

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

UMR1061 INRA/Université de Limoges

Génétique Moléculaire Animale

Thèse N° 172009

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline: Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par

Aurélien LE DUC

le 1^{er} juillet 2009

GLYCOGENOME ET MALADIES A PRIONS
Etude de la corrélation entre l'expression du
gène *Chst8* et l'apparition de PrP^{res}

Thèse dirigée par Raymond Julien et Paul-François Gallet

JURY :

Rapporteurs

Mme PAPY-GARCIA Dulce, Professeur – Université de PARIS XII

Mme ERMONVAL Myriam, Chargée de Recherche (HDR) - Institut Pasteur

Examineurs

M VILOTTE Jean-Luc, Directeur de Recherche – INRA de Jouy-En-Josas

Mme BLANQUET Véronique, Professeur – Université de Limoges

M GALLET Paul-François, Maître de Conférences- Université de Limoges

M JULIEN Raymond, Professeur- Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

UMR1061 INRA/Université de Limoges

Génétique Moléculaire Animale

Thèse N° 172009

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline: Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par

Aurélien LE DUC

le 1^{er} juillet 2009

GLYCOGENOME ET MALADIES A PRIONS
Etude de la corrélation entre l'expression du
gène *Chst8* et l'apparition de PrP^{res}

Thèse dirigée par Raymond Julien et Paul-François Gallet

JURY :

Rapporteurs

Mme PAPY-GARCIA Dulce, Professeur – Université de PARIS XII

Mme ERMONVAL Myriam, Chargée de Recherche (HDR) - Institut Pasteur

Examineurs

M VILOTTE Jean-Luc, Directeur de Recherche – INRA de Jouy-En-Josas

Mme BLANQUET Véronique, Professeur – Université de Limoges

M GALLET Paul-François, Maître de Conférences- Université de Limoges

M JULIEN Raymond, Professeur- Université de Limoges

à mes grands-parents,

à mes parents,

à Fanny,

Remerciements

Une thèse est une aventure personnelle qui représente quatre années de la vie, quatre années difficiles, jalonnées de déceptions, de satisfactions, de rencontres scientifiques, de discussions, de débats, parfois de mauvaise humeur. Une thèse est donc aussi une aventure collective, humaine. Si cette thèse a pu être effectuée dans de bonnes conditions, et déboucher sur des résultats passionnants, c'est grâce au concours de personnes que je souhaite remercier ici.

Tout d'abord, je tiens à remercier Hubert LEVEZIEL (DR-INRA) et Didier BOICHARD (Directeur du Département de Génétique Animale, INRA) pour avoir permis que ce travail soit soutenu par une bourse de l'INRA et de la région Limousin.

Je tiens aussi à remercier Raymond Julien, mon directeur de thèse pour m'avoir fait confiance depuis maintenant 5 ans, dès mon stage de DEA. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet en or, et d'avoir su permettre des expériences parfois très coûteuses. Vos conseils avisés et nos discussions toujours passionnées m'ont permis de me construire et d'apprendre à gérer un projet.

Merci aussi à François GALLET, mon co-directeur de thèse. C'est toi qui m'as encadré (supporté ?) au quotidien, à la paillasse, et m'as fait partager tes connaissances en particulier dans le vaste domaine de la glycobiologie. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré, merci pour cette période où nous avons écrit un article à quatre mains, période qui reste pour moi un souvenir inoubliable. Je ne pourrais passer sous silence ton rire (heureusement) inimitable qui résonnera toujours dans un coin de mon cerveau, à côté de la zone qui contrôle le mien (il arrive parfois que ces zones soient en contact, à mon grand désespoir).

Merci à Daniel PETIT. Tu as été pour moi LA rencontre humaine de ma thèse. Tu es la gentillesse en personne : toujours un mot agréable, un soutien, toujours un brin d'humour. Passionné par tous les sujets, tu as pris à bras le corps la thématique « prion » et tu t'es investi à fond, tant avec moi qu'avec Renaud, François et Raymond. Sans toi nous n'aurions pu développer toute la partie « statistiques ».

Je tiens également à remercier les membres du jury. Merci à Jean-Luc VILOTTE d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail, à Dulce PAPY-GARCIA et Myriam ERMONVAL d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je vous remercie d'autant plus que vous avez tous les trois suivi ma thèse dans son ensemble, puisque vous aviez accepté de participer à mon comité de thèse. En ont découlé des discussions très intéressantes qui ont permis de faire avancer la compréhension du sujet.

Je tiens à remercier particulièrement Dulce et Myriam pour les conseils que vous m'avez donnés pendant la rédaction de mon manuscrit. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, et pour vous être autant investies. Je vous en suis sincèrement très reconnaissant.

Myriam, je tiens à te remercier encore une fois pour m'avoir donné l'occasion de collaborer avec toi, François et Daniel sur l'article publié dans le Glycoconjugate Journal. Ce fut une aventure assez extraordinaire, qui a été valorisée par une publication, ma première publication. Merci.

Enfin, je suis vraiment fier que Véronique BLANQUET ait accepté d'être la présidente de ce jury. Les discussions que nous avons pu avoir au cours de ces 4 années ont toujours été franches et intéressantes, et tes conseils toujours pertinents. Merci à toi.

Je tiens à partager la réussite de ce travail avec les deux doctorants qui ont « habité » dans le même bureau et travaillé sur la thématique « prion » avec moi depuis mai 2004. Tout d'abord avec Florence BOSSELUT. Tu m'as beaucoup appris, aussi bien l'année de mon DEA que pendant ma première année de thèse, et je t'en serai toujours reconnaissant. Le souvenir de nos fou-rires restera longtemps gravé dans ma mémoire.

Ensuite avec Renaud MARTIN (« la fée desprouts ») qui a pris la relève. Nos thèses respectives n'ont pas toujours été des moments de plaisir, mais nous avons su nous soutenir l'un l'autre pour toujours pouvoir avancer. On a aussi beaucoup ri, tous les deux ou bien avec François et parfois Daniel (quelle équipe infernale) et pour cela aussi je te remercie. Bon courage pour la fin, vieil ours !

Je tiens aussi à remercier Laetitia MAGNOL. Tu as toujours été là pour m'aider en culture cellulaire, tu as même accepté de finir certaines expériences au long cours pour que je puisse prendre quelques vacances, et je t'en suis TRES reconnaissant. Je suis heureux d'avoir fait ta connaissance, et j'espère rester ton ami encore longtemps.

J'ai également pu bénéficier de l'aide et des conseils de Lionel FORESTIER, Nathalie DUPRAT, et Karine VUILLIER-DEVILLER. Merci à tous les trois.

Ces quatre années ont également été l'occasion de côtoyer d'autres doctorants qui ont soutenu leur thèse (Matthieu, Elena, Aymeric, Amro, Abdul) pour qui le pire est derrière et le meilleur est à venir. A ceux qui n'ont pas encore soutenu (Mathilde, Xavier, Olivier(s), Lamia, Benoit et sa guitare) je vous souhaite bon courage pour la fin.

Si j'ai pu arriver au bout de cette thèse c'est aussi parce que je nourris une passion pour la photographie qui m'a permis de m'évader régulièrement de l'univers scientifique pour flâner dans les sels d'argents. Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont permis cette évasion. Merci donc à Jean-Loup Sieff, Willy Ronis, Jock Sturges, Didier Carré, Philippe Grunchev, Stéphane Cormier, pour ces images qui me donnent tant à rêver. Un merci plus particulier à Jock, Didier, Philippe et Stéphane pour les échanges que nous avons eus, et pour le temps que vous avez pu m'accorder. Merci également aux photographes amateurs de Photolim87, qui sont maintenant devenus des amis. Alors un grand merci à mon Brubru, Alain L et Alain R, David-Charles (je n'oublie pas Coco, Marie et Louis), Seb, les deux Eric, Gégé ... Merci à tous. Un grand merci aussi à toutes les demoiselles qui m'ont fait confiance en acceptant de collaborer avec moi. Merci donc à Maëva, Katia, Marion, Marina, Abigail, Solange, Emilie, Laetitia, Nadège, Solène, Eve, Caroline et enfin Marie et Jana pour ces deux jours fabuleux à Prague.

Je ne pouvais pas oublier mes deux amis parisiens, Laurent et Marina, pour leur amitié sans faille. Merci à tous les deux, et bonne chance outre-Manche.

Je tiens à dédier ce travail à mes grand-parents. Vous m'avez inculqué des valeurs fondamentales de hargne, de volonté et d'humanité sans lesquelles je n'aurais sans doute pas pu réussir ces études. Vous êtes malheureusement tous les quatre partis trop tôt pour voir cet aboutissement, mais j'espère que là où vous vous trouvez, vous êtes fiers de moi.

Je dédie également cette thèse à mes parents pour m'avoir donné les capacités et les armes nécessaires pour affronter la vie d'adulte. Vous m'avez toujours soutenu, aidé, et vous m'avez donné l'envie de faire ces études. Vous m'avez enfin permis de les mener à bien dans des conditions exceptionnelles, et vous en serez toujours reconnaissant.

Enfin, je dédie cette thèse à Fanny, ma compagne. Toi qui partage ma vie, tu m'as supporté pendant ces 4 années et je le sais je n'ai pas toujours été facile. Mais ton soutien et ton amour m'ont permis de faire face à toutes les difficultés. Alors cette thèse, c'est la tienne aussi.

Résumé

La conversion de PrP^c en PrP^{res} est la caractéristique majeure des maladies à prions. Bien que de plus en plus d'éléments plaident en faveur de l'hypothèse de la protéine seule pour expliquer ce phénomène, il n'est pas exclu que des cofacteurs puissent intervenir. Parmi ceux-ci, les glycosaminoglycannes (GAGs) apparaissent comme de bons candidats. Par l'utilisation d'une souche naturelle de prion (127S), et également par l'utilisation de protéine prion recombinante, une forme résistante de PrP (PrP^{res}) a été obtenue dans la lignée cellulaire MOv. La conversion de la PrP est un processus biphasique : les deux phases peuvent être différenciées par l'utilisation de PrP recombinante en conformation α ou β . L'analyse par TLDA de l'expression des gènes liés au métabolisme des GAGs lors de la phase précoce d'apparition de PrP^{res} a montré que 38 gènes (parmi lesquels *Chst8*) subissent des variations d'expression indépendantes de la structure de la PrP inductrice. La seconde phase (ou phase tardive), est associée au maintien ou à la disparition de la PrP^{res}. Elle s'accompagne de modifications spécifiques de l'expression de 6 gènes (*Has3*, *Hyal3*, *Chst4*, *Chst5*, *Chst7*, *Hs3st3a1*), en relation avec la structure de la PrP inductrice. L'association de ces dérégulations pourrait provoquer des changements tant quantitatifs que qualitatifs des GAGs présents dans la matrice extracellulaire, favorisant la conversion de la PrP dans un premier temps, l'expression chronique de la PrP^{res} dans un deuxième temps.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un code de sulfatation des GAGs dont l'altération pourrait favoriser la conversion de PrP, ouvrant de nouvelles voies d'investigation thérapeutiques pour le traitement des maladies conformationnelles.

Abstract

PrP^c / PrP^{res} conversion is the main characteristic of prion diseases. Although more and more data argue in favour of the protein only hypothesis to explain the phenomenon, cofactors can also intervene. Among them, the glycosaminoglycans (GAGs) appear as good candidates. By the use of a natural scrapie strain (127S) or a recombinant α - or β - folded PrP, the PrP^{res} appearance was induced in the MOv cell line. The conversion of PrP is a two-step process, and the two phases can be distinguished by the use of the recombinant α - or β - folded PrP. TLDA analysis of genes involved in GAG metabolism, in the early step of conversion, underscores that 38 genes (including Chst8) have a modified expression, independently of the structural state of the PrP used. The second step is associated with chronic expression or clearance of PrP^{res}. It comes with specific modifications of 6 genes (*Has3*, *Hyal3*, *Chst4*, *Chst5*, *Chst7*, *Hs3st3a1*), depending on the structure of the PrP used.

These results suggest an alteration of the sulphation pattern of ECM GAGs. The association of such modulations is thought to provoke quantitative and qualitative changes in the GAGs from the ECM, which would favour the conversion of PrP in a first step and its chronic expression in a second step.

These results suggest the existence of a sulfatation code. Its impairment would favour the PrP conversion, opening new therapeutic fields of research to cure conformational diseases.

Abréviations

- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AH : Acide Hyaluronique
- AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
- ARN : Acide RiboNucléique
- ARNsh : ARN « small hairpin », replié sous forme de petite épingle à cheveux
- ARNSi : ARN « silencing », cible une séquence d'ARN spécifique et provoque sa dégradation
- CS : Chondroïtine Sulfate
- CSPG : ProtéoGlycane à motif de Chondroïtine Sulfate
- CWD : Chronic Wasting Disease ou maladie du dépérissement chronique
- DRM: «Detergent Resistant Membrane»
- DS : Dermatane Sulfate
- ESST : Encéphalopathie Subaiguë Spongiforme Transmissible
- ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- ERK: «Extracellular-signal Regulated Kinase»
- FDC : Cellules Folliculaires Dendritiques
- GABA: Acide Gamma-Amino-Butyrique
- GAG : GlycosAminoGlycane
- Gal : Galactose
- GalNAc : *N*-acétylGalactosamine
- GlcA : Acide Glucuronique
- GlcNAc : *N*-acétylGlucosamine
- GPI: GlycosylPhosphatidyInositol
- GSS : Syndrome de Gestmann-Sträussler-Scheinker
- HS : Héparane Sulfate
- HSPG : ProtéoGlycane à motif d'Héparane Sulfate
- IdoA : Acide Iduronique
- kDa : Kilo-Dalton
- KS : Kératane Sulfate
- LR: Forme mature du Récepteur à la Laminine

- LRP : Précurseur du Récepteur à la Laminine
- MAP: «Mitogen-associated Protein»
- MCJ : Maladie de Creutzfeld-Jakob
- vMCJ : variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob
- MEC : Matrice Extra-Cellulaire
- NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- NLS: «Nuclear Localization Signal»
- NSP : «National Scrapie Plan»
- OR : Octa-Repeat
- PAPS : 3'-PhosphoAdénosine 5'-PhosphoSulfate
- PK : Protéinase K
- PKC: Protéine Kinase C
- PMCA : « Protein Misfolding Cyclic Amplification »
- PNGase : Peptide-N4-(acetyl-β-glucosaminy)- asparagine amidase
- PrP²⁷⁻³⁰ : Peptide de 27-30 kDa, produit suite à la digestion par la pK de la protéine prion pathologique
- PrP* : Protéine Prion à conformation intermédiaire
- PrP^{res} : Protéine Prion résistante à la digestion PK
- PrP^{Sc} : Protéine Prion Scrapie
- CtmPrP : Protéine prion avec un domaine C-terminal réticulaire et un domaine N-terminal cytoplasmique
- NtmPrP : Protéine prion avec un domaine N-terminal réticulaire et un domaine C-terminal cytoplasmique
- RE: Réticulum Endoplasmique
- REG: Réticulum Endoplasmique Granuleux
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- SNP : « Single Nucleotide Polymorphism»
- SOD: SuperOxyde Dismutase
- STE: Stop Transfer Effector
- UTR : « UnTranslated Region »
- Xyl : Xylose

Table des matières

INTRODUCTION.....	- 15 -
I- LES ENCEPHALOPATHIES SUBAIGÜES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES	- 17 -
1. <i>Les différentes encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles</i>	<i>- 17 -</i>
a- Les encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles animales.....	- 18 -
b- Les encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles humaines.....	- 19 -
2. <i>Les caractéristiques des maladies à prions.....</i>	<i>- 21 -</i>
a. Durée d'incubation.....	- 21 -
b. Profil lésionnel.....	- 21 -
c. Signature biochimique	- 22 -
II- CARACTERISTIQUES DE LA PROTEINE PRION CELLULAIRE.....	- 22 -
1. <i>Le gène codant la protéine prion</i>	<i>- 22 -</i>
a. Organisation génomique du gène <i>Prnp</i>	- 23 -
b. Régulation de l'expression du gène <i>Prnp</i>	- 24 -
2. <i>La protéine prion cellulaire PrP^c</i>	<i>- 25 -</i>
a. Caractéristiques moléculaires.....	- 25 -
b. La maturation de la protéine prion	- 27 -
c. La protéine prion, une protéine glycosylée	- 28 -
c. Expression tissulaire de la protéine prion.....	- 29 -
3. <i>Trafic et localisation intra cellulaires de la protéine prion.....</i>	<i>- 30 -</i>
4. <i>Les fonctions de la protéine prion cellulaire</i>	<i>- 32 -</i>
a. Régulation du métabolisme du cuivre et protection contre le stress oxydatif.....	- 33 -
b. Transduction de signaux	- 34 -
c. Activité neuro-protectrice	- 35 -
d. La PrP ^c et la synapse	- 36 -
III- DE PRP^c A PRP^{Sc}: UN CHANGEMENT DE CONFORMATION ASSOCIE AUX ESST.....	- 38 -
1. <i>La conformation de la protéine prion : une seule séquence primaire, deux conformères</i>	<i>- 38 -</i>
2. <i>Mutations et maladies à prion.....</i>	<i>- 39 -</i>
i. Mutations au sein des régions régulatrices.....	- 39 -
ii. Mutations au sein de la séquence codante de <i>Prnp</i>	- 39 -
3. <i>Polymorphismes et leur implication sur la susceptibilité à développer une maladie à prion.....</i>	<i>- 41 -</i>
4. <i>L'hypothèse de la protéine seule.....</i>	<i>- 43 -</i>
5. <i>Les sites de conversion.....</i>	<i>- 45 -</i>
6. <i>Trois modèles de conversion.....</i>	<i>- 48 -</i>
7. <i>La propagation de l'agent infectieux</i>	<i>- 50 -</i>
a. Le passage de la barrière intestinale.....	- 50 -
b. Invasion des tissus lymphoïdes	- 51 -
c. Propagation et accumulation dans le système nerveux central	- 53 -
8. <i>Modèles d'études des mécanismes de conversion de la protéine prion</i>	<i>- 53 -</i>
a. Les modèles transgéniques.....	- 54 -
b. In vitro	- 55 -
i. Les modèles cellulaires	- 55 -
ii. Production de PrP ^{res} dans un modèle acellulaire	- 58 -
IV- LES INTERACTIONS DE LA PROTEINE PRION AVEC SON ENVIRONNEMENT.....	- 60 -
a. Interactions avec des acides nucléiques	- 60 -
b. Interactions avec des partenaires protéiques	- 61 -
c. Interactions avec des glycoconjugués	- 62 -
i. Avec des glycolipides	- 62 -
ii. Avec des glycosaminoglycannes.....	- 62 -
V- LES GLYCOSAMINOGLYCANNES.....	- 64 -
1. <i>Les différents glycosaminoglycannes et leur structure chimique.....</i>	<i>- 64 -</i>
a. la synthèse des glycosaminoglycannes.....	- 67 -
i. La synthèse du tétrasaccharide de liaison commun aux héparanes et chondroïtines.....	- 67 -
ii. Les héparanes sulfate	- 68 -
iii. Les chondroïtines sulfate	- 69 -
iv. Les kératanes sulfate.....	- 70 -
v. L'acide hyaluronique	- 70 -
b. Les compartiments subcellulaire de la synthèse des protéoglycannes.....	- 70 -
3. <i>La fonction des protéoglycannes dans les tissus nerveux</i>	<i>- 71 -</i>
a. Les HSPG	- 72 -
b. Les CSPG.....	- 73 -

c.	Les KSPG	- 74 -
4.	<i>La sulfatation des glycosaminoglycannes : vers l'existence d'un code</i>	- 75 -
a.	L'hypothèse d'un code de sulfatation	- 75 -
b.	Des altérations du code de sulfatation à l'origine de graves pathologies	- 76 -
5.	<i>Les glycosaminoglycannes et les maladies neurodégénératives conformationnelles</i>	- 78 -
a.	GAGs et maladie de Parkinson	- 78 -
b.	GAGs et maladie d'Alzheimer.....	- 78 -
c.	GAGs et maladies à prion	- 79 -
VI-	LA GALNAC-4-SULFOTRANSFERASE 1 CODEE PAR <i>CHST8</i> ET LES CHONDROÏTINE SULFOTRANSFERASES	- 81 -
	- 81 -
	RESULTATS	- 83 -
	CHAPITRE I : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES IMPLIQUES DANS LE METABOLISME DES GLYCOSAMINOGLYCANNES AU COURS DU PROCESSUS DE TRANSCONFORMATION DE LA PRP.	- 89 -
I-	LA CONVERSION DE PRP ^C EN PRP ^{RES} EST ASSOCIEE A DES MODIFICATIONS D'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LE METABOLISME DES GLYCOSAMINOGLYCANNES.....	- 90 -
II-	ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GENE <i>CHST8</i> DANS LA LIGNEE MOv EXPRIMANT LA PRP ^{Sc} DE FAÇON CHRONIQUE.....	- 118 -
1.	<i>Matériel et méthodes</i>	- 118 -
2.	<i>Résultats</i>	- 119 -
3.	<i>Conclusion</i>	- 121 -
	CHAPITRE II : ANALYSE DE L'IMPACT DE LA MODULATION DE L'EXPRESSION DU GENE <i>CHST8</i> SUR LA TRANSCONFORMATION DE LA PRP : CREATION ET CARACTERISATION PRELIMINAIRE DE NOUVELLES LIGNEES CELLULAIRES.	- 122 -
I-	MATERIEL ET METHODES	- 123 -
1.	<i>Modèles biologiques</i>	- 123 -
2.	<i>Création de lignées MOv sous-exprimant le gène <i>Chst8</i></i>	- 123 -
a.	Choix de la séquence cible et insertion dans le vecteur.....	- 123 -
b.	Synthèse des rétrovirus	- 124 -
c.	Infection de la lignée MOv	- 124 -
3.	<i>Caractérisation des clones obtenus</i>	- 125 -
a.	Analyses biochimiques et moléculaires	- 125 -
b.	Analyse phénotypiques	- 125 -
II-	RESULTATS.....	- 125 -
1.	<i>Sélection des clones sous exprimant le gène <i>Chst8</i></i>	- 125 -
2.	<i>Impact de la sous-expression de <i>Chst8</i> sur les GAGs</i>	- 127 -
3.	<i>Impact de la sous-expression de <i>Chst8</i> sur la protéine prion</i>	- 127 -
4.	<i>Impact de la sous expression de <i>Chst8</i> sur la morphologie des cellules MOv</i>	- 129 -
III-	DISCUSSION	- 132 -
IV-	CONCLUSION	- 135 -
	CHAPITRE III: MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION DU GLYCOTRANSCRIPTOME AU COURS DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE.	- 136 -
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	- 170 -
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 175 -

