes, M. J. Ulvund et I. Olsaker (2004). "cDNA representational difference analysis of ileal Peyer's patches in lambs after oral inoculation with scrapie." Biochem Biophys Res Commun **316**(1): 272-9.
- Somerville, R. A., C. R. Birkett, C. F. Farquhar, N. Hunter, W. Goldmann, J. Dornan, D. Grover, R. M. Hennion, C. Percy, J. Foster et M. Jeffrey (1997). "Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows." J Gen Virol **78** (Pt 9): 2389-96.
- Somerville, R. A. (1999). "Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP." J Gen Virol **80** (Pt 7): 1865-72.

- Somerville, R. A., S. Hamilton et K. Fernie (2005). "Transmissible spongiform encephalopathy strain, PrP genotype and brain region all affect the degree of glycosylation of PrP^{Sc}." J Gen Virol **86**(Pt 1): 241-6.
- Sparkes, R. S., M. Simon, V. H. Cohn, R. E. Fournier, J. Lem, I. Klisak, C. Heinzmann, C. Blatt, M. Lucero, T. Mohandas et et al. (1986). "Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(19): 7358-62.
- Sponne, I., A. Fifre, V. Koziel, B. Kriem, T. Oster, J. L. Olivier et T. Pillot (2004). "Oligodendrocytes are susceptible to apoptotic cell death induced by prion protein-derived peptides." Glia **47**(1): 1-8.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao et S. B. Prusiner (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." Cell **51**(2): 229-40.
- Stahl, N. et S. B. Prusiner (1991). "Prions and prion proteins." Faseb J **5**(13): 2799-807.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, R. Hecker, K. M. Pan, A. L. Burlingame et S. B. Prusiner (1992). "Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid." Biochemistry **31**(21): 5043-53.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame et S. B. Prusiner (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.
- Stephenson, D. A., K. Chiotti, C. Ebeling, D. Groth, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner et G. A. Carlson (2000). "Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice." Genomics **69**(1): 47-53.
- Stern, C. A., T. R. Braverman et M. Tiemeyer (2000). "Molecular identification, tissue distribution and subcellular localization of mST3GalV/GM3 synthase." Glycobiology **10**(4): 365-74.
- Stern, C. A. et M. Tiemeyer (2001). "A ganglioside-specific sialyltransferase localizes to axons and non-Golgi structures in neurons." J Neurosci **21**(5): 1434-43.
- Stewart, R. S., B. Drisaldi et D. A. Harris (2001). "A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum." Mol Biol Cell **12**(4): 881-9.
- Stewart, R. S. et D. A. Harris (2001). "Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein." J Biol Chem **276**(3): 2212-20.

- Stimson, E., J. Hope, A. Chong et A. L. Burlingame (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**(15): 4885-95.
- Stockel, J. et F. U. Hartl (2001). "Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates." J Mol Biol **313**(4): 861-72.
- Strumbo, B., S. Ronchi, L. C. Bolis et T. Simonic (2001). "Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein." FEBS Lett **508**(2): 170-4.
- Sunyach, C., A. Jen, J. Deng, K. T. Fitzgerald, Y. Frobert, J. Grassi, M. W. McCaffrey et R. Morris (2003). "The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein." Embo J **22**(14): 3591-601.
- Tagami, S., J. Inokuchi Ji, K. Kabayama, H. Yoshimura, F. Kitamura, S. Uemura, C. Ogawa, A. Ishii, M. Saito, Y. Ohtsuka, S. Sakaue et Y. Igarashi (2002). "Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance." J Biol Chem **277**(5): 3085-92.
- Tanaka, M., P. Chien, N. Naber, R. Cooke et J. S. Weissman (2004). "Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences." Nature **428**(6980): 323-8.
- Taraboulos, A., M. Rogers, D. R. Borchelt, M. P. McKinley, M. Scott, D. Serban et S. B. Prusiner (1990). "Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8262-6.
- Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo, S. B. Prusiner et D. Avraham (1995). "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform." J Cell Biol **129**(1): 121-32.
- Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond et S. B. Prusiner (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." Cell **83**(1): 79-90.
- Thomzig, A., S. Spassov, M. Friedrich, D. Naumann et M. Beekes (2004). "Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein." J Biol Chem **279**(32): 33847-54.