Table des illustrations

FIGURE 1 : PHENOTYPE CARACTERISTIQUE D'UN MOUTON ATTEINT DE TREMBLANTE.....	- 18 -
FIGURE 2 : COUPES HISTOLOGIQUES DE CERVEAU DE MOUTON.....	- 21 -
FIGURE 3 : SIGNATURE BIOCHIMIQUE DE PrP ^{Sc}	- 22 -
FIGURE 4 : ORGANISATION GENOMIQUE DES GENES PrNP HUMAIN, OVIN, MURIN, ET BOVIN.....	- 23 -
FIGURE 5 : LA REGULATION DU GENE <i>PrNP</i> CHEZ LE BOVIN.	- 24 -
FIGURE 6 : STRUCTURE SECONDAIRE DE LA PROTEINE PRION OVINE MATURE.....	- 26 -
FIGURE 7 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES TOPOLOGIES DE LA PROTEINE PRION.	- 28 -
FIGURE 8 : PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES PRION PrP ^{Sc} ET PrP ^C	- 28 -
FIGURE 9 : (A ET B) COUPES SAGITTALES DU COLLICULE INFERIEUR DE CERVEAU DE SOURIS.....	- 29 -
FIGURE 10: DISTRIBUTION TISSULAIRE DE LA PrP ^C AU NIVEAU DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE LA SOURIS TRANSGENIQUE PrP-EGFP	- 30 -
FIGURE 11: ILLUSTRATION DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE LA PROTEINE PRION.	- 32 -
FIGURE 12: VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUANT PrP ^C DANS LA LIGNEE 1C11.	- 35 -
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE ET MODELISEE DE L'EFFET DES EXTRA-OR SUR LA CONVERSION DE PrPC EN PrPSc DANS LA MCJ FAMILIALE.....	- 41 -
FIGURE 14 : LES POSSIBLES VOIES DE FORMATIONS DE PrP ^{Sc}	- 47 -
FIGURE 15 : MODELES HYPOTHETIQUES DE CONVERSION DE PrP ^C EN PrP ^{Sc}	- 49 -
FIGURE 16 : MECANISMES POTENTIELS DE TRANSLOCATION DE L'AGENT RESPONSABLE DES ESST : LA PrP ^{Sc}	- 51 -
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODE DE PMCA.....	- 59 -
FIGURE 18 : CARACTERISATION DE LA PrP ^{RES} OBTENUE PAR PMCA.	- 59 -
FIGURE 19 : FORMULES CHIMIQUES DES UNITES DISSACCHARIDIQUES CONSTITUTIVES DES DIFFERENTS GAGS.....	- 65 -
FIGURE 20 : FORMULE DEVELOPEE DU TETRASACCHARIDE DE LIAISON.	- 66 -
FIGURE 21 : STRUCTURE GLYCANNIQUE DES DIFFERENTS TYPES D'OLIGOSACCHARIDE DE LIAISON RENCONTRES DANS LES PG A MOTIF KS	- 66 -
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BIOSYNTHESE DES GAGS DE TYPE HS ET CS.....	- 68 -
FIGURE 23 : LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA SYNTHESE DES PROTEOGLYCANNES A MOTIF CHONDROÏTINE....	- 71 -
FIGURE 24 : LES DIFFERENTES FONCTIONS DES HS.	- 73 -
FIGURE 25: INFLUENCE DU CODE DE SULFATATION SUR LA SENSIBILITE DES GAGS AUX ENZYMES DE DEGRADATION.....	- 76 -
FIGURE 26 : SYSTEME UROGENITAL DE SOURIS NOUVEAU-NEE HETEROZYGOTE (A) ET HOMOZYGOTE (B) POUR LA MUTATION Hs2ST-/-.....	- 76 -
FIGURE 27 : ALIGNEMENT DES DOMAINES SULFOTRANSFERASE DES PROTEINES GALNAC4-ST1 ET C4ST.	- 81 -
FIGURE 28 : IMMUNOLocalISATION DE L'ENZYME GALNAC4-ST1 SUR CERVEAU DE SOURIS.	- 82 -
FIGURE 29 : AU SEIN DES RAFTS, LA PROTEINE PRION INTERAGIT AVEC DES GLYCOCONJUGUES DE TYPE GANGLIOSIDES ET GAGS.....	- 84 -
FIGURE 30 : EXPRESSION DU GENE <i>CHST8</i> DANS LES CELLULES GT1 ET Sc-GT1 AU COURS DE LA REVERSION PAR UN AGENT CURANT, LE HM2602.	- 86 -
FIGURE 31 : DETECTION DE LA PrP ^{Sc} , TAUX DE TRANSCRITS DE <i>CHST8</i> ET QUANTITES DE GAGS SULFATES DANS LES CELLULES C-MOV, ET Sc-MOV, 15 REPIQUAGES APRES INOCULATION.....	- 120 -
FIGURE 32 : EXPRESSION RELATIVE DU GENE <i>CHST8</i> DANS LES CELLULES EXPRIMANT L'ARNsh SPECIFIQUE DE <i>CHST8</i>	- 126 -
FIGURE 33 : CARACTERISATION PRELIMINAIRE DES CELLULES MOV EXPRIMANT L'ARNsh SPECIFIQUE DE <i>CHST8</i> . .	- 128 -
FIGURE 34 : PHOTOGRAPHIE OPTIQUE DES CELLULES MOV 12H APRES ENSEMENCEMENT.	- 130 -
FIGURE 35 : ASPECT MORPHOLOGIQUE DES CELLULES MOV 48 HEURES APRES ENSEMENCEMENT.....	- 131 -
FIGURE 36 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES CELLULES MOV 48 HEURES APRES ENSEMENCEMENT.....	- 131 -
FIGURE 37 : MORPHOLOGIE DES CELLULES MOV A CONFLUENCE.	- 132 -

Tableaux

TABLEAU 1 : DIFFERENTES AMYLOÏDOSES ET LEURS PROTEINES ASSOCIEES.	- 16 -
TABLEAU 2 : LES PRINCIPALES ESST ANIMALES, LEURS CAUSES ET LEUR PREMIERE OBSERVATION.	- 19 -
TABLEAU 3 : LES PRINCIPALES ESST HUMAINES, LEURS CAUSES ET LEUR PREMIERE OBSERVATION.....	- 20 -
TABLEAU 4 : COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES DES PROTEINES PrP ^C ET PrP ^{Sc} :.....	- 38 -
TABLEAU 5 : ASSOCIATION DES DIFFERENTS POLYMORPHISMES RETROUVES AU NIVEAU DE LA REGION CODANTE DU GENE PrNP OVIN AVEC LA DUREE D'INCUBATION DE MOUTONS DE RACE CHEVIOT APRES INOCULATION SOUS-CUTANEE DE LA SOUCHE SSBP/1	- 43 -
TABLEAU 6 : RECAPITULATIF DES CRITERES PRIS EN COMPTE POUR DISTINGUER LES DIFFERENTES SOUCHES DE PRION.	- 54 -
TABLEAU 7 : LIGNEES CELLULAIRES INFECTABLES PAR DES SOUCHES DE PRIONS ADAPTEES OU NATURELLES..	- 57 -
TABLEAU 8 : RESUME DES PARTENAIRES PRINCIPAUX DE LA PROTEINE PRION CELLULAIRE, LEUR FONCTION SUPPOSEE ET LEUR LOCALISATION SUBCELLULAIRE.	- 63 -
TABLEAU 9 : LES DIFFERENTS TYPES DE CS EN FONCTION DE LA SUBSTITUTION DES EXTREMITES NON- REDUCTRICES DES RESIDUS GLYCANNIQUES.....	- 74 -
TABLEAU 10 : ORGANISMES MUTANTS QUI PRESENTENT DES DEFAUTS DANS LA BIOSYNTHESE OU LA SULFATATION DES GAGs.....	- 77 -
TABLEAU 11 : EXPRESSION RELATIVE DU GENE <i>CHST8</i> DANS LES CLONES MOV APRES CINQ REPIQUAGES	- 127 -
TABLEAU 12 : INTENSITE RELATIVE DU SIGNAL PrP DANS LES DIFFERENTS CLONES EXPRIMANT L'ARN ^{SH} SPECIFIQUE DE <i>CHST8</i>	- 129 -
TABLEAU 13 : DISTRIBUTION DES DIFFERENTES GLYCOFORMES DE LA PrP DANS LES CELLULES EXPRIMANT L'ARN ^{SH} SPECIFIQUE DE <i>CHST8</i>	- 129 -
TABLEAU 14 : PROPORTION DE CELLULES ADHEREES 12 HEURES APRES ENSEMENCEMENT.....	- 129 -

Introduction

Les maladies à prion sont des maladies conformationnelles qui appartiennent à la famille des amyloïdoses. Elles se caractérisent par le dépôt d'agrégats protéiques dans un organe, menaçant son intégrité (Sipe et Cohen 2000). Leur mise en évidence a été facilitée par le caractère macroscopique de certaines de ces structures au sein d'organes ou de tissus de patients atteints de démence sénile, de problèmes locomoteurs, ou encore de troubles cardiaques. Chez certains patients atteints de troubles neurodégénératifs non référencés, des études microscopiques ont mis en évidence l'existence de petits dépôts protéiques dont la distribution est limitée (Cohen et Calkins 1959). La nature amyloïde de ces dépôts n'est avérée et acceptée que depuis peu de temps, car ils ont été longtemps considérés comme secondaires et décrits comme des sous-produits de la pathologie. En fait, pour la plupart, ils sont à l'origine de la pathogénèse (Cohen *et al.*, 1982). Il existe un grand nombre d'amyloïdoses liées à différentes protéines amyloïdogènes, qui affectent un grand nombre de métabolismes. Elles sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Différentes amyloïdoses et leurs protéines associées. D'après Westermark (2005).

Protéine incriminée	Symptômes associés
Lactoferrine	Amyloïdose cornéenne
Fibrinogène	Amyloïdose liée au fibrinogène
Kératine	Amyloïdose cutanée
Tau	Maladie d'Alzheimer, démence fronto-temporale
Amylin	Diabète de type II
Calcitonine	Carcinome médullaire thyroïdien
Cystatine C	Angiopathie amyloïde cérébrale héréditaire islandaise
Kerato-epitheline	Dystrophie cornéenne
Lactadherine	Amyloïdose médiane de l'aorte
Peptide β -amyloïde	Maladie d'Alzheimer, angiopathie amyloïde cérébrale
Protéine prion	Encéphalopathies spongiformes
α -synucléine	Maladie de Parkinson

Parmi ces maladies, les encéphalopathies subaigües spongiformes transmissibles (ESST) sont associées à l'agrégation de la protéine prion. Elles ont fait l'objet d'une attention très particulière du fait de leurs implications économiques et sanitaires depuis les années 1990 avec la crise de la vache folle.

I- Les encéphalopathies subaigües spongiformes transmissibles

1. Les différentes encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles

Les ESST sont des maladies neurodégénératives transmissibles toujours fatales pour lesquelles aucun traitement préventif ou curatif n'est disponible, et dont l'agent responsable est dit non conventionnel (ATNC : agent transmissible non conventionnel). En effet, il n'a pas besoin d'un acide nucléique pour se répliquer, son spectre de résistance aux rayonnements est plus proche de celui des protéines que de celui des acides nucléiques (Alper *et al.*, 1967), et il résiste à des radiations que ni des bactéries ni des virus ne pourraient supporter sans être inactivés (Alper 1985). Dès 1967, J.S. Griffith a proposé que cet agent puisse être une protéine capable d'auto-réplication qui pourrait agir comme un agent infectieux (Griffith 1967). Cet agent aux caractéristiques inhabituelles a donné lieu à l'élaboration d'un concept désigné par le terme prion, pour « proteinaceous and infectious particle only » (Prusiner 1982). Ce sont les travaux de Bolton (1982) qui ont apporté la preuve de l'association des ESST avec une protéine anormalement résistante à la dégradation par la protéinase K : la protéine prion (ou PrP) (Bolton *et al.*, 1982). Cette protéine est impliquée dans tous les cas de maladies à prions suspectés, et en particulier dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) (Bockman *et al.*, 1985 ; Bockman *et al.*, 1987 ; Brown *et al.*, 1986 ; Manuelidis *et al.*, 1985). Aujourd'hui, bien que des preuves scientifiques manquent encore, l'hypothèse la plus probable repose sur la transmission de ces maladies par l'intermédiaire de cette seule protéine, résistante à la dégradation protéasique (Prusiner 1998). Celle-ci possède plusieurs dénominations : PrP^{Sc} (scrapie, du verbe anglais « to scrape » signifiant gratter), PrP^{res} (résistance aux protéases), PrP²⁷⁻³⁰ (taille du fragment protéique résistant à la dégradation) ou PrP* (à cause des incertitudes pesant sur la forme réellement pathogène de la protéine) (Aguzzi et Weissmann 1997 ; Brown et Cervenakova 2005). Ces maladies affectent aussi bien l'homme que l'animal, et le mode de contamination le plus fréquent est l'ingestion.

Ces agents n'induisent pas de réponse du système immunitaire (pas de production d'anticorps), ce qui exclut toute possibilité de test diagnostique sérologique. Ainsi, actuellement, l'identification de l'agent pathogène se fait toujours en post-mortem.

a- Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles animales

Une des ESST les mieux connues est la tremblante du mouton. Cette maladie a été observée pour la première fois en 1732 en Europe de l'Ouest, alors que des efforts de sélection des races vouées à la production étaient très avancés. La tremblante du mouton se caractérise par deux phases cliniques : l'une nerveuse caractérisée par une hyperexcitabilité accompagnée de tremblements (d'où le nom de tremblante donnée parfois à la maladie), l'autre se manifeste par un prurit invasif (figure 1) qui va entraîner une disparition progressive de la toison et des lésions étendues liées au grattage (Deslys et Picot 2001). C'est de ces signes cliniques que provient le terme de « scrapie » employé par les anglo-saxons pour désigner la maladie.



Figure 1 : Phénotype caractéristique d'un mouton atteint de tremblante. On distingue nettement les lésions dues au prurit lié à la maladie.

Dans une moindre mesure, cette pathologie touche également la chèvre, espèce pour laquelle la période d'incubation peut atteindre deux à trois années (Deslys et Picot 2001). Cette forme d'ESST est présente dans la plupart des pays du monde. Curieusement, les campagnes d'éradication ont donné lieu à des résultats très différents, en fonction de la localisation géographique. Ainsi, en Islande, la maladie a été presque impossible à éradiquer. Au contraire, en Australie et en Nouvelle Zélande, pays qui ont importé des moutons contaminés, la tremblante semble avoir naturellement disparu puisqu'aujourd'hui, on parle de deux pays indemnes.

Outre les moutons et les chèvres, les ESST affectent également d'autres espèces, comme le vison, dont l'encéphalopathie spongiforme a été observée pour la première fois en 1947 aux Etats-Unis. La durée d'incubation silencieuse varie entre sept et douze mois. Les premiers signes cliniques se caractérisent par une hyperexcitabilité et une forte agressivité dirigée contre l'extérieur, mais aussi contre l'animal lui-même, allant jusqu'à atteindre sa propre intégrité physique. Dans un deuxième temps, une phase de somnolence prédomine,

fréquemment accompagnée par une cécité. La dernière phase précédant le décès entraîne généralement une paralysie des pattes arrières. A partir des premiers signes cliniques, l'évolution de la maladie ne dure généralement que quelques semaines.

Chez les ruminants sauvages américains, qu'ils soient captifs ou en liberté, le syndrome de dégénérescence chronique (CWD : Chronic Wasting Disease) est observé. Il affecte majoritairement le wapiti, le cerf-mulet des Rocheuses, le cerf à queue blanche, et l'élan.

Toujours chez les ruminants, l'apparition de la maladie de la vache folle, ou encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en 1986 est liée à l'ingestion de farines animales préparées avec des carcasses de moutons atteints de tremblante. Cette ESST a touché une grande partie du cheptel bovin en Europe : en Grande Bretagne, le nombre de cas a évolué de 446 en 1987 jusqu'à 37 000 bovins pour la seule année 1992, et en 2008, 184 576 cas avérés y ont été recensés depuis 1987. Les autres pays européens les plus touchés ont été l'Irlande, la France et le Portugal (source : organisation mondiale pour la santé animale).

Tableau 2 : Les principales ESST animales, leurs causes et leur première observation. D'après Deslys et Picot, (2001) ; Ironside (2001).

Les ESST animales			
Maladie	Espèces atteintes	Cause	Première observation
Tremblante	Ovins	Lignées génétiquement sensibles par contact entre individus	vers 1730
Encéphalopathie Transmissible du Vison (ETV)	Vison	Inconnue	1947
Syndrome de dégénérescence chronique	Cervidés nord-américains sauvages ou captifs	Inconnue	1967
Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)	Bovins, ruminants de zoos	Infection à partir de farines animales contaminées	1985
Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF)	Félidés domestiques ou de zoos	Infection par des aliments d'origine bovine	1992

b- Les encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles humaines

Chez l'homme, de nombreuses maladies à prions ont été décrites (tableau 3). Ces maladies, peu fréquentes, peuvent présenter diverses origines : (i) sporadique, ce qui représente la forme la plus répandue des maladies de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) (80 % des cas) mais comprend également l'insomnie familiale sporadique (IFS), (ii) génétique comme l'insomnie familiale fatale (IFF) ou le syndrome de Gestmann-Sträussler-Scheinker (GSS), ou (iii) infectieuse comme la forme iatrogène de la MCJ. Celle-ci est transmise de manière inter-humaine au cours d'actes chirurgicaux suite à l'utilisation de matériel de neurochirurgie souillés, au cours de greffes de cornée ou de dures-mères réalisées à partir de tissus infectés,

ou bien encore après administration d'hormone de croissance extraite d'hypophyses de cadavres.