- Tiede, A., R. J. Daniels, D. R. Higgs, Y. Mehrein, R. E. Schmidt et J. Schubert (2001). "The human GPII gene is required for efficient glycosylphosphatidylinositol biosynthesis." Gene **271**(2): 247-54.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride et J. C. Manson (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**(6575): 639-42.
- Toivonen, S., O. Aitio et O. Renkonen (2001). "alpha 2,3-Sialylation of terminal GalNAc beta 1-3Gal determinants by ST3Gal II reveals the multifunctionality of the enzyme. The resulting Neu5Ac alpha 2-3GalNAc linkage is resistant to sialidases from Newcastle disease virus and Streptococcus pneumoniae." J Biol Chem **276**(40): 37141-8.
- Toni, M., M. L. Massimino, C. Griffoni, B. Salvato, V. Tomasi et E. Spisni (2005). "Extracellular copper ions regulate cellular prion protein (PrPC) expression and metabolism in neuronal cells." FEBS Lett **579**(3): 741-4.
- Tournier, J. N. et A. Q. Hellmann (2003). "Neuro-immune connections: evidence for a neuro-immunological synapse." Trends Immunol **24**(3): 114-5.
- Vanik, D. L., K. A. Surewicz et W. K. Surewicz (2004). "Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions." Mol Cell **14**(1): 139-45.
- Varela-Nallar, L., E. M. Toledo, L. F. Larrondo, A. L. Cabral, V. R. Martins et N. C. Inestrosa (2006). "Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons." Am J Physiol Cell Physiol **290**(1): C271-81.
- Vassallo, N. et J. Herms (2003). "Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse." J Neurochem **86**(3): 538-44.
- Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S. J. DeArmond, E. J. Smart, R. G. Anderson, A. Taraboulos et S. B. Prusiner (1996). "Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14945-9.
- Vilotte, J. L., S. Soulier, R. Essalmani, M. G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J. C. Da Silva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M. F. Madelaine, S. Rakatobe, A. Le Dur, D. Vilette et H. Laude (2001). "Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp." J Virol **75**(13): 5977-84.

- Vorberg, I. et S. A. Priola (2002). "Molecular basis of scrapie strain glycoform variation." J Biol Chem **277**(39): 36775-81.
- Wadsworth, J. D., A. F. Hill, S. Joiner, G. S. Jackson, A. R. Clarke et J. Collinge (1999). "Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions." Nat Cell Biol **1**(1): 55-9.
- Waggoner, D. J., B. Drisaldi, T. B. Bartnikas, R. L. Casareno, J. R. Prohaska, J. D. Gitlin et D. A. Harris (2000). "Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level." J Biol Chem **275**(11): 7455-8.
- Walmsley, A. R., F. Zeng et N. M. Hooper (2001). "Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein." Embo J **20**(4): 703-12.
- Walmsley, A. R. et N. M. Hooper (2003). "Distance of sequons to the C-terminus influences the cellular N-glycosylation of the prion protein." Biochem J **370**(Pt 1): 351-5.
- Walmsley, A. R., F. Zeng et N. M. Hooper (2003). "The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant." J Biol Chem **278**(39): 37241-8.
- Warner, R. G., C. Hundt, S. Weiss et J. E. Turnbull (2002). "Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein." J Biol Chem **277**(21): 18421-30.
- Watanabe, R., N. Inoue, B. Westfall, C. H. Taron, P. Orlean, J. Takeda et T. Kinoshita (1998). "The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1." Embo J **17**(4): 877-85.
- Watanabe, R., Y. Murakami, M. D. Marmor, N. Inoue, Y. Maeda, J. Hino, K. Kangawa, M. Julius et T. Kinoshita (2000). "Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2." Embo J **19**(16): 4402-11.
- Watarai, M. (2004). "Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains." Microbes Infect **6**(1): 93-100.
- Watt, N. T., D. R. Taylor, A. Gillott, D. A. Thomas, W. S. Perera et N. M. Hooper (2005). "Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress." J Biol Chem **280**(43): 35914-21.
- Weissmann, C. (1991). "A 'unified theory' of prion propagation." Nature **352**(6337): 679-83.
- Westaway, D., S. J. DeArmond, J. Cayetano-Canlas, D. Groth, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, G. A. Carlson et S. B. Prusiner (1994). "Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins." Cell **76**(1): 117-29.

- Windl, O., M. Dempster, J. P. Estibeiro, R. Lathe, R. de Silva, T. Esmonde, R. Will, A. Springbett, T. A. Campbell, K. C. Sidle, M. S. Palmer et J. Collinge (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**(3): 259-64.
- Winklhofer, K. F., U. Heller, A. Reintjes et J. Tatzelt (2003a). "Inhibition of Complex Glycosylation Increases the Formation of PrPsc." Traffic **4**(5): 313-22.
- Winklhofer, K. F., J. Heske, U. Heller, A. Reintjes, W. Muranyi, I. Moarefi et J. Tatzelt (2003b). "Determinants of the in vivo folding of the prion protein. A bipartite function of helix 1 in folding and aggregation." J Biol Chem **278**(17): 14961-70.
- Wiseman, F., E. Cancellotti et J. Manson (2005). "Glycosylation and misfolding of PrP." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1094-5.
- Wolf, J. L. et W. A. Bye (1984). "The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system." Annu Rev Med **35**: 95-112.
- Wong, B. S., T. Pan, T. Liu, R. Li, P. Gambetti et M. S. Sy (2000). "Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 136-9.
- Yamashita, T., A. Hashiramoto, M. Haluzik, H. Mizukami, S. Beck, A. Norton, M. Kono, S. Tsuji, J. L. Daniotti, N. Werth, R. Sandhoff, K. Sandhoff et R. L. Proia (2003). "Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3445-9.
- Yamashita, T., Y. P. Wu, R. Sandhoff, N. Werth, H. Mizukami, J. M. Ellis, J. L. Dupree, R. Geyer, K. Sandhoff et R. L. Proia (2005). "Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2725-30.
- Xia, T., G. Zeng, L. Gao et R. K. Yu (2005). "Sp1 and AP2 enhance promoter activity of the mouse GM3-synthase gene." Gene **351**: 109-18.
- Ye, X. et R. I. Carp (1995). "The pathological changes in peripheral organs of scrapie-infected animals." Histol Histopathol **10**(4): 995-1021.
- Yedidia, Y., L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai et A. Taraboulos (2001). "Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein." Embo J **20**(19): 5383-91.

- Yost, C. S., C. D. Lopez, S. B. Prusiner, R. M. Myers et V. R. Lingappa (1990). "Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein." Nature **343**(6259): 669-72.
- Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider et K. Wuthrich (2000). "NMR solution structure of the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 145-50.
- Zanata, S. M., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, G. N. Hajj, L. B. Chiarini, R. Nomizo, A. R. Freitas, A. L. Cabral, K. S. Lee, M. A. Juliano, E. de Oliveira, S. G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R. R. Brentani et V. R. Martins (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." Embo J **21**(13): 3307-16.
- Zanusso et Monaco (2005). "Molecular mechanisms of human prion diseases." Drug Discovery Today: Disease Mechanims **2**(4): 511-518.
- Zeng, G., L. Gao, T. Xia, T. Tencomnao et R. K. Yu (2003). "Characterization of the 5'-flanking fragment of the human GM3-synthase gene." Biochim Biophys Acta **1625**(1): 30-5.
- Zhou, D., T. R. Henion, F. B. Jungalwala, E. G. Berger et T. Hennet (2000). "The beta 1,3-galactosyltransferase beta 3GalT-V is a stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) synthase." J Biol Chem **275**(30): 22631-4.
- Zou, W. Q., J. Zheng, D. M. Gray, P. Gambetti et S. G. Chen (2004). "Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1380-5.
- Zou, W. Q. et P. Gambetti (2005). "From microbes to prions the final proof of the prion hypothesis." Cell **121**(2): 155-7.
- Zuegg, J. et J. E. Gready (2000). "Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor." Glycobiology **10**(10): 959-74.

Valorisation des compétences, le nouveau
chapitre de la thèse

La rédaction du « nouveau chapitre de la thèse » est proposée par l'école doctorale Sciences-Technologie-Santé en collaboration avec l'association Bernard-Grégory. Il n'a pas un caractère académique, mais permet de faire un bilan du déroulement de la thèse en tant que projet. Cette analyse, qui se doit d'être compréhensible par des non-spécialistes du sujet de thèse, pourrait être exploitable dans la perspective d'une valorisation professionnelle de la thèse.