Au début du siècle dernier, une épidémie de maladie provoquant perte d'équilibre et démence fut décrite au sein des tribus papoues cannibales, sur les hauts plateaux de Papouasie-Nouvelle Guinée. Curieusement, cette maladie n'atteignait que les femmes adultes, et les enfants des deux sexes. Les rites funéraires et les croyances de ces tribus obligeaient leurs membres à ingérer certaines parties du corps des défunts de haut rang, afin de s'approprier leurs qualités. Ainsi, les hommes consommaient les muscles, siège de la force, et les femmes et les enfants mangeaient les restes moins nobles, dont le système nerveux central, hautement infectieux. Ces pratiques ont été interdites en 1957, et dès lors, le nombre de cas a chuté considérablement. Cependant, l'incubation pouvant durer plus de quarante ans, le dernier individu atteint de Kuru est décédé en 1998.

Une nouvelle forme de MCJ (vMCJ) affectant l'homme est apparue depuis le milieu des années 1990. Elle touche des patients jeunes (moins de 40 ans) et les signes cliniques développés sont inhabituels et stéréotypés avec tout d'abord l'apparition de signes psychiatriques tels que dépression, repli sur soi, anxiété, insomnie et apathie, puis sensoriels, moteurs, et enfin mutisme et décès la plupart du temps consécutif à des problèmes pulmonaires (Deslys et Picot 2001 ; Wadsworth et Collinge 2007). Des analyses des tissus cérébraux issus de patients décédés de vMCJ ont montré que le prion de la vMCJ correspond à celui observé dans les tissus d'animaux atteints d'ESB (Collinge *et al.*, 1996).

Tableau 3 : Les principales ESST humaines, leurs causes et leur première observation. D'après Deslys et Picot, (2001) ; Ironside (2001).

Les ESST humaines		
Maladie	Cause	Première observation
Kuru	Consommation rituelle de cerveaux de cadavres	vers 1900
Maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ)	<u>Iatrogène</u> : infection par l'hormone de croissance; <u>Sporadique</u> : mutations non héréditaires du gène <i>Prnp</i> ; <u>Familiale</u> : mutations héréditaires du gène <i>Prnp</i> ; <u>Nouvelle variante</u> : infection par le prion de l'ESB	1920
Syndrôme de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Mutations héréditaires du gène <i>Prnp</i>	1926
Insomnie Familiale Fatale (IFF)	Mutations héréditaires du gène <i>Prnp</i>	1992
Insomnie Fatale Sporadique (IFS)	Mutations non héréditaires du gène <i>Prnp</i> , ou conversion spontanée de la PrP ^c en PrP ^{sc}	1992

2. Les caractéristiques des maladies à prions

Comme nous l'avons vu, il existe différentes formes de maladies à prion, liées à la nature de la protéine non conventionnelle qui en est responsable. On les distingue par leur durée d'incubation, leur profil lésionnel, et leur signature biochimique.

a. Durée d'incubation

Une des principales caractéristiques de ces maladies est leur longue, voire très longue, phase d'incubation asymptomatique. Chez le bovin, cette période peut durer 5 ans, et elle peut atteindre 30 à 40 ans chez l'homme.

b. Profil lésionnel

L'examen histologique post-mortem du tissu cérébral montre des lésions de type spongieuse par vacuolisation du corps cellulaire neuronal, ainsi qu'une atteinte au niveau des astrocytes qui s'hypertrophient pour donner lieu à une astroglie (figure 2). Les régions lésées présentent également, assez fréquemment, des dépôts nommés plaques amyloïdes (figure 2F) qui correspondent à des amas hautement ordonnés formés par l'accumulation de protéine prion pathologique.

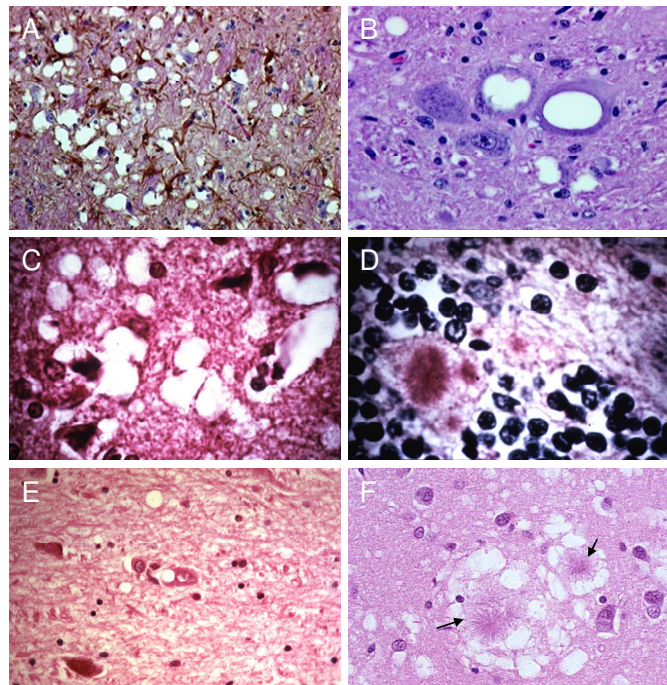


Figure 2 : Coupes histologiques de cerveau de mouton atteint de tremblante (A) et (B); **de cerveau humain** atteint de maladie de Kuru (C) et (D), de maladie de Creutzfeldt-Jakob (E), de vMCJ (F). Ces coupes mettent en évidence un phénomène de vacuolisation des corps neuronaux. Les flèches noires (F) mettent en évidence les dépôts amyloïdes. D'après www.inra.fr et Budka (2000).

c. Signature biochimique

Le profil électrophorétique de la protéine prion après digestion par la PK diffère selon l'origine de la maladie à prion. Comme nous le verrons plus loin, trois glycoformes de la PrP existent, et leur ratio, ainsi que la taille des fragments générés par la digestion PK constituent une signature des différentes souches de prion (Aguzzi *et al.*, 2007).

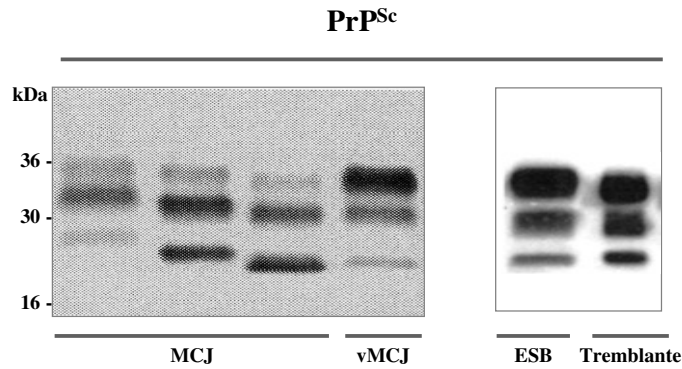


Figure 3 : Signature biochimique de PrP^{Sc}

Le profil électrophorétique de l'isoforme PrP^{Sc} est une caractéristique permettant d'identifier les différentes souches de maladies à prion.

II- Caractéristiques de la protéine prion cellulaire

Aujourd'hui, la survenue des ESST reste pour une grande partie un mystère aux yeux de la communauté scientifique. Cependant, même s'il demeure encore d'importantes zones d'ombre, leur étude a permis de mettre en évidence l'agent responsable : la protéine prion, codée par le gène *Prnp*.

1. Le gène codant la protéine prion

La protéine prion est une protéine endogène naturellement présente chez les mammifères. Elle est codée par le gène *Prnp*. Dans les années 1970, Dickinson et son équipe mettent en évidence que la pathologie ne peut se développer que si un gène est exprimé : il s'agit du gène *Sinc* (Scrapie Incubation period) (Dickinson *et al.*, 1978). En 1985, en se basant sur la séquence protéique *N*-terminale de la PrP, le gène codant la PrP est identifié et baptisé *Prnp* (Oesch *et al.*, 1985). Ce n'est qu'avec les travaux de Moore (Moore *et al.*, 1998) qu'il est formellement démontré que *Sinc* et *Prnp* ne sont finalement qu'un seul et même gène.

a. Organisation génomique du gène *Prnp*

Le gène *Prnp* est très conservé chez les mammifères (Westaway et Prusiner 1986). Sa présence, à la fois chez l'Homme et la souris au sein d'un même groupe synténique (Sparkes *et al.*, 1986), mais aussi l'existence d'un gène *Prnp* chez le poulet (Gabriel *et al.*, 1992+3) sont des éléments décisifs qui prouvent que ce gène était présent avant la spéciation des mammifères.

Le gène *Prnp* est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme et 2 chez la souris (Sparkes *et al.*, 1986). Chez le bovin et le mouton, il est situé sur le chromosome 13 (Lee *et al.*, 1998). Il est composé de deux exons chez le hamster et le wallaby, et de trois exons chez le rat, la souris, le bovin et le mouton (figure 4). Chez l'homme, on note la présence de deux exons, mais également d'un pseudo-exon 2 (exon 2-like, figure 4).

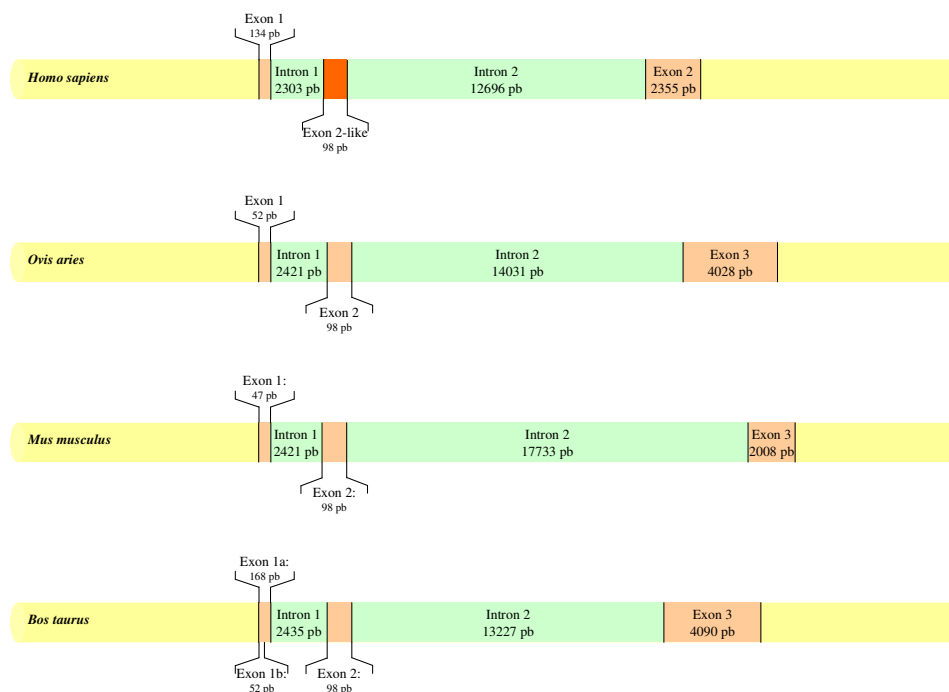


Figure 4 : Organisation génomique des gènes *Prnp* humain, ovin, murin, et bovin. Les exons sont indiqués en orange pâle et les introns en vert pâle. Chez l'homme, l'existence d'un pseudo-exon est signifiée en orange vif. D'après Heaton *et al.* (2003) ; Lee *et al.* (1998).

Dans tous les cas, seul l'exon le plus en aval (exon 3 chez la souris, le bovin et le mouton, exon 2 chez l'homme) est codant (Lee *et al.*, 1998), ce qui exclut toute possibilité que la forme pathologique PrP^{Sc} soit issue d'un phénomène d'épissage alternatif du transcrite primaire (Basler *et al.*, 1986). Seul un cas d'épissage alternatif a été observé chez le bovin, mais il ne concerne que la région 5' non traduite. Ainsi, deux transcrits peuvent être retrouvés : l'un possédant l'exon 1 complet long de 168 nucléotides, l'autre étant dépourvu d'une partie de cet exon, nommé exon 1b, portant la longueur de l'exon à seulement 52

nucléotides. On retrouve ces deux types de transcrits dans tout l'organisme, excepté dans la rate où seul le transcrit « court » est détecté. (Horiuchi *et al.*, 1997). Il en résulte un faible taux d'expression de la PrP^c dans la rate. Les auteurs suggèrent donc que la totalité de l'exon 1 doit être présente pour une bonne traduction de la protéine.

b. Régulation de l'expression du gène *Prnp*

Les premières études menées sur la régulation de l'expression du gène *Prnp* ont concerné sa région promotrice. *Prnp* a longtemps été considéré comme un gène de ménage car il ne possède pas de boîte TATA dans sa région promotrice (Baybutt et Manson 1997), mais des régions riches en îlots CpG, caractéristiques des gènes exprimés de façon constante et ubiquiste (pour revue, voir Linden *et al.*, 2008). Outre la région promotrice, la transcription des exons 1 et 2 dans la majorité des espèces souligne leur importance pour l'expression du gène. De même les régions introniques ont une grande importance pour l'expression puisqu'il a été montré que l'intron 1 était indispensable à l'activité totale de la région promotrice (Inoue *et al.*, 1997). Récemment, les travaux de Haigh *et al* (2007) ont mis en évidence que l'expression des gènes *Prnp* bovin et murin était modulée à la fois par l'intron 1 et par l'exon 1, l'exon 2 n'étant lui pas indispensable. En effet, l'intron 1 possède un effet promoteur sur la transcription du gène, mais cette activité promotrice est plus forte quand il est associé à l'exon 1. Seul, ce dernier ne possède aucune activité promotrice. L'intron 1 a donc une activité « promoteur-like » et contrairement au promoteur proprement dit, il possède une boîte TATA ainsi que des sites de liaisons pour des facteurs de transcription (figure 5) (Haigh *et al.*, 2007).

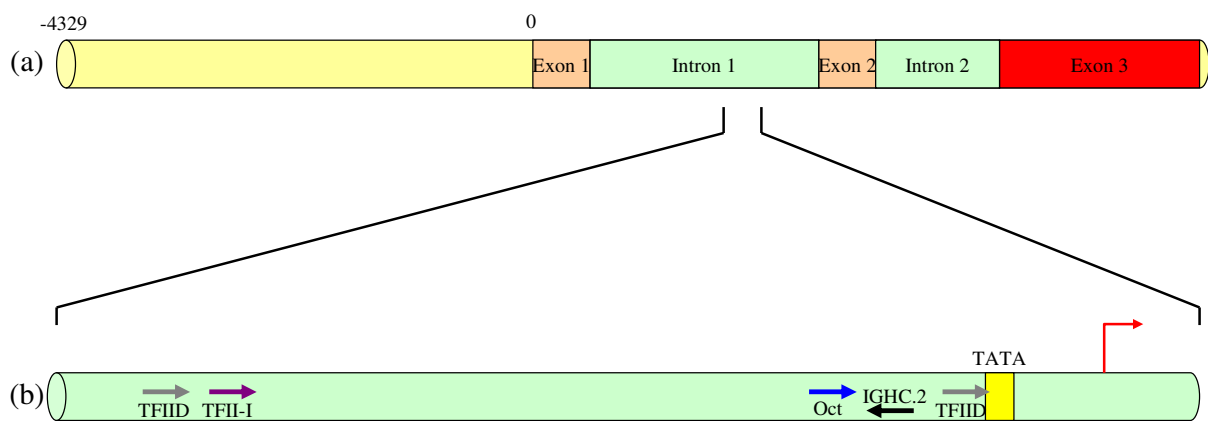


Figure 5: La régulation du gène *Prnp* chez le bovin. (a) Représentation schématique du gène *Prnp* bovin. La région promotrice du gène est représentée en jaune pâle. (b) Organisation potentielle de la région « promoteur-like » au sein de l'intron 1. Les sites de liaisons des facteurs de transcription TFIIID, TFII-I, IGHC.2, et des facteurs Oct sont représentés par des flèches épaisses et la boîte TATA est signifiée en jaune vif. Le site initiateur présumé de la transcription est représenté par une flèche rouge à angle droit. D'après Haigh *et al.* (2007).

Aucun transcrit alternatif éliminant une partie de l'exon 1 n'a été retrouvé chez le mouton ou la chèvre. Par contre, dans ces deux espèces, on assiste à un phénomène de polyadénylation alternative du transcrit. On retrouve ainsi deux types d'ARNm matures : un transcrit de 2,1 kb et un transcrit de 4,6 kb qui ne diffèrent l'un de l'autre que par l'utilisation d'un signal de polyadénylation alternatif (Daude 2004 ; Goldmann *et al.*, 1999). D'après les auteurs, cette différence de signal de polyadénylation affecte soit la bonne initiation de la traduction, soit la stabilité des ARNm et explique le fait qu'*in vivo*, un fort taux de protéines est associé à la présence des transcrits longs de 4,6 kb, plus stables.

Contrairement au cadre ouvert de lecture du gène *Prnp*, très conservé au sein des espèces, les séquences promotrices sont quant à elles peu homologues : 89 % d'homologie entre les séquences 5' non traduites du mouton et du bovin, mais seulement de 46 à 62 % d'homologie entre le bovin et les rongeurs ou l'homme (Inoue *et al.*, 1997). Aucun transcrit ne présentant de variations au niveau de la région 5'UTR n'a été mis en évidence chez le mouton ou chez la chèvre, ce qui suggère que dans ces espèces, les transcrits *Prnp* sont régulés par la région 3'UTR. Au contraire, chez le hamster, le bovin ou la souris, aucune variabilité n'a été observée au niveau de la région 3'UTR, ce qui suggère que la régulation est réalisée par la région 5'UTR (Goldmann *et al.*, 1999 ; Haigh *et al.*, 2007).

2. La protéine prion cellulaire PrP^c

a. Caractéristiques moléculaires

Le produit initial de la traduction du gène *Prnp* est une protéine naturellement présente dans l'organisme de 253 acides aminés chez l'homme, 254 chez la souris et le hamster, et 256 chez le mouton. C'est la numérotation ovine qui servira de référence pour la suite du document. La structure de la protéine prion a été partiellement résolue grâce aux techniques de RMN et de dichroïsme circulaire. Elles ont montré que la protéine prion (figure 6) est constituée d'un domaine globulaire C-terminal allant des résidus 124 à 234 (Lysek *et al.*, 2005). Ce domaine est très structuré et comporte trois hélices α situées entre les résidus 148 et 158 (hélice α_1), 179 et 197 (hélice α_2) et 204 et 223 (hélice α_3). Deux brins β ont été mis en évidence entre les acides aminés 131 et 134 d'une part (brin β_1) et 165 et 168 d'autre part (brin β_2). Ces deux brins se combinent l'un avec l'autre pour adopter une disposition antiparallèle (Lysek *et al.*, 2005). C'est en accord avec les résultats obtenus par dichroïsme circulaire, qui indiquent que la protéine prion cellulaire PrP^c contient une majorité d'hélices α

(43%) et une très faible proportion de brins β (Safar *et al.*, 1993). Les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ contiennent chacune un résidu cystéine (C182 et C217), liés entre eux par un pont disulfure.