L'objectif de ce « nouveau chapitre de la thèse, valorisation des compétences » est d'établir un inventaire et une mise en valeur des compétences, autres que scientifiques et techniques, qui ont été nécessaires tout au long de la thèse.

I. Enjeux et place de la thèse

Mon sujet de thèse consiste à analyser les modifications de glycosylation lors d'une tremblante du mouton expérimentale.

La tremblante du mouton, maladie dite à prions, est caractérisée par l'accumulation d'une protéine anormalement repliée : la protéine prion, notée PrP. Cette protéine existe en fait sous deux formes : une forme normale appelée PrP^c pour cellulaire, qui est présente dans presque toutes les cellules des mammifères, et une forme pathologique, qui s'accumule lors des maladies à prions, appelée PrP^{Sc} car identifiée en premier lors de la tremblante du mouton (Scrapie en anglais). La protéine prion est une glycoprotéine, c'est-à-dire qu'elle peut être glycosylée. La glycosylation est un ensemble de processus coordonnés et séquentiels aboutissant au greffage de sucres sur des protéines ou des lipides. L'organisation complexe de ces sucres accrochés les uns aux autres est connue pour avoir de nombreuses fonctions, telles que des fonctions de reconnaissance entre molécules et/ou entre cellules, ainsi qu'un rôle dans le repliement tridimensionnel des glycoprotéines. La glycoprotéine prion est présente principalement à la surface des cellules où elle est fichée dans la membrane grâce à une ancre elle aussi glycosylée, le GPI (GlycosylPhosphatidylInositol). De plus, les protéines prion se concentrent dans des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en glycolipides,

tels que les gangliosides avec lesquels elle peut interagir. La protéine prion est donc en étroite relation avec différents aspects de la glycosylation.

L'objectif de ma thèse est de voir si la propagation de la forme anormale de la protéine prion est associée à une dérégulation de la glycosylation. Dans cette optique, j'ai analysé les modifications d'expression des gènes liés à la glycosylation lors d'une maladie à prions expérimentale. Ces analyses ont principalement été menées sur un modèle murin de tremblante du mouton.

En 2001, date du début de mon DEA et des premières investigations sur les maladies à prions dans le laboratoire, environ 180 000 bovins avaient été déclarés comme atteints d'ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine ou maladie de la vache folle) en Grande-Bretagne, avec une centaine de consommateurs contaminés. Dans le même temps, 187 cas d'ESB avaient été recensés en France. Pour ces maladies neurodégénératives d'issue systématiquement fatale, il n'existait (et n'existe) aucun test de diagnostic ante-mortem.

Mes travaux de thèse participent donc à la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans les maladies à prions, enjeu majeur tant pour la mise en place d'un test de diagnostic ante mortem, que pour l'établissement de thérapeutiques adaptées.

Pour le laboratoire, situé dans une région de forte production de viande bovine et ovine, et déjà impliqué dans de nombreuses recherches chez le bovin (couleur de la robe, qualité/quantité de muscle...), l'établissement d'une nouvelle thématique de recherche sur les maladies à prions lui permet d'être au cœur des préoccupations régionales.

L'équipe « prion », à laquelle j'appartiens, s'insère au sein du laboratoire dans une équipe plus grosse, travaillant sur la glycosylation et reconnue nationalement et internationalement. En effet, mes travaux sont à l'interface de deux thématiques : la glycosylation et les maladies à prions. Au début des travaux, cette équipe était composée du Pr R. Julien, directeur du laboratoire, du Dr F. Gallet, de L. Forestier et de moi-même. Rapidement, Agnès Barret, doctorante, a intégré l'équipe, à temps partiel, le reste de ses travaux étant dédié à une approche thérapeutique des maladies à prions au CEA de Saclay. Ses travaux (réunions des résultats obtenus à Saclay et Limoges) ont notamment conduit à la publication d'un article dans un journal international réputé. L'année de sa soutenance de thèse, Aurélien LeDuc, alors étudiant en M1, a continué ses travaux. Il est actuellement en

première année de thèse. Nous avons travaillé ensemble, eu de nombreuses conversations scientifiques très productives, aussi bien sur mes travaux que sur les siens. Régulièrement, nous avons analysé nos résultats respectifs afin de les corrélés et d'en tirer des conclusions générales.