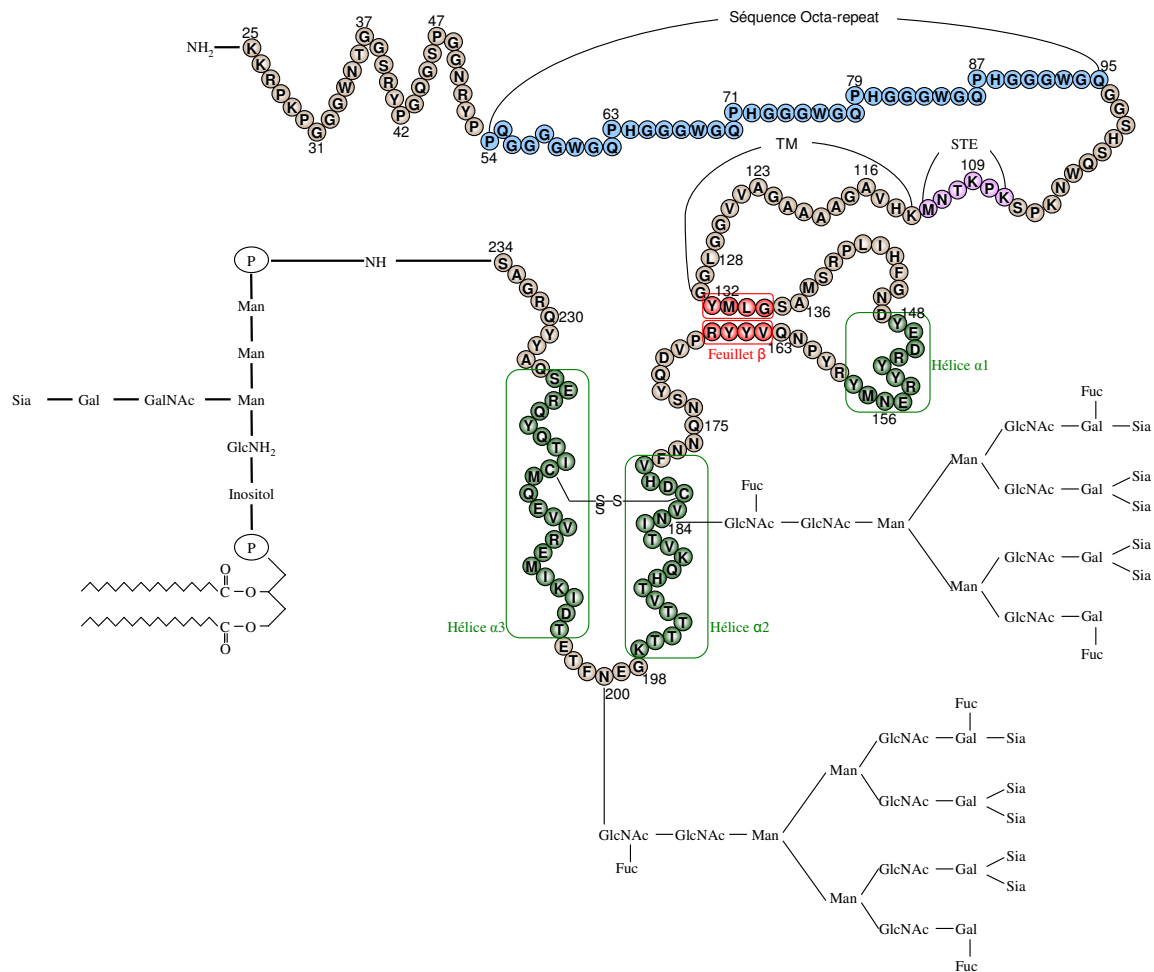


Figure 6 : Structure secondaire de la protéine prion ovine mature. Les acides aminés entrant dans la composition des structures secondaires sont encadrés en vert (hélices α) et en rouge (feuillet β). La numérotation se réfère à la protéine prion native avant les différents clivages. D'après Martin *et al.* (2009) ; Riesner (2003).

La partie *N*-terminale est beaucoup moins structurée, ce qui a rendu son analyse très difficile, car sa structure dépend des conditions environnementales (pH, présence de cuivre ou non). La caractéristique majeure de cette région de la protéine prion est la présence de répétitions de huit acides aminés, d'où son nom d'octarepeat (OR). Le nombre de répétitions varie en fonction des espèces et au sein d'une même espèce. Il y en a en général 4 chez l'homme mais ce chiffre peut varier (de 1 à 9), un grand nombre d'OR pouvant être associé à la maladie (Mead 2006). Chez le bovin, on retrouve de 4 à 7 OR, de 3 à 5 chez la chèvre et de 5 à 6 chez le mouton (Goldmann 2008).

Une région hydrophobe, comprise entre les résidus 117 et 130, correspond à une séquence d'insertion membranaire potentielle, expliquant la présence de formes transmembranaires de la protéine prion dans les cellules. Cette région est précédée d'une séquence hydrophile (résidus 107 à 112) nommée STE (Stop Transfer Effector) qui permet l'arrêt de la translocation de la protéine immature dans le réticulum endoplasmique (RE) avant l'insertion dans la membrane de la région hydrophobe citée précédemment (Hegde *et al.*, 1998). Enfin, la protéine prion immature possède un peptide signal réticulaire correspondant aux acides aminés 1 à 24 et un peptide signal d'ancrage d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) au niveau des résidus 235 à 256.

b. La maturation de la protéine prion

La voie de biosynthèse de la PrP^c est semblable à celle de nombreuses autres protéines membranaires et sécrétées : elle est tout d'abord synthétisée à l'intérieur du réticulum endoplasmique granuleux (REG), va transiter par l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane plasmique. C'est au cours de sa biosynthèse dans le REG que la protéine prion subit des modifications post-traductionnelles importantes telles que le clivage du peptide signal réticulaire, l'addition non-obligatoire des deux chaînes oligosaccharidiques sur les deux sites potentiels de *N*-glycosylation, la formation du pont disulfure, et la substitution de la séquence hydrophobe C-terminale (peptide 235-256) par l'ancre GPI. La PrP mature possède 209 résidus d'acides aminés (figure 6) (pour revue, voir Linden *et al.*, 2008). Si la forme glypiée est majoritaire et représente environ 80 % des protéines prion, il existe aussi des formes transmembranaires non glypiées, dues à l'existence d'une région hydrophobe (utilisée comme domaine transmembranaire) et d'une région STE (voir plus haut). Ces formes transmembranaires peuvent avoir deux orientations (figure 7) : soit avec le domaine C-terminal réticulaire et le domaine *N*-terminal cytosolique (nommée ^{Ctm}PrP), soit avec le domaine *N*-terminal réticulaire et le domaine C-terminal cytosolique (nommée ^{Ntm}PrP) (Hegde *et al.*, 1998). Il existe également une forme sécrétée, qui n'est ni glypiée ni transmembranaire mais tronquée au niveau de la glycine 228 (Stahl et Prusiner 1991).

Enfin, comme de nombreuses autres protéines, la PrP peut subir des clivages protéolytiques, en particulier entre les acides aminés 110 et 111 (site α) et produire deux fragments C1 (C-terminal, de 17 kDa) et N1 (N-terminal). Elle peut également subir un clivage au sein des séquences octa-repeat (site β) donnant naissance à un fragment C2 (C-terminal, de 22 kDa) et un fragment N-terminal N2 (Chen *et al.*, 1995 ; Mange *et al.*, 2004 ; Perini *et al.*, 1996).

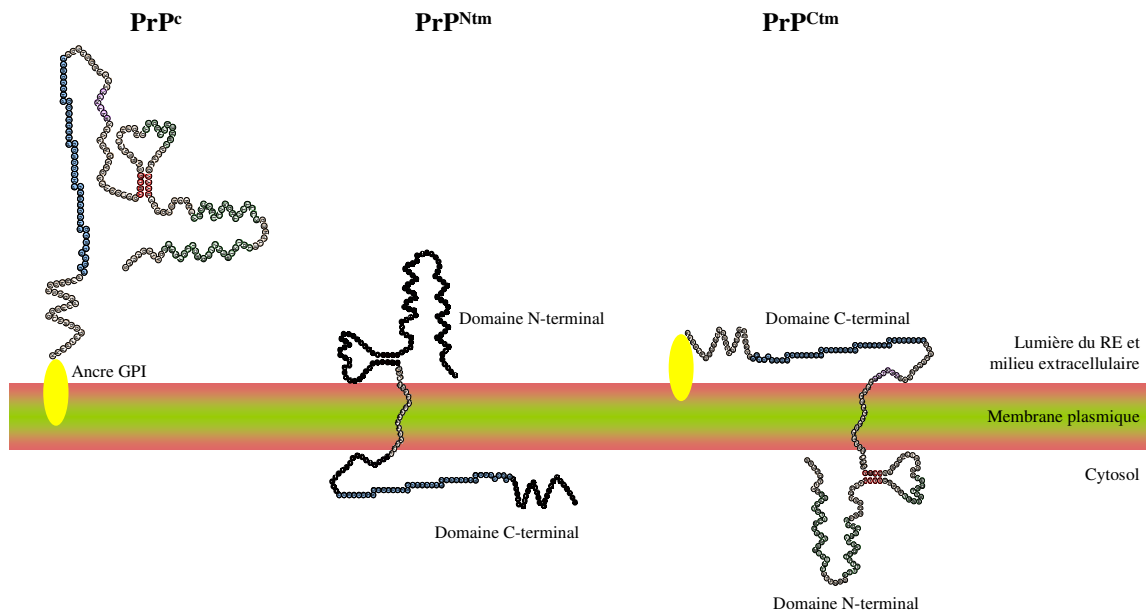


Figure 7 : Représentation des différentes topologies de la protéine prion.

Majoritairement, la PrP est ancrée à la membrane par son ancre GPI (PrP^c). Cependant elle peut également exister sous forme transmembranaire non glypiée (PrP^{Ntm}) ou transmembraine et glypiée (PrP^{Ctm}). D'après Hedge *et al.* (1998).

c. La protéine prion, une protéine glycosylée

La protéine prion possède deux sites potentiels de *N*-glycosylation et des sites d'*O*-glycosylation. Aucune donnée à l'heure actuelle n'a apporté la preuve de l'occupation des sites d'*O*-glycosylation sur cette protéine (Lawson *et al.*, 2005). Par contre, il est bien établi que les deux sites de *N*-glycosylation en position N156 et N200 (figure 6) peuvent être occupés de façon non-obligatoire. En effet, on trouve de façon simultanée des formes non-glycosylées, mono-glycosylées et bi-glycosylées de la protéine prion (Lawson *et al.*, 2005). Cette propriété confère un profil électrophorétique à trois bandes comprises entre 25 et 37 kDa (Figure 8).

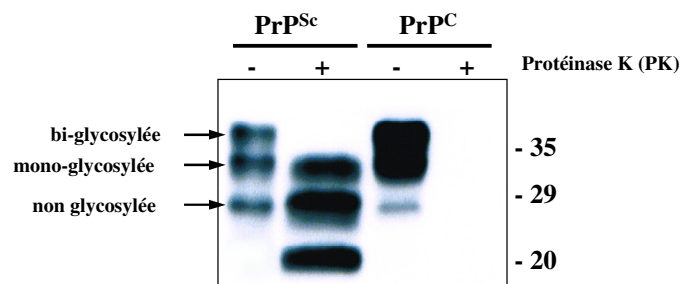


Figure 8 : Profil électrophorétique des protéines prion PrP^{Sc} et PrP^C.

La glycosylation potentielle et non obligatoire de la protéine engendre un profil à trois bandes, correspondant aux formes bi-, mono-, et non glycosylées. Après digestion PK (+), le signal à trois bandes de la PrP^{Sc} est conservé mais à des poids moléculaires plus faibles, tandis que le signal PrP^C disparaît totalement. D'après Rudd *et al.* (2002).

c. Expression tissulaire de la protéine prion

Il est aujourd'hui acquis que la PrP a une expression ubiquiste (Brown *et al.*, 1990 ; Moudjou *et al.*, 2001). En effet, des transcrits d'ARN messagers du gène sont retrouvés dans la totalité des tissus mais avec des niveaux d'expression différents : de très grandes quantités sont retrouvées dans les cellules neuronales ou dans le cerveau (Manson *et al.*, 1992), des quantités intermédiaires dans le cœur et les poumons et des quantités relativement faibles dans la rate (Oesch *et al.*, 1985). Les travaux de Ford *et al.* (2002) mettent en évidence une forte discordance entre les taux d'expression des ARN messagers et la présence de protéines dans le système nerveux central (SNC) (figure 9 A et B). En effet, dans les cellules granulaires du cervelet où l'expression du messenger est relativement forte, de très faibles quantités de PrP^c sont détectées. Les auteurs ont également mis en évidence que, selon le type cellulaire, voire même suivant la voie neurochimique empruntée par les neurones, ceux-ci vont exprimer des quantités différentes de PrP^c (figure 9 C et D). Ainsi, les neurones GABAergiques concentrent plus de protéine prion que les neurones cholinergiques dans lesquels elle est faiblement détectable, alors que dans les neurones dopaminergiques elle n'est pas mise en évidence malgré le fort taux de transcrits (Ford *et al.*, 2002a).

Au contraire des cellules du SNC (figure 9A et B), dans les neurones périphériques et dans les tissus non-nerveux, une très bonne corrélation a été observée entre la répartition des ARNm et les protéines (Ford *et al.*, 2002b). Les auteurs expliquent cette divergence par un turn-over extrêmement rapide de la PrP^c au sein des cellules granulaires du cervelet.

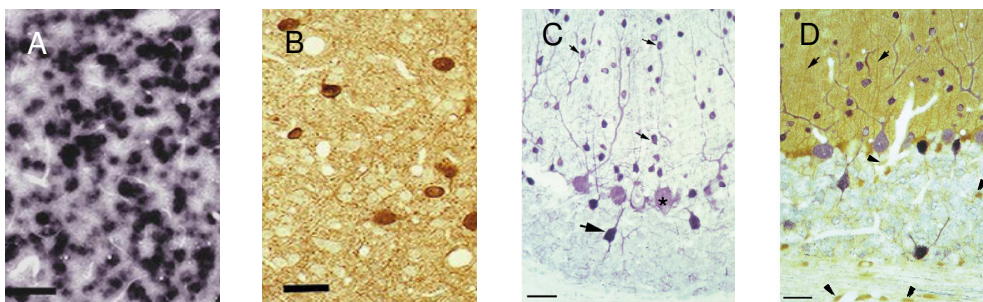


Figure 9 : (A et B) Coupes sagittales du collicule inférieur de cerveau de souris. (A) L'hybridation *in situ* permet de détecter l'ARN messenger de *Prnp* réparti de façon homogène alors que l'expression des protéines PrP (B) est, elle, assez localisée. **(C et D) Analyses immunohistochimiques de l'expression de PrP^c dans des régions représentatives du cortex cérébelleux.** (C) Les interneurones golgiens de types II de la couche granuleuse (flèche épaisse), les cellules étoilées de la couche moléculaire (flèches fines) ou les cellules de Purkinje (astérisque) montrent un marquage au niveau de leur corps cellulaire, et de leurs dendrites. (D) Un double marquage anti-PrP^c (en violet) et anti-S100 (en brun), marqueur des cellules neuronales, permet de mettre en évidence que les cellules gliales de Bergmann (flèches fines) dans la couche moléculaire et les astrocytes (pointe de flèche) dans la couche granuleuse n'expriment pas PrP^c. D'après Ford *et al.* (2002a)

Cependant, les différentes études visant à détecter la protéine prion à l'aide d'anticorps se heurtent aux limites habituelles de cette technique : le seuil de détection. C'est la raison pour laquelle Barmada *et al* (2004) ont utilisé une souris transgénique exprimant une protéine de fusion PrP-EGFP afin de visualiser la distribution tissulaire de la PrP au niveau du système nerveux (figure 10). Cette expérience met en évidence que la protéine prion est particulièrement abondante dans l'hippocampe, le cortex et le striatum, que des quantités modérées sont retrouvées dans le thalamus et le bulbe olfactif. Par contre, elle est peu présente dans les cellules granulaires du cervelet et le tronc cérébral (Barmada *et al.*, 2004) ce qui confirme les résultats de Ford *et al* (2002).

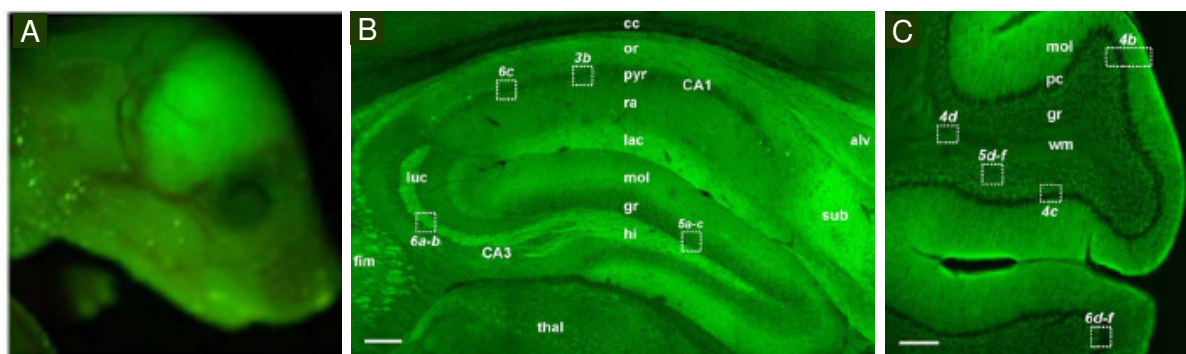


Figure 10: Distribution tissulaire de la PrP^c au niveau du système nerveux central de la souris transgénique PrP-EGFP

(A) Tête d'une souris transgénique PrP-EGFP visualisée à 1 jour post-natal grâce à un microscope de dissection équipé d'une lampe fluorescente et de filtre FITC. (B) Formation hippocampique et du gyrus denté observé sous microscopie confocale. Les abréviations sont : **alv**, alveus ; **cc**, corps calleux ; **fim**, fimbria ; **gr**, couche granulaire ; **hi**, hilus ; **lac**, stratum lacunosum ; **luc**, stratum lucidum ; **or**, stratum oriens ; **pyr**, couche pyramidale ; **ra**, stratum radiatum ; **sub**, subiculum ; **thal**, thalamus. (C) Cervelet (en coupe) visualisé sous microscopie confocale. Les abréviations sont : **mol**, couche moléculaire ; **pc**, couche cellulaire de Purkinje ; **gr**, couche cellulaire granulaire ; **wm**, substance blanche. Les barres d'échelles correspondent à 200µm. D'après Barmada *et al.* (2004).

3. Trafic et localisation intra cellulaires de la protéine prion

La protéine prion existe sous différentes formes : glypiée, transmembranaire ou tronquée. Des expériences de marquage métabolique ont permis d'estimer sa demi-vie à une durée de 3 et 6 heures dans les cellules de neuroblastomes (Caughey *et al.*, 1989). Cette demi-vie est plus courte dans des cultures primaires de neurones, de l'ordre d'une heure (Parizek *et al.*, 2001).

Au sein de la membrane plasmique, une partie de la fraction glypiée de la PrP^c est localisée dans des microdomaines dont l'organisation est particulière, enrichis en cholestérol et en sphingolipides, et qui sont résistants à l'action de détergents doux (Prado *et al.*, 2004), les rafts ou DRM (Detergent Resistant Membranes) (Pike 2006). Dans ces microdomaines membranaires, la protéine peut être endocytée ou subir un clivage protéolytique, par

l'intermédiaire d'une alpha-sécrétase ou d'une phospholipase, ce qui conduit à la libération de la PrP^c dans le milieu extracellulaire (Harris *et al.*, 1993 ; Vincent *et al.*, 2008).

Des expériences de marquage immunologique dans des neurones sensoriels ont mis en évidence que la PrP^c est rapidement internalisée. Elle subit ainsi plusieurs cycles d'endocytose (figure 12), au cours desquels elle est majoritairement réorientée vers la membrane plasmique (Shyng *et al.*, 1993). Seuls 10 % des protéines prion endocytées vont être dégradés à chaque cycle (Lehmann *et al.*, 1999).

Les voies par lesquelles la PrP^c est endocytée sont encore sujettes à controverse. En effet, certains auteurs font état d'une endocytose par l'intermédiaire des cavéoles (Peters *et al.*, 2003), de petites invaginations au niveau de la membrane plasmique, riches en protéines de la famille des cavéolines mais dépourvues de clathrine. Ces organelles sont étroitement liées aux rafts du fait de leur composition lipidique et protéique qui leur permet de résister aux détergents, et permettent l'internalisation des protéines glypiées.

Une autre voie d'endocytose, liée aux puits recouverts de clathrine, a été décrite dans les lignées cellulaires CHO et N2a (Magalhaes *et al.*, 2002 ; Shyng *et al.*, 1994). Ceci est inhabituel pour une protéine glypiée dépourvue de domaine cytoplasmique d'interaction avec la clathrine. Ce mécanisme d'endocytose suppose que la PrP^c sorte des rafts pour migrer vers les puits recouverts de clathrine avant d'être internalisée (Sunyach *et al.*, 2003).

Bien que l'on n'explique pas encore comment la PrP peut être ciblée vers le noyau, sa présence y a été démontrée, plus précisément dans le nucléole de cellules N2a infectées par la PrP^{Sc} (Pfeifer *et al.*, 1993). Des travaux plus récents ont établi la présence de deux signaux de localisation nucléaire (NLS) cryptiques, le premier correspondant aux acides aminés 1 à 5 (KKRPK), et le second aux résidus 80 à 85. Ces séquences pourraient agir individuellement ou ensemble afin de diriger le fragment N-terminal de la PrP vers le noyau (Gu *et al.*, 2003). Cependant, une récente étude du signal KKRPK a montré que ce dernier nécessite la présence d'une seconde séquence, hydrophobe, afin de pouvoir perturber l'équilibre des membranes et permettre une translocation de la protéine (Oglecka *et al.*, 2008).

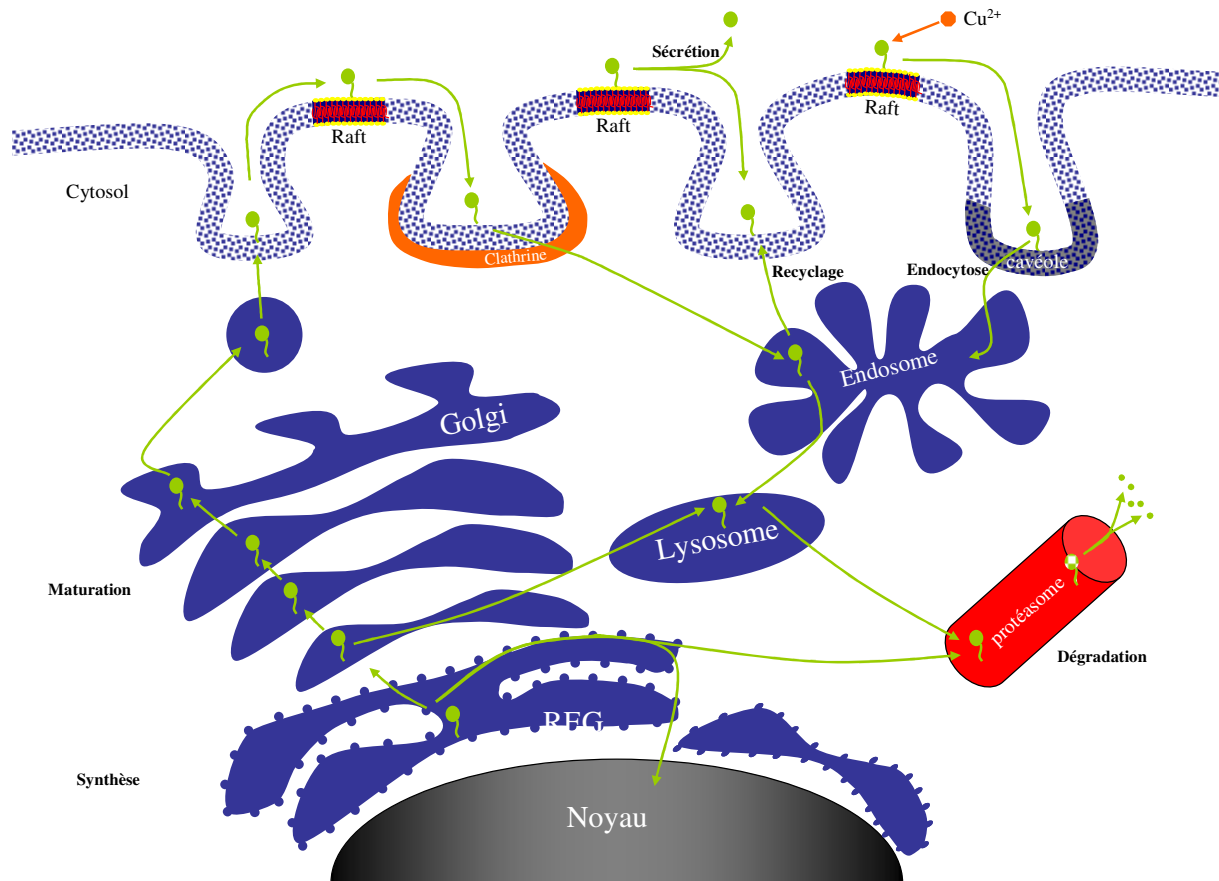


Figure 11: Illustration du trafic intracellulaire de la protéine prion. La protéine prion, représentée en vert, est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG), poursuit sa maturation dans l'appareil de Golgi, puis est excrétée vers la membrane où elle est localisée dans les rafts. Elle subit ensuite des cycles d'endocytose en suivant différentes voies.

4. Les fonctions de la protéine prion cellulaire

La bonne conservation de la protéine prion au sein des espèces et plus particulièrement chez les mammifères suggère un rôle important. Ainsi la création de souris transgéniques n'exprimant pas la protéine était très attendue pour élucider son ou ses rôles. Curieusement les expériences de KO du gène *Prnp* chez la souris (*Prnp*^{-/-}) ne mettent pas en évidence de phénotype particulier : les souris se développent normalement et présentent un phénotype normal (Bueler *et al.*, 1993).

Si la fonction proprement dite de la protéine prion reste à déterminer, des processus cellulaires influencés par la PrP^c ont été clairement identifiés.

a. Régulation du métabolisme du cuivre et protection contre le stress oxydatif

Le domaine *N*-terminal de la protéine, et plus particulièrement les régions octarepeat (OR) ont la capacité de lier les ions cuivre Cu^{2+} selon un processus de coopérativité (Brown *et al.*, 1997). Dans ces régions, une séquence minimale HGGGW est nécessaire pour lier les ions Cu^{2+} (Burns *et al.*, 2002). Deux résidus supplémentaires sont capables de lier le cuivre dans la région dite amyloïdogène, entre les OR et le domaine C-terminal globulaire : il s'agit des His⁹⁹ et His¹¹⁴ (Viles *et al.*, 2008). Bien que la liaison du cuivre à la PrP soit établie, son influence sur la fonction de la protéine reste à élucider. Des éléments tendent à montrer que le cuivre a une action sur la stabilité de la protéine : en effet, en présence d'ions Cu^{2+} , la proportion d'hélices α serait augmentée et s'accompagnerait d'une diminution de la quantité de feuillets β (Miura *et al.*, 1996). Ces travaux sont toutefois sujets à controverse puisque d'autres équipes ont montré au contraire que la liaison du cuivre augmenterait la proportion de feuillets β , ce qui engendrerait l'apparition d'une résistance aux protéases (Qin *et al.*, 2000). Enfin, la protéine liée au cuivre a une propension plus forte à s'agréger que lorsqu'elle est libre (Jobling *et al.*, 2001), ce qui semble plus en adéquation avec les résultats de Qin.

La liaison de la protéine prion au cuivre semble lui conférer un rôle dans la protection contre le stress-oxydatif. En effet, la protéine prion liée au cuivre se comporte comme un couple redox (Shearer et Soh 2007), et un grand nombre d'articles font état d'un rôle de superoxyde dismutase (SOD) pour la protéine prion. Cependant, il n'y a pas d'observation directe d'une activité antioxydante (Davies et Brown 2008) : la seule preuve d'une telle activité est l'affinité de la protéine pour le cuivre. De plus, les différents travaux réalisés afin de déterminer la constante d'affinité de la protéine envers le cuivre sont très hétérogènes puisque cette constante varie de l'ordre du femtomolaire (Jackson *et al.*, 2001) à celui du micromolaire (Viles *et al.*, 1999).

La PrP possède de multiples sites de liaisons aux ions métalliques, mais avec une affinité particulière pour le cuivre. La PrP peut-elle fixer directement le cuivre à partir de ses transporteurs sériques, dont les constantes d'affinité se situent aux alentours de 10-100 picomolaire (Masuoka *et al.*, 1993)? Cette question reste à éclaircir en précisant l'affinité de la PrP pour le cuivre : en effet si l'affinité est de l'ordre du femtomolaire, alors elle pourra séquestrer les ions cuivre et intervenir sur la régulation de leur métabolisme. Si au contraire elle se situe dans l'ordre du micromolaire, voire du nanomolaire, cette activité ne pourra avoir lieu.

Enfin, les travaux de Haigh *et al.* (2005) montrent que des quantités physiologiques de cuivre stimulent l'internalisation par endocytose de la PrP (figure 12).

b. Transduction de signaux

Comme d'autres protéines associées aux rafts, la PrP^c interagit avec un grand nombre de partenaires. Cette localisation particulière suggère un rôle dans les voies de signalisation.

Le premier exemple de l'implication de la PrP dans une voie de signalisation a été décrit dans le modèle cellulaire murin 1C11 (figure 11). Ces cellules sont capables de se différencier dans deux voies bioaminergiques distinctes, noradrénergique ou sérotoninergique. Dans les cellules différenciées, la liaison d'un anticorps à la PrP provoque l'activation de la tyrosine kinase Fyn, par l'intermédiaire de la cavéoline, ce qui déclenche une cascade de signalisation et aboutit à l'activation des kinases ERK1/2. Dans les cellules précurseurs indifférenciées, la liaison de l'anticorps à la PrP induit également une cascade de signalisation qui active les kinases ERK1/2 indépendamment de la kinase Fyn (Mouillet-Richard *et al.*, 2000).

La stimulation de la PrP par un anticorps a également permis de mettre en évidence une augmentation de la production de radicaux libres (ROS) par la NADPH oxydase, aussi bien dans la lignée 1C11 quel que soit son état de différenciation, que dans la lignée lymphocytaire T BW5147, ou dans la lignée hypothalamique neuroendocrine GT1 (Schneider *et al.*, 2003). Ces ROS agissent comme des seconds messagers qui vont à leur tour activer les MAP kinases ERK 1/2, impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Toutefois, la voie de signalisation induite par la PrP^c peut également activer la kinase ERK1/2 par l'intermédiaire d'une voie différente, indépendante des ROS, mais contrôlée par Fyn, et ce, exclusivement dans les cellules 1C11 bioaminergiques, ce qui introduit une notion de spécificité dépendante du contexte neuronal (Mouillet-Richard *et al.*, 2007).

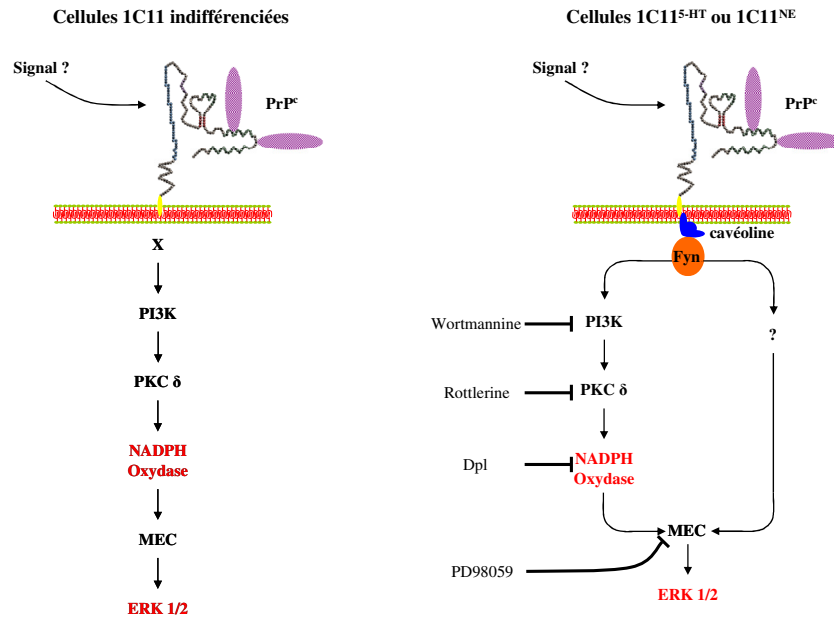


Figure 12: Voie de signalisation impliquant PrP^c dans la lignée 1C11. L'utilisation de différents inhibiteurs connus des intermédiaires de la voie de signalisation a permis aux auteurs de mettre au point cette représentation schématique. D'après Schneider *et al.* (2003).

D'autre part, la PrP^c interagit directement avec les NCAM neuronales. La PrP^c, qui ne peut interagir directement avec des voies de signalisation intra cellulaires, recrute les NCAM au sein des rafts et les y stabilise pour activer la kinase Fyn, afin de promouvoir la neuritogénèse dépendante des NCAM (Beggs *et al.*, 1994 ; Santuccione *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'utilisation de protéine prion recombinante sur des cultures primaires de neurones augmente fortement le développement de la polarité neuronale, ce qui inclut la définition et la croissance des neurites, la longueur des axones, la formation du réseau neuronal et le développement de contacts synaptiques (Kanaani *et al.*, 2005). Ceci s'accompagne de l'activation de nombreuses kinases comme Fyn, PKC, PKA, PI-3 kinase / Akt et ERK 1/2 (Chen *et al.*, 2003 ; Kanaani *et al.*, 2005).

c. Activité neuro-protectrice

L'étude des neurones issus des souris *Prnp*^{-/-} a montré une grande susceptibilité de ces cellules vis-à-vis de l'apoptose, quand celles-ci sont privées de sérum (Kuwahara *et al.*, 1999). Plusieurs études indiquent que la PrP^c possède une fonction de cytoprotection en diminuant le taux de cellules en apoptose après un stimulus tel qu'une surexpression de *Bax* ou la présence de TNF- α , deux facteurs pro-apoptotiques (Bounhar *et al.*, 2001). Bien que certaines études aient montré que la présence de la PrP dans le cytosol était toxique (Ma *et al.*,

2002), d'autres, au contraire ont montré que la présence de cette protéine dans ce compartiment cellulaire protégeait les neurones primaires humains de l'apoptose par *Bax* (Roucou *et al.*, 2003). Dans ce cas, la PrP^c inhiberait le changement conformationnel de *Bax* nécessaire à l'induction de l'apoptose, et empêcherait la libération du cytochrome c de la mitochondrie (Roucou *et al.*, 2005). Ceci corrobore les travaux de Diarra-Mehrpour *et al.* (2004). En effet, dans des cellules MCF-7, lignée cellulaire issue d'une tumeur mammaire, et résistante à l'apoptose induite par le TNF- α , le gène *Prnp* est surexprimé 17 fois. Au contraire, une surexpression de la PrP^c induite dans des cellules MCF-7, expérimentalement rendues sensibles à l'apoptose induite par le TNF- α , les convertit en cellules résistantes à cette voie apoptotique (Diarra-Mehrpour *et al.*, 2004).

Enfin, la fonction neuro-protectrice de la PrP^c suite à une ischémie a également été étudiée. Dans le cerveau de rongeurs, le taux de PrP^c augmente après l'ischémie (Shyu *et al.*, 2005 ; Weise *et al.*, 2004). De plus une sur-expression de la PrP^c chez des rats réduit la taille de la zone lésée et améliore le comportement neurologique à la suite d'une ischémie (Shyu *et al.*, 2005). Au contraire, des souris *Prnp*^{-/-} voient la taille de leurs lésions augmenter après un déficit de débit sanguin au niveau du cerveau (McLennan *et al.*, 2004 ; Weise *et al.*, 2006). Il semblerait que la région octarepeat de la PrP soit nécessaire pour que cette activité neuro-protectrice dans les cerveaux de souris ischémiques soit fonctionnelle (Mitteregger *et al.*, 2007).

d. La PrP^c et la synapse

La distribution de la PrP dans les synapses est encore sujette à controverse. En effet, même si sa présence y est bien établie, sa localisation précise est encore à affiner. Grâce à des expériences d'immuno-microscopie, il a été montré que la PrP^c est présente au niveau du bouton synaptique, et de façon prépondérante en position pré-synaptique (Fournier *et al.*, 1995 ; Moya *et al.*, 2000 ; Sales *et al.*, 1998 ; Tateishi *et al.*, 1996). Cependant, d'autres travaux ont décrit une distribution plus large de la PrP^c dans les neurones (Laine *et al.*, 2001 ; Mironov *et al.*, 2003). Ces différences sont probablement dues aux limites de la technique d'immunodétection, en particulier avec la protéine prion. En effet, non seulement cette protéine possède une conformation variable surtout au niveau de sa région non-globulaire, mais elle subit aussi un certain nombre de modifications telles que clivages, glycosylation, translocation... Ceci induit la présence simultanée de nombreuses formes de la même protéine, dont les épitopes ne sont pas forcément accessibles aux anticorps utilisés. Ainsi les produits de dégradation de la PrP^c peuvent avoir des topologies subcellulaires distinctes (Aguzzi *et al.*, 2008).

Des travaux récents décrivent la PrP^c comme un récepteur du peptide β -amyloïde au niveau synaptique, interaction qui favorise l'inhibition de la plasticité des synapses. La PrP^c serait ainsi un médiateur du dysfonctionnement synaptique lié à la maladie d'Alzheimer (Lauren *et al.*, 2009).

Au cours de la pathogénèse d'une ESST, les changements les plus précoces se traduisent par une perte synaptique et par le dépôt de PrP^{Sc} dans les terminaisons synaptiques. Ces troubles sont une caractéristique constante des maladies à prion, et ce, indépendamment du fait qu'il y ait spongiose, perte neuronale ou gliose importante (Clinton *et al.*, 1993). Ceci suggère une fonction importante de la PrP^c au sein des synapses. Des analyses électrophysiologiques réalisées sur des neurones issus de l'hippocampe de souris *Prnp*^{-/-} renforcent les précédents constats. Dans ces souris, un certain nombre de phénomènes neuronaux sont soit altérés, soit absents. C'est le cas de la transmission synaptique glutamatergique (Carleton *et al.*, 2001), de l'inhibition liée au récepteur du GABA, de la potentialisation à long terme, et de la post-hyperpolarisation. Cette dernière est abolie aussi bien dans des souris dans lesquelles le gène *Prnp* est éteint par « knocking-out » conditionnel que dans des souris *Prnp*^{-/-}. Cette perte de fonction semble donc liée à l'absence de la PrP^c et non pas à un déficit développemental (Mallucci *et al.*, 2002). La faible post-hyperpolarisation est engendrée par une diminution des canaux potassiques dépendants du calcium, qui modulent les activités synaptique et neuronale (Sah 1996 ; Sah et Davies 2000). Une réduction de ces canaux a également été observée dans les cellules de Purkinje, chez des souris *Prnp*^{-/-} (Herms *et al.*, 2001). Ce constat implique un lien étroit entre la PrP^c et la régulation de ces canaux, probablement au niveau de la transduction de signaux.

Face à la multitude de fonctions attribuées à la PrP^c, il est encore difficile à l'heure actuelle de se faire une idée précise quant à son rôle physiologique. Cependant, au vu de la diversité des tissus et des cellules dans lesquels elle est exprimée, il est concevable que cette protéine puisse exercer des fonctions différentes, en fonction des multiples partenaires avec lesquels elle peut interagir.

III- De PrP^c à PrP^{Sc}: un changement de conformation associé aux ESST

Tous les cas d'ESST se caractérisent par la présence de la PrP^{Sc}, l'isoforme pathologique de la PrP^c.

1. La conformation de la protéine prion : une seule séquence primaire, deux conformères

Codées par un seul et même gène, la PrP^c et la PrP^{Sc} partagent la même structure primaire, et subissent les mêmes modifications post-traductionnelles que sont la *N*-glycosylation, la formation d'un pont disulfure, et l'ancrage à la membrane via le GPI (Stahl et Prusiner 1991). Cependant ces deux isoformes diffèrent fortement par leur structure secondaire et tertiaire : alors que la PrP^c est majoritairement constituée d'hélices α , la PrP^{Sc} est quant à elle enrichie en feuillets β (tableau 4). La communauté scientifique considère ce changement de conformation comme un élément essentiel, sinon clef, de la pathogénèse des ESST. La transconformation de la protéine prion modifie ses propriétés physico-chimiques mais aussi son degré de résistance/sensibilité aux protéases. Ainsi, si la PrP^c est soluble dans les détergents non ioniques, sensible à la dégradation par la protéinase K (PK) et monomérique, la PrP^{Sc} est pour sa part insoluble dans ces mêmes détergents, résistante partiellement à la PK et son insolubilité provoque son agrégation sous forme de fibrilles amyloïdes (Prusiner 1998 ; Silveira *et al.*, 2005). Le fait que la protéine prion « scrapie » soit insoluble a fortement entravé la résolution de sa structure puisque celle-ci ne peut être cristallisée, contrairement à la PrP^c. Les données concernant son contenu en hélices α et feuillets β ont été obtenues par dichroïsme circulaire et en spectrométrie infrarouge (Caughey *et al.*, 1991 ; Pan *et al.*, 1993 ; Safar *et al.*, 1993).