II. Choix du sujet

Avant le début de ma thèse, je me doutais que l'étude des maladies à prions captivait de nombreux chercheurs et donc que la pression serait certainement présente durant ma thèse. L'intérêt des travaux proposés a cependant été plus fort. De plus, je savais que le laboratoire, même s'il n'avait pas d'expériences dans le domaine des maladies à prions, avait un très solide bagage dans l'autre volet de ma thèse : la glycosylation. Il m'apparaissait donc clair que mon environnement scientifique saurait me guider au mieux dans le déroulement de ma thèse (et de mon DEA). Par ailleurs, faisant un doctorat pour être Maître de Conférences, je souhaitais également faire de l'enseignement. L'équipe étant une UMR (INRA/Université de Limoges), j'avais l'espoir d'obtenir un poste de monitrice, et donc par la suite, de pouvoir valoriser cette expérience. Entrer dans un laboratoire reconnu, l'INRA, me semblait aussi être une expérience enrichissante pour (1) voir le fonctionnement d'un organisme national ayant de nombreuses unités et (2) me permettre d'être en contact avec des enseignants-chercheurs et des chercheurs.

Travailler sur un sujet porteur, et peu obscur (fait souvent reproché aux chercheurs en général et aux thésards en particulier), me semblait être également un point très important pour une valorisation de mes résultats et de ma thèse, car bien que mon objectif était de devenir maître de conférences, je ne m'interdisais pas de m'éloigner de la recherche fondamentale.

Ces nombreux avantages que j'entrevois avant le commencement de mon DEA m'ont poussé à choisir ce sujet, dans cette équipe et dans ce laboratoire. Ainsi, mes résultats de DEA ainsi que l'appui de mes directeurs de thèse m'ont permis de postuler et de bénéficier d'un poste de monitrice durant les 3 années de mon contrat de thèse. Deux mois avant la fin

de mon contrat de boursier de thèse (décembre 2005), j'ai été recrutée par l'Université de Limoges sur un demi-poste d'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche pour une durée de 11 mois.

III. Déroulement, gestion et coût du projet

Tout au long de ma thèse, j'ai pu participer, avec les autres membres de l'équipe, à de nombreux congrès nationaux et internationaux, où nos résultats étaient présentés. Ceci nous a permis de nous identifier auprès de scientifiques qui ne connaissaient pas forcément l'équipe ou le laboratoire. Au fil des ans, l'intérêt et l'originalité des approches scientifiques employées et des résultats obtenus ont favorisé l'établissement de contacts et de collaborations avec différents chercheurs et vétérinaires. Ces contacts ont été facilités par notre présence dans plusieurs groupes de recherche dédiés soit à l'étude de la glycosylation (comme le G3, Génomique et Génie des Glycosyltransférases, groupe de 11 équipes françaises ou encore le GFG, groupe français des glucides) soit aux maladies à prions (comme le Groupement d'Intérêt Scientifique « Infections à prions » ou encore le groupement des équipes INRA travaillant sur les ESST et prions).

Dès son commencement, mon sujet de thèse laissait présager des facteurs de risques d'échecs et de succès. L'un des risques de non réussite de mon sujet était la nouveauté de la thématique pour le laboratoire. Nous aurions pu partir sur une hypothèse complètement fautive et ne trouver aucune altération de glycosylation dans les maladies à prions. Dans ce cas, nous aurions certainement été contraints de réorienter fortement ce sujet de recherche.

L'un des principaux facteurs de succès, mais qui a son revers de médaille, est l'enjeu de santé publique des recherches sur les maladies à prions. En effet, au vu du nombre très incertain de victimes potentielles, de la nature même de l'agent infectieux (très mal défini), de l'absence de test de diagnostic et de thérapies, les recherches sur les maladies à prions sont /ont été très largement financées (plusieurs demandes de financement pour mes travaux ont par exemple reçu une issue favorable, ce qui a permis de couvrir des frais de fonctionnement). Cependant, ces maladies conservent encore beaucoup d'énigmes. De nombreuses équipes de

recherche ont donc concentré leurs efforts sur la compréhension de ces maladies, ce qui implique une potentielle concurrence et un nombre très important d'articles publiés, rendant difficile le suivi de l'avancée des connaissances. En contrepartie, les travaux sont probablement plus facilement valorisables. Par ailleurs, les congrès scientifiques nationaux et internationaux ayant trait aux maladies à prions sont nombreux, ce qui permet de choisir de participer aux congrès les plus proches de mon sujet de recherche. Afin de faire face à la « concurrence » en gardant à l'esprit la taille réduite de l'équipe, nous avons opté pour une approche originale de la thématique. Ainsi, aucune recherche identique à la nôtre n'a été menée simultanément dans d'autres laboratoires. La pression était donc saine et propice à une bonne dynamique de travail.

Les tâches d'enseignements que j'ai effectuées parallèlement à mes travaux de recherche m'ont conduites à me remettre à jour sur des sujets généraux, que je n'avais jusque là pas eu l'occasion de revoir car éloignés de mes travaux de recherche. Du fait du peu de temps que nous pouvons consacrer à la préparation des séances, le monitorat/l'ATER exige de la rapidité pour s'approprier les thématiques : recherche des documents adéquats pour la compréhension, assimilation des données, préparation de la transmission des connaissances. Cette double fonction d'enseignement et de recherche incite à optimiser le temps de travail, afin d'être le plus efficace possible pour mener de front ces différentes activités, sans qu'aucune n'en pâtisse. Le travail d'encadrement des étudiants a été très formateur dans la gestion de groupes et j'ai par ailleurs progressivement appris à motiver des étudiants inégalement investis dans leur cursus.

Divers moyens ont été mis à ma disposition durant mes travaux de recherche (tableau).

Coût approximatif de la thèse :

Salaires	Thèse	Bourse INRA/région	44 400 €
		Demi poste ATER	15 136 €
	Encadrement	Maître de Conférences	23 000 €
		Professeur	10 000 €
	Aide technique		5 000 €
	Administration		10 000 €
	Entretien		1 000 €
Consommables			120 000 €
Equipement (amortissement matériel)			15 000 €
Entretien / maintenance des appareils			10 000 €
Congrès - déplacements (inscription, train, hôtel, impression des posters...)			4 000 €
Aménagement des locaux			3 000 €
Ecole doctorale			3 000 €
Bibliothèque			1 000 €
Total			≈ 265 000 €

1) Tout d'abord des moyens scientifiques : j'ai été associée à plusieurs collaborations (Jouy-en-Josas pour l'obtention des souris transgéniques atteintes ou non de tremblante, Lille et Lyon pour des analyses biochimiques, Toulouse pour l'obtention de moutons atteints de tremblante). J'ai participé à de nombreux congrès nationaux et internationaux où j'ai pu présenter mes résultats sous forme de communications écrites ou orales devant des scientifiques avertis. Ma participation volontaire à diverses communications visant un public non spécialisé (institut de l'élevage, communication aux portes ouvertes de l'université, aux journées de l'école doctorale...) m'a offert la possibilité de présenter mes travaux de recherche ou plus généralement des techniques ou thématiques de recherche sous une forme accessible. Cet exercice de vulgarisation auquel je me suis régulièrement confrontée me semble très important, le « monde » scientifique devant, à mon sens, s'ouvrir davantage à la société afin de mieux s'y intégrer et d'être mieux compris. Cette démarche de communication de l'Université/ des scientifiques vers le grand public est récente, je la trouve nécessaire et je m'y suis donc investie dans la mesure de mes disponibilités.

2) Comme attendu, de nombreux moyens techniques ont été mis à ma disposition : des consommables (gants, kits divers, gros matériel : centrifugeuses, caméra, lampes UV et blanche, cuves de migration, appareil à scintigraphie pour lecture de la radioactivité, robots pour amplification PCR, séquençage, puces à ADN ...)

3) Différentes personnes ont été associées à ma thèse. Celle-ci a été co-encadrée par le Dr F. Gallet (pour le suivi des manipulations, des problèmes techniques ainsi que pour la veille de l'avancement des travaux, contrôlée par des réunions régulières) et par le Pr R. Julien (pour le cadrage du sujet, l'orientation des recherches, et la valorisation des résultats). Comme tout membre du laboratoire, j'ai bénéficié du travail administratif d'une secrétaire, et du bon suivi des consommables grâce à une technicienne. Par ailleurs, cette technicienne (Marie-Pierre Laforêt) ainsi qu'un ingénieur d'étude (Lionel Forestier) m'ont occasionnellement facilité le travail de par leurs fonctions dans le laboratoire, c'est-à-dire les expériences de culture cellulaire pour l'un et l'utilisation des outils d'analyse des transcrits et de séquençage pour l'autre.