Tableau 4 : Comparaison des caractéristiques des protéines PrP^c et PrP^{Sc}:

	PrP ^c	PrP ^{Sc}
Pourcentage d'hélices α	42 %	30 %
Pourcentage de feuillets β	3 %	42 %
Sensibilité à la PK	Sensible	Partiellement résistante
Solubilité dans les détergents non ioniques	Oui	Non
Structure	Monomérique	Agrégats
Durée de demi-vie	3 à 6 heures	Plus de 24 heures

2. Mutations et maladies à prion

Suite au séquençage des génomes humain, ovin, bovin et murin, il a été mis en évidence que la séquence nucléotidique de la protéine prion pouvait varier ponctuellement par l'intermédiaire de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) ou de phénomènes de délétion/insertion également appelés « indel » (Brunelle *et al.*, 2008 ; Geldermann *et al.*, 2003 ; King *et al.*, 2003 ; Sander *et al.*, 2005). Ces mutations ponctuelles vont affecter à la fois les régions régulatrices que sont les régions promotrices et les régions introniques, mais également la séquence codante de *Prnp*, le plus souvent dans des régions codant des résidus qui affectent la structure secondaire de la protéine (Martin *et al.*, 2009). Depuis la découverte de ces mutations, la communauté scientifique s'efforce d'établir une corrélation avec la susceptibilité des individus à développer une maladie à prion.

i. Mutations au sein des régions régulatrices

Des mutations dans les régions 5' et 3' non traduites (UTR) affectent la stabilité des transcrits du gène *Prnp* et modulent la quantité de PrP^c dans les tissus (Sander *et al.*, 2005). Chez le bovin, deux polymorphismes dans les régions non codantes ont été décrits : le premier correspond à une délétion de 23 pb à l'intérieur de la région promotrice qui provoque la disparition d'un site de liaison pour la protéine RP58 (repressor protein) (Juling *et al.*, 2006). Le second se traduit par une délétion de 12 pb au sein de l'intron 1, ce qui supprime un site de liaison pour un facteur de transcription : SP1 (Sander *et al.*, 2004).

Des études effectuées avec des souris transgéniques qui surexpriment la protéine prion montrent que la période d'incubation est inversement proportionnelle à la quantité de PrP^c chez les individus (Manson *et al.*, 1994 ; Scott *et al.*, 1989 ; Westaway *et al.*, 1991). Il est donc très probable que ces SNP et « indel » décrits chez le bovin mais aussi chez l'homme (King *et al.*, 2003) affectent la survenue de cas sporadiques d'encéphalopathie spongiforme transmissible (Brunelle *et al.*, 2008 ; Sander *et al.*, 2005).

ii. Mutations au sein de la séquence codante de *Prnp*

Bien que le gène *Prnp* soit très conservé chez les mammifères, des variations au sein de sa séquence codante ont été mises en évidence chez l'homme et le mouton.

Chez l'homme, 55 mutations ont été identifiées et décrites comme responsables de cas de MCJ héréditaires. Parmi celles-ci, 24 correspondent à des mutations non-sens qui aboutissent parfois à une protéine prion tronquée, transmembranaire et pathologique (figure 7, page 24) (Hegde *et al.*, 1998).

Les autres mutations correspondent à des insertions jusqu'à 24 nucléotides entraînant la multiplication des séquences « octarepeat » (OR), normalement au nombre de quatre chez l'homme (Kong *et al.*, 2004). Chez des patients atteints de MCJ ou de GSS, ce type de mutation est fréquemment rencontré, augmentant le nombre d'OR (entre 10 et 15) (Goldfarb *et al.*, 1991). Ces mutations pourraient entraîner une déstabilisation structurale de la PrP^c et favoriser sa transconformation spontanée en PrP^{Sc} (Caughey *et al.*, 2006). Cependant, les travaux de Liemann et Glockshuber (1999) visent à confirmer que des mutations ponctuelles à l'origine d'une substitution d'acides aminés au sein de la séquence de la protéine prion peuvent affecter sa stabilité et montre qu'aucune de ces substitutions n'est suffisante pour entraîner spontanément une conformation « PrP^{Sc}-like ». Le mécanisme de conversion de la PrP lié à l'augmentation du nombre de séquences OR ne résulterait donc pas d'un simple changement de conformation (Leliveld *et al.*, 2006). De plus, des souris transgéniques exprimant une protéine prion bovine avec 10 séquences d'OR (soit 4 OR surnuméraires), développent des symptômes neurodégénératifs tels qu'une ataxie, associés à des changements neuropathologiques comme une vacuolisation des neurones au niveau de l'hippocampe, ou bien une forte diminution de la quantité de cellules granuleuses dans le cervelet (Castilla *et al.*, 2005a). Au niveau moléculaire, ces observations s'accompagnent d'un changement de conformation de la PrP qui devient résistante à la PK, mais demeure non infectieuse. Par contre, ces souris sont particulièrement sensibles à une infection par un agent de l'ESB.

La région OR de la PrP interagit avec les ions cuivre Cu²⁺ (Whittal *et al.*, 2000). Quand celui-ci est lié à la PrP, celle-ci peut naturellement recruter et lier d'autres protéines PrP^c (Leliveld *et al.*, 2008). Par contre, quand le nombre de séquences OR augmente et en absence d'ions cupriques, la PrP devient capable de se lier à la PrP^{Sc} (Leliveld *et al.*, 2006). Ainsi, un modèle basé sur un changement conformationnel de la région OR quand celle-ci est liée au cuivre a été proposé (figure 13). La PrP possédant des extra-OR pourrait se lier à une protéine prion dont le repliement intermédiaire lui confèrerait des caractéristiques proches de celles de la PrP^{Sc}, mais en étant instable. Cette interaction la stabiliserait et l'empêcherait de subir une dégradation par le protéasome (Leliveld *et al.*, 2008). Cependant, si ce modèle tente d'expliquer les interactions entre les différentes formes de PrP, et leur moyen d'influencer la conversion, il ne rend pas compte d'un éventuel changement conformationnel lié à un nombre supérieur de régions OR. Ici, le changement conformationnel est la conséquence de la liaison du cuivre au domaine OR (Viles *et al.*, 1999).

L'augmentation du nombre de régions OR provoque donc des changements profonds au niveau de la capacité de liaison de la PrP, et fait apparaître trois caractéristiques nouvelles

que sont la perte partielle de la réversibilité de l'interaction PrP-PrP cuivre-dépendante, le gain d'un site de liaison à la PrP^{Sc}, et une capacité graduelle de multimérisation (Leliveld *et al.*, 2006).

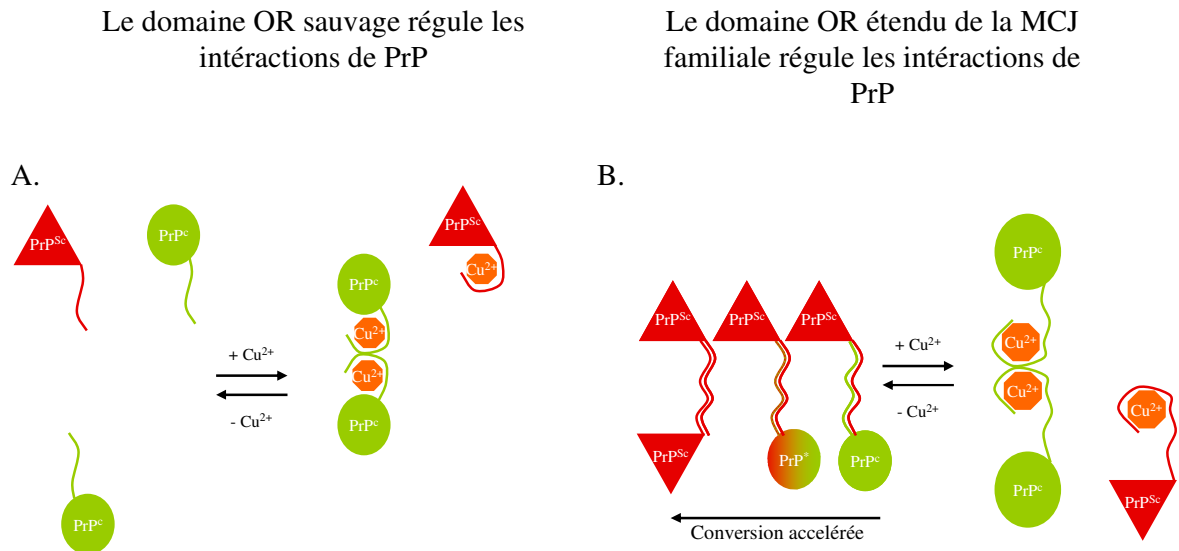


Figure 13 : Représentation schématisée et modélisée de l'effet des extra-OR sur la conversion de PrPc en PrPSc dans la MCJ familiale.

La PrP^c est représentée en cercles verts, la PrP^{Sc} en triangles rouges. La région OR libre est représentée par une ligne lâche, la région OR liée au cuivre (octogones orange) par une ligne circularisée. Un groupe multimérique de protéines PrP^c possédant des séquences OR surnuméraires pourrait se lier à un conformère proche de PrP^{Sc} et à courte demi-vie apparait spontanément. Ce qui servirait ensuite de matrice pour la conversion. D'après Leliveld *et al.* (2006).

3. Polymorphismes et leur implication sur la susceptibilité à développer une maladie à prion

Chez le mouton, différents génotypes ont été observés, et au moins 14 SNP ont été décrits dans la région codante (Heaton *et al.*, 2003). Ces variations de la séquence nucléotidique vont affecter la traduction de trois codons aux positions 136, 154 et 171 en numérotation ovine. En position 136, les acides aminés rencontrés sont soit la valine (V) soit l'alanine (A), en position 154, l'arginine (R) ou l'histidine (H), et en position 171, l'arginine (R), la glutamine (Q) ou l'histidine (H). Bien que douze combinaisons soient possibles, seuls cinq allèles sont retrouvés de façon prédominante : V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ ou plus simplement VRQ, ARQ, ARR, AHQ, et ARH (Hunter 2003). Des individus homozygotes ou hétérozygotes pour chacun des haplotypes sont retrouvés dans les populations. L'occurrence de ces différents haplotypes affecte la durée d'incubation de la maladie, mais aussi la susceptibilité à développer la tremblante (Hunter *et al.*, 1989). Généralement, l'allèle VRQ est corrélé à un

risque élevé de développer la tremblante spontanément. Au contraire, les allèles ARR et de façon moindre AHQ sont considérés comme conférant une certaine résistance. Les allèles ARQ et ARH ont une situation intermédiaire qui dépend de la souche infectieuse et de la race de mouton (Elsen *et al.*, 1999). Les différents génotypes, ainsi que les périodes d'incubation moyennes et le degré de résistance sont récapitulés dans le tableau 5.

En 2001, les autorités anglaises ont mis sur pied le « National Scrapie Plan » afin d'assister les éleveurs et de les aider à réduire la fréquence des génotypes susceptibles d'engendrer des tremblantes spontanées. En effet, elles craignaient que l'ESB puisse contaminer une grande partie du cheptel anglais, créant un danger pour la chaîne alimentaire de l'homme (Hunter 2007).

Quelle que soit l'espèce considérée, il est intéressant de noter que les mutations au sein du gène *Prnp* affectant la résistance ou la sensibilité aux ESST sont localisées dans des régions qui régissent la structure secondaire de la protéine : au sein des hélices α ou des feuillets β , ou alors dans des régions liées à ces structures. De plus un certain nombre de SNP n'engendrent aucune modification au niveau de la séquence protéique. D'un point de vue évolutif, il semble normal qu'une telle protéine très conservée ne soit sujette qu'à des variations limitées de sa conformation. Ainsi, les acides aminés les plus protecteurs de la structure associés à des polymorphismes correspondent à l'état ancestral. Chez le mouton, l'haplotype ARQ correspond à la forme ancestrale chez les mammifères (Martin *et al.*, 2009).

L'identification de polymorphismes associés au développement des ESST est une étape importante dans la compréhension du mécanisme de pathogénèse. Mais, même si le changement de conformation de la PrP est un événement clef dans le développement de la maladie, l'étude de la protéine proprement dite, de ses fonctions mais aussi des interactions qu'elle peut avoir avec des cofacteurs va permettre de mieux comprendre le processus de développement des ESST.

Tableau 5 : Association des différents polymorphismes retrouvés au niveau de la région codante du gène Prnp ovin avec la durée d'incubation de moutons de race Cheviot après inoculation sous-cutanée de la souche SSBP/1 (Dickinson 1976). Ce tableau classifie les génotypes en fonction du National Scrapie Plan (NSP) élaboré au Royaume-Uni pour tenter de faire disparaître les cas de tremblante dans les élevages. D'après Hunter (2007).

Génotype de PrP	Temps d'incubation en jours	Résistance en jours	Degré de résistance établi par le NSP
VRQ/VRQ	180 ± 20	—	NSP 5 : Moutons hautement susceptibles à la tremblante. Ne doivent pas être utilisés pour l'élevage
VRQ/ARQ	270 ± 80	—	
VRQ/ARR	350 ± 60	—	NSP 4 : Moutons très susceptibles à la tremblante. Ne doivent être utilisés pour l'élevage que dans un contexte très contrôlé
ARQ/ARQ	—	>980	NSP 3 : Légère résistance : une attention particulière de l'éleveur est requise
ARQ/ARR	—	>820	NSP 2 : Moutons génétiquement résistants. Cependant une surveillance doit être observée
ARR/ARR	—	>1150	NSP 1 : Moutons les plus résistants

4. L'hypothèse de la protéine seule

La conversion de la protéine prion PrP^c en PrP^{Sc} est considérée comme l'élément clef de la pathogénèse des ESST. Un certain nombre d'hypothèses ont été émises afin d'expliquer comment se produit la transconformation, mais surtout quels sont les évènements déclencheurs, et s'il existe des cofacteurs qui favorisent ce changement de conformation de la PrP. Ainsi de nombreuses hypothèses ont vu le jour, les trois plus importantes étant l'hypothèse virale, l'hypothèse virino et l'hypothèse de la protéine seule.

L'hypothèse virale est la plus ancienne. Elle repose sur les caractéristiques de l'agent infectieux que sont sa transmissibilité, le temps d'incubation, et sa taille. Au départ, un virus

lent a été recherché, mais les expériences d'Alper *et al.*, en 1967 mettent en évidence que l'agent responsable ne peut être un acide nucléique, puisque l'infectiosité est conservée après traitement aux rayonnements U.V.

L'hypothèse virino suppose la présence d'une structure hybride contenant un petit acide nucléique infectieux mais ne codant aucune protéine virale, protégé par une coque protéique synthétisée par l'hôte (Dickinson et Outram 1988). Bien que mise à mal par les travaux d'Alper, l'hypothèse virino est cohérente avec l'absence de réaction immunitaire.

Toutefois aujourd'hui, ces hypothèses, si elles ne sont pas totalement exclues, ont perdu beaucoup de crédit face à l'émergence de l'hypothèse de la protéine seule. Cette hypothèse a été avancée pour la première fois en 1966 quand Alper a montré que le spectre de résistance aux rayonnements de l'agent pathogène était très proche de celui des protéines. Dès 1967, Griffith propose que des protéines puissent s'auto-répliquer et être infectieuses. Mais ces théories contradictoires avec les dogmes classiques de la biologie sont ignorées jusqu'en 1982, quand les travaux de Prusiner mettent en évidence que l'agent infectieux est bel et bien protéique. Ses travaux ont ouvert la voie à l'élaboration d'un concept nouveau selon lequel une protéine seule contient une information de structure qui peut être transmise et imposée à d'autres protéines. Ce concept novateur a valu l'attribution du prix Nobel à Stanley Prusiner en 1997. Depuis, de plus en plus de travaux étayent cette hypothèse.

Les travaux de Bueler *et al.* (1993) mettent en évidence que des souris qui n'expriment plus la protéine prion cellulaire (*Prnp*^{-/-}) sont parfaitement résistantes à la maladie. La présence de la PrP^c endogène serait donc absolument nécessaire. *In vitro*, une méthode non cellulaire d'amplification cyclique de la PrP^{res} a été mise au point par Kocisko *et al.* (1994) et améliorée par Saa *et al.* (2005). Cette technique, nommée PMCA pour « Protein Misfolding Cyclic Amplification » (voir aussi figure 17, page 56), permet d'amplifier la PrP^{res} à partir d'un extrait de cerveau atteint d'ESST dilué de manière à ce que la PrP^{res} soit indétectable dans l'échantillon de départ. La matrice PrP^c est apportée par un homogénat de cerveau sain. Cette technique permet d'amplifier considérablement la quantité de PrP^{res} dans l'échantillon (Saborio *et al.*, 2001), mais elle ne peut pas se passer de la présence des extraits de cerveaux sains et pathologiques, ce qui n'exclut pas la possibilité que des cofacteurs présents dans le cerveau tels que des molécules d'ARN pourraient être amplifiés eux aussi et jouer un rôle dans la transconformation de la protéine prion (Zou et Gambetti 2005). Les travaux de Legname *et al.* (2004) démontrent quant à eux qu'un fragment recombinant de la PrP murine synthétique peut être enrichi *in vitro* en feuillets β et induire *in vivo* une ESST chez des souris transgéniques qui surexpriment 16 fois la PrP tronquée inoculée (Legname *et al.*, 2004). Bien

que ce travail soit proche de valider l'hypothèse de la protéine seule, des réserves ont cependant été exprimées. En effet, la maladie n'est développée que chez ces souris transgéniques. Certains ont évoqué le fait que la PrP générée *in vitro* pourrait ne faire que précipiter un événement programmé génétiquement par la surexpression du peptide (Zou et Gambetti 2005). Pour la communauté scientifique, l'hypothèse de la protéine seule ne sera véritablement et définitivement prouvée que quand une ESST aura été provoquée chez un hôte naturel par une protéine prion pathologique produite *in vitro* (Zou et Gambetti 2005).

5. Les sites de conversion

L'hypothèse de la protéine seule suggère que l'agent infectieux, la PrP^{Sc} exogène, est au contact de la protéine prion cellulaire endogène et lui impose sa conformation. La conversion de la protéine prion endogène ne peut donc se produire que dans un site de rencontre entre la PrP^{Sc} et la PrP^c (Moudjou *et al.*, 2001). Au cours du trafic de la protéine prion, un certain nombre de sites ont été identifiés comme des lieux potentiels de transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc} (figure 14). Parmi eux, il semble que les rafts lipidiques aient un rôle prépondérant. En effet, la PrP^c et la PrP^{Sc} sont présentes de façon simultanée au sein de ces micro-domaines membranaires (Naslavsky *et al.*, 1997). Les travaux de (Baron *et al.*, 2002) suggèrent que la PrP^c ne peut être transconformée en PrP^{Sc} que si cette dernière est elle-aussi ancrée dans une membrane contiguë. De plus, si l'ancre GPI est remplacée par une séquence oligopeptidique de ciblage vers les puits recouverts de clathrine, la transconformation n'a pas lieu (Kaneko *et al.*, 1997). Ces résultats renforcent l'idée que la transconformation aurait lieu au sein des rafts, mais apportent également des éléments en faveur du fait que le phénomène ne se produit pas au niveau des puits recouverts de clathrine. Enfin, des expériences de réduction de la quantité de cholestérol présent dans les rafts, par l'intermédiaire d'une substance chimique, la lovastatine, provoquent l'inhibition de la formation de la PrP^{Sc}. Ceci suggère que la composition particulière des rafts et en particulier leur caractère riche en cholestérol est un pré-requis pour la transconformation (Taraboulos *et al.*, 1995). Les travaux de Sarnataro *et al.* (2002) ont permis de déterminer que la déplétion en cholestérol au sein des rafts affecte directement le processus de conversion, et non pas la localisation membranaire de la PrP. Cependant, les rafts pourraient également faciliter la conversion de PrP^c en PrP^{Sc} du fait de la forte densité de la PrP, ce qui augmente la probabilité de rencontre entre une forme cellulaire et une forme pathologique et crée un environnement favorable à la transconformation (Baron *et al.*, 2002 ; Sarnataro *et al.*, 2002). Enfin, les rafts

pourraient stabiliser la PrP^c dans une conformation spécifique encline à subir une conversion (Campana *et al.*, 2005).

Cependant, bien que le rôle des rafts ait été largement étudié, ils ne semblent pas être les seuls sites dans lesquels la transconformation peut se produire. En effet, au cours du trafic intracellulaire de la PrP^c, il existe des situations dans lesquelles la PrP^c et la PrP^{Sc} peuvent être voisines et interagir. C'est le cas en particulier au cours de l'endocytose de la PrP. Au cours de ce phénomène, la protéine prion est enfermée dans des vésicules d'endocytose, au sein desquelles il peut y avoir une forte promiscuité entre la forme pathologique et la forme cellulaire de la PrP. Le compartiment endolysosomal constitue donc un site potentiel de transconformation (Borchelt *et al.*, 1992). Il est également possible qu'après son internalisation, la PrP^{Sc} soit soumise à un transport rétrograde vers l'appareil de Golgi et / ou le réticulum endoplasmique ce qui perturberait la synthèse *de novo* de la PrP en provoquant la formation de la PrP^{Sc} directement à partir de son précurseur : la PrP^c (Campana *et al.*, 2005). En effet, la surexpression de protéines comme la petite GTPase Rab6 qui stimule le transport rétrograde et provoque l'accumulation de la PrP^c dans le RE, entraîne une accumulation de la PrP^{Sc} dans les cellules infectées (Beranger *et al.*, 2002). Ceci suggère que le RE pourrait être également un lieu où se produit la transconformation.

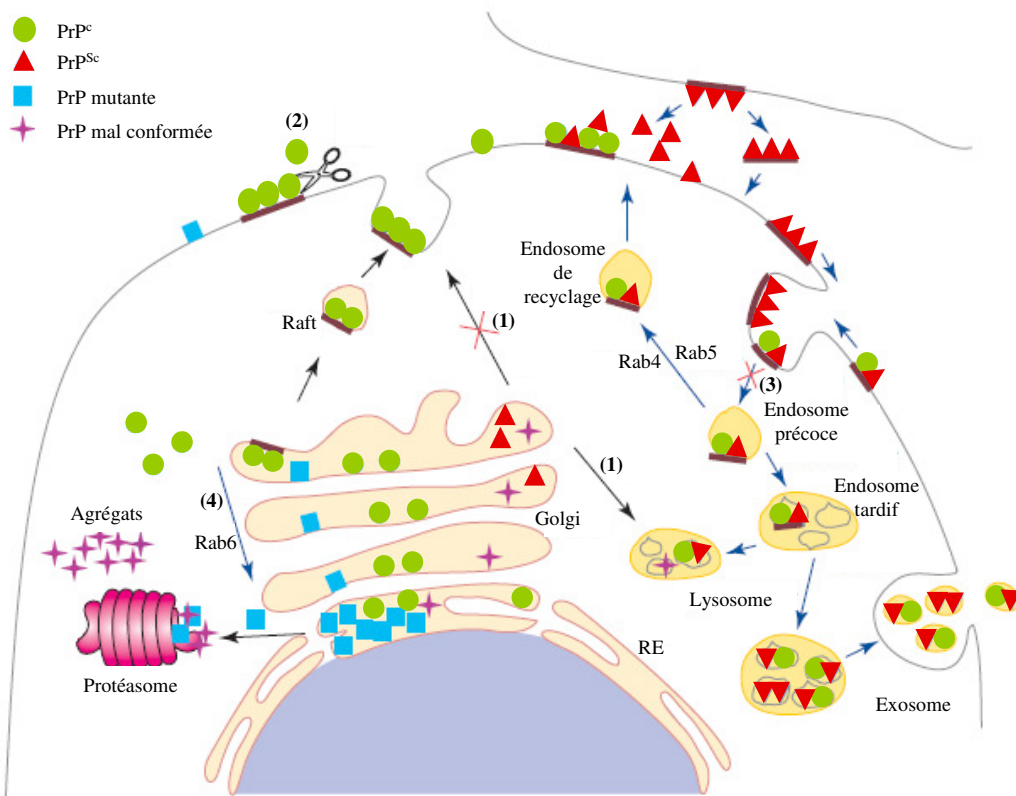


Figure 14 : Les possibles voies de formations de PrP^{Sc}. La PrP^c est synthétisée dans le RE. Des formes anormales sont produites (PrP mutante) mais sont partiellement dégradées par le protéasome. Dans les neurones, PrP^c a été observée dans le cytosol, de même qu'ont été mis en évidence des agrégats de PrP mal conformée. Après le contrôle qualité opéré dans le RE, PrP^c est envoyée vers la membrane où elle s'associe aux rafts. Le blocage (1) du transport de la PrP^c vers la membrane plasmique et sa redirection vers les lysosomes en vue d'une dégradation et la libération de la PrP à partir de la surface cellulaire (2) empêchent la formation de la PrP^{Sc}. Une diminution de l'internalisation de la PrP^c (3) réduit également la formation de la PrP^{Sc}. Les deux isoformes PrP^c et PrP^{Sc} sont observées dans les endosomes précoces Rab5-positifs, passent au travers des endosomes tardifs pour être finalement dégradées totalement (PrP^c) ou partiellement (PrP^{Sc}) dans les lysosomes. De plus une partie de la PrP^c est recyclée vers la membrane plasmique par une voie dépendante de la protéine Rab-4, ce qui explique qu'à la fois la PrP^c et la PrP^{Sc} soient retrouvées associées aux membranes issues des exosomes dans le milieu extracellulaire de cellules infectées. Enfin, le RE pourrait être un lieu de conversion en amplifiant la formation de la PrP^{Sc} après transport rétrograde Rab-6 dépendant de celle-ci (4). D'après Campana *et al.* (2005).

6. Trois modèles de conversion

L'hypothèse de la protéine seule suggère que l'apparition de la pathologie est liée au seul changement de conformation de la protéine prion. Le phénomène par lequel il se produit est encore inconnu, mais plusieurs hypothèses ont été émises.

A l'heure actuelle, trois modèles prédominent. Il s'agit du modèle de conversion dirigée par une matrice ou modèle autocatalytique (figure 15 A), du modèle de nucléation-polymérisation (figure 15 B) et du modèle de nucléation assistée (figure 15C).

Dans le premier cas, il existerait une barrière énergétique trop importante pour que la PrP^c se transconforme naturellement en PrP^{Sc}. C'est le contact d'une protéine prion exogène mal conformée, la PrP^{Sc}, qui provoquerait la transconformation de la PrP^c endogène : la PrP^{Sc} contiendrait une information de conversion qu'elle imposerait à la PrP^c. L'homodimère ainsi formé peut alors soit se dissocier en unités monomériques aptes à provoquer la transconformation d'autres molécules de PrP^c, soit s'agréger et former des fibrilles amyloïdes (Aguzzi et Polymenidou 2004 ; Griffith 1967 ; Prusiner 1991 ; Zou et Gambetti 2005). Certains auteurs suggèrent que dans ce modèle, une protéine X pourrait intervenir et faciliter la conversion de la PrP^c (Zou et Gambetti 2005).

Dans le second modèle, il existerait un équilibre thermodynamique entre la PrP^c et la PrP^{Sc}. Cet équilibre serait en faveur de la PrP^c mais permettrait la coexistence de faibles quantités de PrP^{Sc} avec la protéine cellulaire. La PrP^{Sc} ne pourrait alors pas représenter seule l'agent infectieux, car elle serait ubiquitaire. Selon l'hypothèse de nucléation émise par Jarret et Lansbury (1993), l'agent infectieux ne serait pas une protéine monomérique, mais un agrégat de PrP^{Sc} hautement ordonné. Cet état d'agrégat serait une propriété intrinsèque de l'infectiosité : la PrP^{Sc} sous forme monomérique, instable, ne serait pas infectieuse mais serait encline à s'incorporer dans un noyau amyloïde naissant, ce qui la stabiliserait (figure 14 B) (Aguzzi et Polymenidou 2004 ; Jarrett et Lansbury 1993 ; Zou et Gambetti 2005). Cette hypothèse est confortée par les travaux de Silveira *et al* (2005) qui mettent en évidence que de petits oligomères composés de moins de 6 unités de protéines PrP^{Sc} ne sont pas infectieux chez le hamster syrien. Les particules qui possèdent l'infectiosité la plus importante sont composées de 14 à 18 unités de PrP^{Sc} (Silveira *et al.*, 2005).

Un troisième modèle de conversion a récemment été proposé : il repose sur la formation d'un état structural intermédiaire de la PrP, nommé PrP*, par interaction de la PrP^c avec un facteur de conversion endogène. Cette conformation intermédiaire permettrait à PrP^c de subir des modifications de structures qui conduisent à la formation de PrP^{Sc}. Il s'agit du modèle de nucléation assistée (Soto 2003).

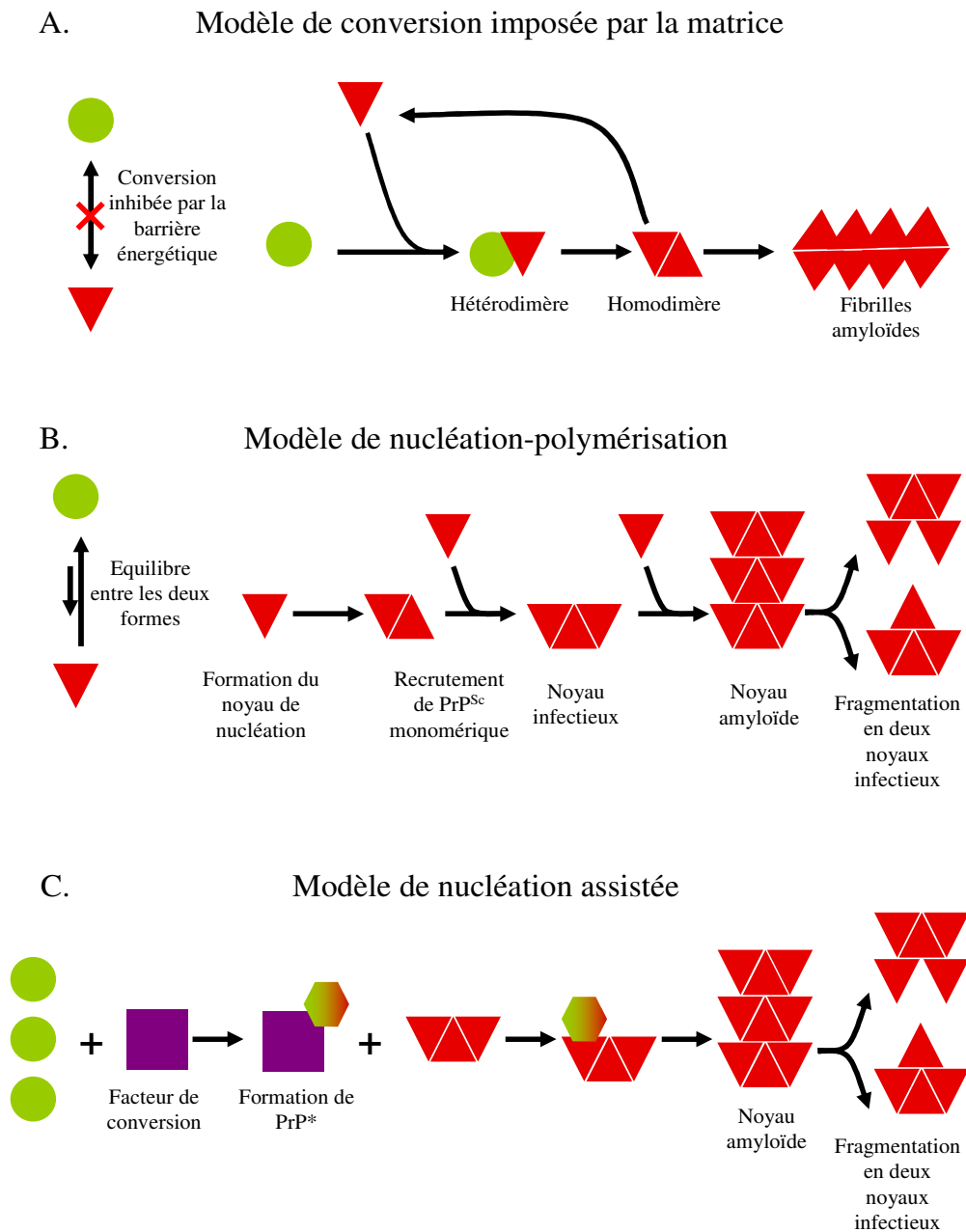


Figure 15 : Modèles hypothétiques de conversion de PrP^c en PrP^{Sc}.

(A) Le modèle de conversion imposée par la matrice suggère une interaction entre PrP^{Sc} exogène et PrP^c endogène. PrP^{Sc} impose alors son repliement à PrP^c. Naturellement, une barrière énergétique élevée empêche la conversion de PrP^c en PrP^{Sc}. (B) Le modèle de nucléation-polymérisation propose que PrP^c et PrP^{Sc} sont dans un équilibre thermodynamique réversible. Le recrutement de nouvelles molécules de PrP^{Sc} n'a lieu que si au préalable un noyau de nucléation s'est formé. La formation de ce noyau est un processus lent, comparativement au recrutement de monomères de PrP^{Sc} qui viennent enrichir le noyau initial pour donner naissance à un noyau infectieux. Ce dernier devient amyloïde puis se fragmente en de nombreux noyaux infectieux de petite taille. (C) Le modèle de nucléation assistée repose sur le fait que PrP^{Sc} n'existe pas sous forme monomérique : elle requiert deux remaniements structuraux consécutifs pour former un oligomère de PrP^{Sc}. Ce modèle repose sur la formation précoce d'une structure intermédiaire, nommée PrP*, formation nécessitant un facteur de conversion endogène. D'après Abid et Soto (2006) ; Aguzzi et Polymenidou (2004).

7. La propagation de l'agent infectieux

Dans la plupart des cas d'ESB, de Kuru ou de vMCJ, la contamination des individus a lieu par ingestion de tissus contaminés. L'agent infectieux franchit l'épithélium intestinal puis s'accumule dans les plaques de Peyer et l'appendice, gagne la rate, les ganglions lymphatiques, et les amygdales, avant d'envahir le système nerveux.

a. Le passage de la barrière intestinale

Après ingestion, l'agent infectieux doit franchir l'épithélium intestinal avant de pouvoir s'accumuler dans les tissus lymphoïdes (figure 16). La nature même de la surface luminale de l'intestin limite les contacts possibles entre PrP^{Sc} et le milieu intérieur. En effet, les tissus intestinaux sont recouverts d'une fine couche de cellules épithéliales, liées entre elles par des jonctions serrées.

Au sein de ces cellules épithéliales, se trouvent des cellules M spécialisées dans le transport transépithélial de macromolécules. *In vitro*, ces cellules réalisent la transcytose de la PrP^{Sc} (Heppner *et al.*, 2001), mais leur implication *in vivo* reste à clarifier. Le transport de la PrP^{Sc} peut également être indépendant de ces cellules M. En effet, des formes partiellement digérées de la PrP^{Sc} correspondant à la PrP²⁷⁻³⁰ peuvent former des complexes avec des protéines comme la ferritine, et ce complexe peut être endocyté par les cellules épithéliales elles-mêmes (Mishra *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que la ferritine est abondamment présente dans la viande et absorbée à partir de la nourriture par l'intestin, ce qui étaye l'hypothèse selon laquelle ce mécanisme aurait lieu. Enfin, les cellules dendritiques peuvent ouvrir les jonctions serrées qui assurent la forte cohésion entre les cellules épithéliales et insérer leurs dendrites afin de capturer des pathogènes comme les bactéries ou la PrP^{Sc}. Cette caractéristique fait des cellules dendritiques un candidat sérieux pour le transport de la PrP^{Sc} vers les tissus lymphoïdes (Mabbott et MacPherson 2006 ; Rescigno *et al.*, 2001).

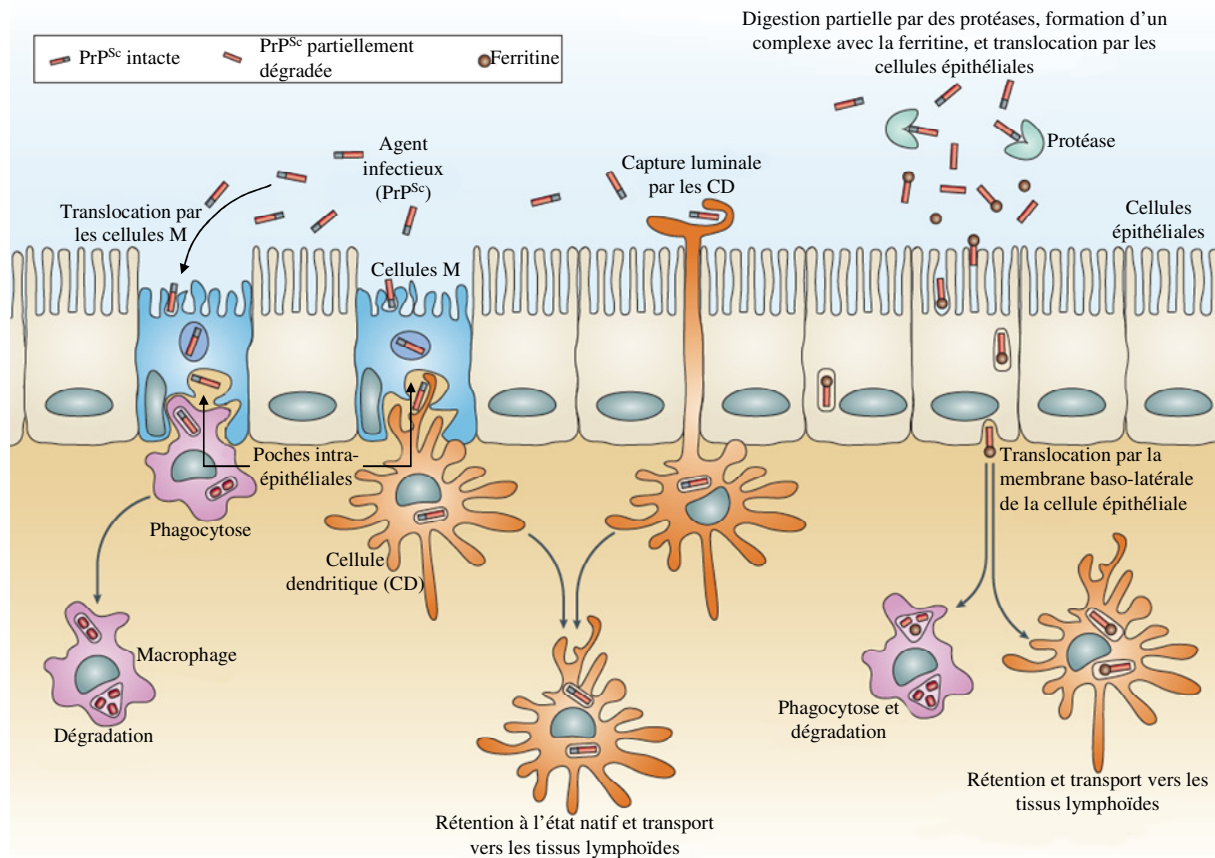


Figure 16 : Mécanismes potentiels de translocation de l'agent responsable des ESST : la PrP^{Sc}.

L'épithélium intestinal est protégé par une simple couche de cellules épithéliales liées par des jonctions serrées. Au sein de ces cellules, les cellules M sont spécialisées dans le transport de macromolécules et de particules. Elles pourraient permettre à la PrP^{Sc} de franchir l'épithélium intestinal. Mais la PrP^{Sc} pourrait aussi franchir cette barrière indépendamment des cellules M : la PrP^{Sc} partiellement digérée par des protéases pourrait se complexer à la ferritine et être transcytées par les cellules épithéliales elles-mêmes. Enfin, les cellules dendritiques (CD) peuvent insérer leurs dendrites entre deux cellules épithéliales, en ouvrant les jonctions serrées, et capturer directement la PrP^{Sc} dans la lumière intestinale. Une fois cette barrière franchie, la PrP^{Sc} est internalisée dans des CD migratoires ou dans des macrophages. D'après Mabbott et MacPherson (2006).

b. Invasion des tissus lymphoïdes

Après le passage de la barrière intestinale (cellules M, transcytose, cellules dendritiques), la PrP^{Sc} est retrouvée dans les tissus lymphoïdes. Elle s'accumule au niveau des centres germinatifs des cellules B, dans les cellules folliculaires dendritiques (FDC), mais aussi dans les macrophages (Kitamoto *et al.*, 1991).