Durant ma thèse, j'ai été amenée à encadrer deux stagiaires sur mon sujet de thèse. Cette expérience était enrichissante pour l'apport des manipulations effectuées mais surtout pour mon apprentissage de l'encadrement personnalisé. Récemment, j'ai bénéficié de la collaboration temporaire d'une ingénieur (Nathalie Payet) pour finir mes expérimentations. Cet « encadrement » d'une personne compétente m'a permis de lui déléguer très rapidement des travaux. Ces diverses tâches d'encadrement (associées aux heures d'enseignement) m'ont fait prendre conscience de mon goût pour le management et la gestion de groupes de personnes.

Enfin, comme lors de tout travail en équipe, la plupart des collègues m'ont apporté une aide ponctuelle, tout comme moi, j'ai pu leur rendre service avec plaisir.

IV. Résultats, impacts de la thèse

Une partie de ma thèse (et de mon DEA) a consisté à mettre en place un outil technologique majeur, qui par la suite a été utilisé par plusieurs équipes du laboratoire, mais également par des équipes extérieures.

Grâce à ces divers moyens mis à ma disposition durant ma thèse, des résultats scientifiques ont pu être obtenus. Ils apportent une contribution à la compréhension de ce mécanisme d'infection jusqu'alors méconnu. Nous avons ainsi mis en évidence une modification précoce (bien avant les premiers signes cliniques de la maladie) de l'expression de 2 gènes de la glycosylation (sur 165 gènes étudiés), démontrant ainsi que la dérégulation de la glycosylation est extrêmement ciblée. L'un de ces deux gènes code une protéine clé dans la synthèse des ancres GPI. L'altération de cette voie de biosynthèse pourrait être un facteur favorisant soit un autre mode de fixation de la protéine prion à la membrane, ce qui changerait ses propriétés, soit le non-ancrage de la protéine prion à la membrane, ce qui pourrait favoriser sa propagation. Le deuxième gène code une enzyme qui elle aussi a un rôle clé dans une voie de biosynthèse : celle des gangliosides, glycolipides connus pour interagir avec la protéine prion à la membrane cellulaire. En présence de protéine prion pathologique, la diminution de gangliosides synthétisés associée à l'altération de l'ancrage semble favoriser la progression de la maladie.

Ces résultats pointent des mécanismes qui favoriseraient le changement de conformation et la propagation des protéines prions pathologiques. Des études complémentaires doivent être menées afin de comprendre l'implication exacte de ces modifications dans l'évolution de la maladie. De plus, à long terme, les résultats obtenus pourraient être une base de travail sur laquelle d'autres chercheurs pourront s'appuyer pour mettre en place un test de diagnostic précoce des maladies à prions ou évaluer des approches thérapeutiques.

Par ailleurs, des études seraient nécessaires pour voir si de telles modifications ne sont pas extrapolables à d'autres maladies neurodégénératives ayant de nombreux points communs avec les maladies à prions, comme la maladie d'Alzheimer.

Comme tout doctorant appartenant à l'école doctorale sciences-technologie-santé, plusieurs formations m'ont été proposées. Parmi elles, je retiens comme particulièrement intéressantes des formations sur la prise de parole en public, la sensibilisation à l'esprit d'entreprise, la possibilité de passer le test du TOIEC, les rencontres avec des docteurs étant entrés dans le marché du travail, le passage de tests psychotechniques etc...qui seront autant d'atouts pour aborder sereinement, je l'espère, la recherche d'un futur emploi.

Bien qu'ayant beaucoup évolués durant ces années de thèse, mes objectifs de carrière sont restés les mêmes. En effet, ma volonté première est d'intégrer une équipe de recherche, si possible en ayant également des tâches d'enseignement. Pour y parvenir, je souhaite compléter mon expérience / mes connaissances par une ou deux années de post-doctorat. Si cependant je ne parviens pas à trouver un post-doctorat, ou si à l'issue du post-doctorat je n'ai pas de possibilités d'embauche dans la recherche publique, je serais prête à modifier mes objectifs. Le cas échéant, je compte sur mes compétences scientifiques et personnelles acquises ces dernières années pour me faire une place dans d'autres secteurs d'activité, où je ferais certainement preuve d'autant d'enthousiasme.

Participation aux congrès

Posters

F. Guillerme, A. LeDuc, R. Julien and P.F. Gallet. Glycosylation-related gene expression in prion diseases. 2nd international Dominique Dormont Conference, Paris, 1-3 Décembre 2005.

Gallet P.F., Guillerme F, Barret A, Forestier L, Julien R. Expression des gènes de la glycosylation dans les maladies à prions. Congrès du GIS « Infection à prions », INSTN-CEA Saclay, 17-19 Novembre 2004.

F. Guillerme, L.Forestier, C. Jayat-Vignoles, J-L. Vilotte, H. Laude, R. Julien and P.F. Gallet. Gene expression Patterns in Scrapie. Quantitative alterations of splenic non-golgian protein isoforms related to a2,3-sialyltransferase V (ganglioside synthase) gene. GlycoT 2004, Le Touquet Paris-Plage, 4-6 Novembre 2004.

Florence Guillerme. Le micro-réseau d'ADN : un outil permettant d'analyser les dysfonctionnements de gènes lors de maladies à prions. Séminaire de la pluridisciplinarité, Micro et Nano Technologies, Limoges, 11 Mars 2004 (Communication et poster).

F. Guillerme, J.L. Vilotte, L. Forestier, C. Jayat-Vignoles, N. Besnard, A. LeDur, H. Laude, R. Julien et P.F. Gallet. Analyse de la modification du glycotranscriptome cérébral dans des lignées de souris transgéniques exprimant la protéine prion ovine, infectées ou non par l'agent de la tremblante. GIS « Infections à Prions », Journée d'Animation Scientifique, Biologie Cellulaire et Physiopathologie, 18 Décembre 2002, Université Paris 5.

Guillerme F., Vilotte J.L., Forestier L., Jayat-Vignoles C., Besnard N., Le Dur A., Lia-Baldini A-S., Laude H., Julien R., Gallet P-F. Changes in the brain glycotranscriptome of ovine PrP transgenic mice at various TSE incubation times. New perspectives for Prion Therapeutics, Paris, 1-3 Décembre 2002.

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

F. Guillerme, L. Forestier, C. Jayat-Vignoles, J.L. Vilotte, N. Besnard, A. Le Dur, H. Laude, R. Julien et F. Gallet. Analyse de l'expression des gènes de la glycosylation dans un modèle de souris transgéniques sensibles à l'agent de la tremblante du mouton. XXèmes journées du Groupe Français des Glucides, Dourdan, 25-28 Mai 2004.

Florence Guillerme Rôle du glycogénome dans les maladies à prions: le cas de la tremblante. 6^{ème} séminaire des thésards du département de Génétique Animale, Tours, 27-28 Mai 2004.

Florence Guillerme. Le micro-réseau d'ADN : un outil permettant d'analyser les dysfonctionnements de gènes lors de maladies à prions. Séminaire de la pluridisciplinarité, Micro et Nano Technologies, Limoges, 11 Mars 2004 (Communication et poster).

F. Guillerme, J.-L. Vilotte, L. Forestier, C. Jayat-Vignoles, N. Besnard, A. Le Dur, H. Laude, R. Julien and P.F. Gallet. Analysis of glycosylation gene expression in a model of scrapie-infected mice. 14th Joint Meeting of the 'Studiengruppe Glycobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie' the 'Netherlands society for glycobiology' and the 'Groupe Lillois de Glycobiologie', Villeneuve d'Ascq, 20-22 Novembre 2003.

F. Guillerme Rôle du glycogénome dans les maladies à prions : le cas de la tremblante. 5^{ème} séminaire des thésards du département de Génétique Animale, Jouy-en-Josas, 22-23 Mai 2003.

F. Guillerme, A. Barret, L. Forestier, F. Gallet et R. Julien: Glyco-transcriptome murin et protéine prion. III^{ème} séminaire sur les recherches engagées à l'INRA sur les ESST et les prions, Le Croisic, 26-28 Février 2003.