Les cellules FDC expriment de fortes quantités de la protéine prion endogène (Brown *et al.*, 1999), ce qui augmente la probabilité de conversion de PrP^c en PrP^{Sc} avec une durée d'incubation courte (Manson *et al.*, 1994). Dans ces cellules, la PrP^{Sc} s'accumule dans le plasmalemme et dans l'espace extracellulaire autour des dendrites (Jeffrey *et al.*, 2000). Cet événement est crucial pour l'infection, puisque dans des organismes dépourvus de FDC, la neuroinvasion est retardée, et la susceptibilité à développer la maladie est réduite (Prinz *et al.*,

2002). De plus, ces cellules sont maintenues dans leur état différencié par des stimuli cytokiniques (Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) ou la lymphotoxine membranaire $\alpha_1\beta_2$ (LT- $\alpha_1\beta_2$)) produits par les cellules B, qui contrairement aux FDC, expriment peu la PrP^c (Gommerman *et al.*, 2002 ; Mackay et Browning 1998). Une absence de ces cytokines, induites soit par une déplétion en cellules B (Klein *et al.*, 1997), soit par l'utilisation de drogues qui inhibent temporairement les voies de signalisation qui leur sont associées (Gommerman *et al.*, 2002), empêche la PrP^{Sc} de s'accumuler dans les tissus lymphoïdes. Même si leur implication dans l'infection des tissus périphériques ne fait plus de doute, le rôle précis des FDC doit encore être élucidé. En ce qui concerne les cellules B, leur faible expression de PrP^c suggère qu'elles ne seraient pas impliquées dans le transport de PrP^{Sc} (Huang *et al.*, 2002 ; Mabbott et MacPherson 2006)

Cependant, d'autres types cellulaires comme les cellules dendritiques (Huang *et al.*, 2002 ; Mohan *et al.*, 2005) ou les macrophages (Beekes et McBride 2000 ; Herrmann *et al.*, 2003) ont également un rôle dans la propagation de l'agent infectieux au sein des tissus lymphoïdes.

Parmi ceux-ci, les plaques de Peyer ont un rôle majeur dans la propagation des ESST infectieuses puisque leur absence retarde la neuroinvasion chez des souris infectées par voie orale (Fraser et Dickinson 1978). De même des expériences de splénectomie ont mis en évidence une prolongation significative de la durée de vie des souris infectées (Fraser et Dickinson 1970), la rate aurait donc un rôle important dans la propagation de l'agent infectieux. Dans ces deux organes transitent les cellules impliquées dans le transport de l'agent infectieux : les FDC, les cellules dendritiques, ou les macrophages. Ce sont les FDC qui semblent avoir un rôle prépondérant dans l'accumulation de la PrP^{Sc} dans la rate. C'est pourquoi la puissance de la neuroinvasion est fortement liée à l'importance de l'invasion des cellules FDC par l'agent infectieux (Aguzzi et Heikenwalder 2006 ; Mabbott et MacPherson 2006).

Pourtant, la réplication et l'accumulation splénique de la PrP^{Sc} ne sont pas des caractéristiques communes à toutes les ESST : il existe certaines souches de prion qui ne sont jamais détectées dans cet organe, mais qui s'accumulent *in fine* dans le système nerveux. C'est le cas chez des moutons qui portent le génotype VRQ/ARR, l'invasion de leur système nerveux central a lieu sans infection préalable des tissus lymphoïdes (Beekes et McBride 2007).

c. Propagation et accumulation dans le système nerveux central

Le système nerveux central est la cible finale de l'accumulation de la protéine prion scrapie. La propagation de l'agent infectieux à partir des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (Gut-Associated- Lymphoid Tissue : GALT) vers les tissus nerveux semblent emprunter les voies du système nerveux entérique (Beekes et McBride 2000). L'agent infectieux semble atteindre les premières cibles du système nerveux central en se répandant dans le sens rétrograde le long des fibres nerveuses effectrices des nerfs sympathiques (ex : nerf splanchnique) ou parasympathique (ex : nerf vague). Les fibres parasympathiques rentrent dans le système nerveux de façon indépendante de la moelle épinière, au contraire des fibres sympathiques. Ceci indique que la PrP^{Sc} peut emprunter plusieurs voies (McBride et Beekes 1999 ; McBride *et al.*, 2001). Une fois que la PrP^{Sc} a pénétré le système nerveux par l'intermédiaire de la moelle épinière, elle s'y propage de manière antérograde et rétrograde (Beekes *et al.*, 1996). La manière selon laquelle la PrP^{Sc} se répand initialement des FDC vers le système nerveux périphérique est encore mal connue. Mais il est peu probable que cela ait lieu par l'intermédiaire des synapses puisque les contacts physiques entre FDC et synapses sont rares, et chaque type cellulaire occupe un site distinct et séparé d'un point de vue anatomique : en effet, dans la rate, les nerfs sympathiques sont associés aux vaisseaux sanguins, alors que les FDC sont plutôt localisées dans la périphérie de la pulpe blanche (Mabbott et MacPherson 2006). Une étude suggère que les cellules dendritiques mobiles peuvent jouer un rôle de transmission de l'agent des ESST directement vers le système nerveux périphérique (Aucouturier *et al.*, 2001). Le transfert intercellulaire de la PrP^{Sc} pourrait également avoir lieu au travers des exosomes soit directement à partir des FDC, soit indirectement à partir de cellules d'autres types comme les cellules dendritiques (Fevrier *et al.*, 2004 ; Mabbott et MacPherson 2006).

8. Modèles d'études des mécanismes de conversion de la protéine prion

La notion de barrière d'espèce reflète la capacité limitée qu'ont les agents des ESST à induire la maladie chez un animal d'une autre espèce : lors des premiers passages dans une espèce différente, la période d'incubation est fortement augmentée et le nombre d'animaux malades est en général très inférieur à ce qu'il est dans l'espèce d'origine. Si cette notion repose principalement sur des différences, même minimes, de séquences de la protéine prion entre l'hôte et l'espèce infectieuse, elle est également liée à la notion de souche de prions, relative à des critères tant biochimiques, que phénotypiques, récapitulés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Récapitulatif des critères pris en compte pour distinguer les différentes souches de prion.
D'après Beringue *et al.* (2008b).

Phénotype	Technique ou protocole utilisés
Période d'incubation	Evaluation du temps d'incubation ou de la durée de survie entre l'inoculation et les premiers signes cliniques
Effets neurologiques	Tests de comportements Signes cliniques
Propriétés biochimiques de PrP ^{Sc}	Test de résistance à la PK Pourcentage des différentes glycoformes Dénaturation induite par des chaotropes Résistance à la chaleur Ratio de PrP native Vs PrP dénaturée Microscopie infrarouge, dichroïsme circulaire
Distribution de PrP ^{Sc} dans le cerveau	Immunohistochimie
Nature des dépôts de PrP ^{Sc}	Histologie, liaison au rouge Congo Epitopes spécifiques des dépôts de PrP ^{Sc}
Distribution et intensité de la spongiose	Profil lésionnel étudié par histologie
Tropisme	Dans le système lympho-réticulaire Dans des cultures cellulaires

Ainsi, afin de faciliter l'étude des ESST, de nombreux modèles ont été élaborés, afin de s'affranchir du phénomène de la barrière des espèces, mais également pour que le temps d'incubation de la maladie soit réduit.

a. Les modèles transgéniques

La souris, dont le génome est entièrement séquencé, est un modèle utilisé couramment mais qui ne développe pas naturellement d'ESST. Par contre, la transmission de l'agent de la tremblante du mouton à des souris sauvages est un mécanisme qui peut prendre un à deux ans (Laude *et al.*, 2002). Un grand nombre de modèles murins développant des ESST plus rapidement ont été créés afin de faciliter l'étude de la maladie : souris « ovinisées » (Crozet *et al.*, 2001 ; Vilotte *et al.*, 2001 ; Westaway *et al.*, 1994), « bovinisées » (Beringue *et al.*, 2006 ; Buschmann et Groschup 2005 ; Castilla *et al.*, 2003 ; Scott *et al.*, 1999) ou « humanisées » (Asante *et al.*, 2002 ; Beringue *et al.*, 2008 ; Kong *et al.*, 2005 ; Telling *et al.*, 1995). Ces souris ont été obtenues par transgénèse additionnelle dans un fond génétique *Prnp*^{-/-} afin d'éviter toute interférence entre le gène murin et le gène de l'espèce d'intérêt.

Les lignées TgOv expriment un transgène ovin correspondant à l'allèle VRQ de la protéine prion, associé à une forte susceptibilité de développer la tremblante. Les différentes lignées mises au point diffèrent par le niveau d'expression, voire de surexpression, de la protéine prion ovine, mais aussi par le type de construction du transgène. En effet, trois techniques ont été utilisées pour obtenir ces souris. La lignée Tg1 a été obtenue par transgénèse d'un vecteur phagique semi-génomique, qui insère le cadre ouvert de lecture ovin

en lieu et place du cadre murin (Fischer *et al.*, 1996 ; Laude *et al.*, 2002). Les souris résultantes expriment un niveau basal de la PrP ovine, ce qui les rend sensibles à l'agent de la tremblante, et réduit considérablement la durée d'incubation (Laude *et al.*, 2002). Une deuxième lignée Tg2, est issue de la lignée précédente, mais le promoteur murin endogène contrôlant l'expression de *Prnp* est remplacé par le promoteur humain du cytomégalo virus. Ces lignées expriment la PrP ovine à un niveau deux fois supérieur au niveau basal (Laude *et al.*, 2002). Enfin, une lignée Tg3 est obtenue par insertion d'un ADN issu de chromosome artificiel bactérien (BAC) de 125 kb, contenant la totalité de l'unité de transcription d'*oPrnp*. Ce transgène est introduit au minimum dans trois générations successives de souris *mPrnp*^{-/-}. Ces souris surexpriment jusqu'à seize fois la protéine prion ovine et sont fortement sensibles à l'agent de la tremblante (Laude *et al.*, 2002 ; Vilotte *et al.*, 2001). En effet, dans les clones surexprimant le plus la protéine prion ovine (facteur supérieur à 8), le temps d'incubation n'est que de 2 ou 7 mois suite à une inoculation par une souche provenant du Royaume-Uni (souche 127S) ou de France (souche LA404), respectivement. Ce qui réduit au minimum d'un an la durée d'incubation de la maladie par comparaison à des souris sauvages (Laude *et al.*, 2002).

La création de telles lignées permet non seulement de faciliter l'étude des ESST, mais également d'induire la synthèse de grandes quantités d'agent infectieux PrP^{Sc}, accumulés dans le cerveau de ces souris.

b. In vitro

Bien que les modèles murins constituent de nouveaux outils pour la compréhension des ESST, ils sont parfois difficiles à appréhender dans leur ensemble car ils impliquent un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques associés. C'est la raison pour laquelle l'étude des ESST passe également par des modèles plus simples, tels que les modèles cellulaires ou acellulaires mis au point plus récemment.

i. Les modèles cellulaires

Jusqu'au début des années 2000, l'étude des ESST par l'intermédiaire de lignées cellulaires reposait essentiellement sur deux lignées murines : la lignée N2a et la lignée GT1. Ces cellules, respectivement issues de neuroblastome et de la région hypothalamique, expriment des niveaux élevés de PrP^c, mais ne permettent la multiplication que de trois souches de prions préalablement adaptées à la souris (Race *et al.*, 1987 ; Schatzl *et al.*, 1997). Par exemple, la souche « Chandler », obtenue à partir de cerveau de souris infectée

expérimentalement, peut se répliquer à la fois dans les cellules N2a et GT1 (Nishida *et al.*, 2000 ; Race *et al.*, 1987). Il existe d'autres lignées capables de répliquer des prions pathologiques, mais souvent, ces lignées font appel à des souches expérimentales (tableau 7). Afin d'étudier les processus liés à la pathologie induite par l'agent naturel, de nouvelles lignées cellulaires transgéniques ont été élaborées afin de s'affranchir du phénomène de barrière d'espèces (tableau 7). Ainsi des cellules de lapin et de souris ont été modifiées et surexpriment la protéine prion ovine en lieu et place de la protéine endogène. Il s'agit des cellules ROv (Rabbit Ovine) (Vilette *et al.*, 2001) et MOv (Mouse Ovine) (Archer *et al.*, 2004). Ces dernières sont issues des souris TgOv déjà évoquées dans le paragraphe précédent. Ce sont des cellules gliales de type « cellules de Schwann » qui n'expriment plus la PrP murine, mais surexpriment d'un facteur 6 la protéine prion ovine.

Tableau 7 : Lignées cellulaires infectables par des souches de prions adaptées ou naturelles. D'après Vilette (2008)

Lignée cellulaire	Origine tissulaire ou type cellulaire	Espèces	Souche de prion
Souches adaptées aux rongeurs			
C-1300	Neuroblastome	Souris	Chandler
NIE-115	Neuroblastome	Souris	Chandler
N2a	Neuroblastome	Souris	Chandler, Fukuoka-1 ; RML
N2a # 58	Neuroblastome	Souris	Chandler, 139A ; 22L
GT1	Cellules hypothalamiques	Souris	SY-CJD, FU-CJD, Chandler
PC12	Phéochromocytome	Rat	139A
SMB	Cellules cérébrales	Souris	139A ; 22F ; 79A ; Chandler
SN56	Cellules nerveuses issues du septum	Souris	Chandler ; ME7 ; 22L
NSC	Cellules souches neuronales	Souris	RML ; 22L
MSC80	Cellules de Schwann	Souris	Chandler
HpL3-4	Cellules de l'hippocampe	Souris	22L
L929, NIH/3T3	Fibroblastes	Souris	22L ; ME7 ; RML
MG20	Cellules de la microglie	Souris	Chandler, ME7, Souche d'ESB adaptée à la souris
C2C12	Myoblastes	Souris	22L
moRK13	Cellules épithéliales RK13	Lapin	Fukuoka-1 ; Chandler ; M100
voRK13	Cellules épithéliales RK13 exprimant la PrP du campagnol	Lapin	Souche d'ESB adaptée au campagnol
HaB	Cellules cérébrales	Hamster	Prions de Hamsters
Souches de prion naturelles			
ovRK13 (ROv)	Cellules épithéliales RK13 exprimant PrP ovine	Lapin	Agent naturel de la tremblante
MOv	Cellules de Schwann issus des ganglions dorsaux des racines nerveuses (DRG)	Souris TgOv	Agent naturel de la tremblante
CGN ^{ov}	Cultures primaires de neurones du cervelet	Souris TgOv	Agent naturel de la tremblante
MDB	Lignée fibroblastique	Cerf	Agent de la maladie du dépérissement chronique (CWD)

ii. Production de PrP^{res} dans un modèle acellulaire

Les outils qui permettent de diagnostiquer une ESST sont à l'heure actuelle basés sur la détection *post-mortem* de la PrP^{Sc}. La mise au point d'une méthode sûre et précoce permettrait de diagnostiquer la maladie avant que les premiers signes cliniques n'apparaissent, mais ceci nécessite que l'agent soit amplifié pour pouvoir être détecté.

Les premières expériences de conversion *in vitro* menées par l'équipe de Kocisko (1994) étaient d'une efficacité très faible puisque la quantité de PrP^{Sc} créée était inférieure à la quantité de départ (Kocisko *et al.*, 1994). En se basant sur ces travaux et sur la théorie de la multiplication de la PrP^{Sc} par nucléation-polymérisation, Saborio *et al.* (2001) ont imaginé une méthode cyclique, telle la PCR, au cours de laquelle le fractionnement des unités de polymérisation augmenterait le rendement de l'expérience (figure 17). Un extrait de cerveau atteint de scrapie constitue la source de la PrP^{Sc} et est dilué dans un extrait de cerveau sain de telle manière que le signal PrP^{Sc} soit indétectable par Western Blot. Le cerveau sain est la source de PrP^c (Saborio *et al.*, 2001). Un amas de PrP^{Sc} tient lieu de noyau de nucléation. Il grossit par incorporation de la PrP^c qui, au contact de la PrP^{Sc} se transconforme. Ce noyau amplifié est alors fractionné par sonication en de multiples noyaux de nucléation de petites tailles, permettant à nouveau une nucléation. Dans ce cas, les auteurs ont montré que la PrP^{Sc} de départ ne constitue plus que 3% de la totalité de la PrP^{res} obtenue en fin d'expérience (Saborio *et al.*, 2001).

Les caractéristiques de cette PrP obtenue *in vitro* ont été étudiées. De façon intéressante, la PrP^{res} obtenue par PMCA a le même profil électrophorétique que la PrP^{Sc} source, que ce soit sans traitement, après digestion PK, ou après déglycosylation à la PNGase (figure 18A). De plus, afin de préciser ses capacités d'infection, des hamsters ont été inoculés avec la PrP^{res} obtenue par PMCA. Les résultats montrent que non seulement cette protéine produite *in vitro* provoque l'accumulation de la PrP^{Sc} dans le cerveau des hamsters (figure 18B) mais qu'en plus, ces animaux développent des signes cliniques d'ESST. La PrP^{res} obtenue est donc bien de la PrP^{Sc} capable de répllication et d'accumulation *in vivo* (Castilla *et al.*, 2005b).

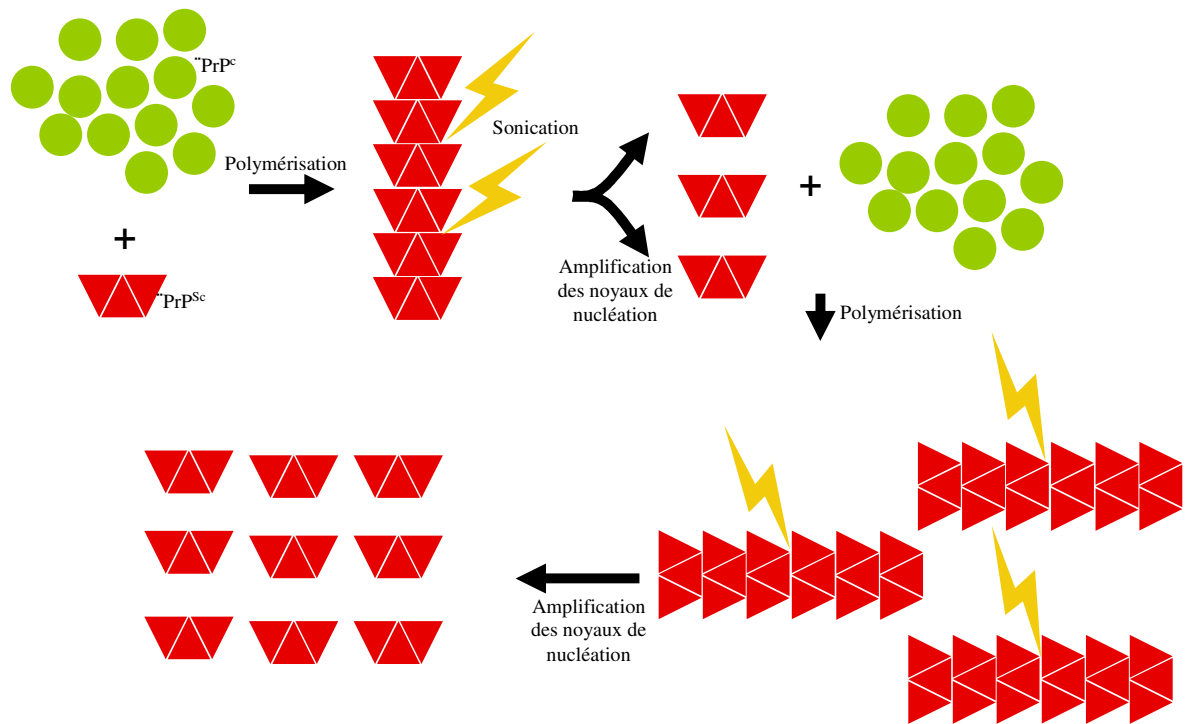


Figure 17 : Représentation schématique de la méthode de PMCA.

L'amplification est basée sur de multiples cycles d'incubation de la PrP^{Sc} en présence d'un excès de PrP^C, suivi d'une phase de sonication. Pendant les périodes d'incubation, la taille de l'agrégat de PrP^{Sc} augmente par incorporation / transconformation de la PrP^C. Les phases de sonication permettent de fractionner ces agrégats qui deviennent autant de nouveaux sites de conversion. D'après Saborio *et al.* (2001).

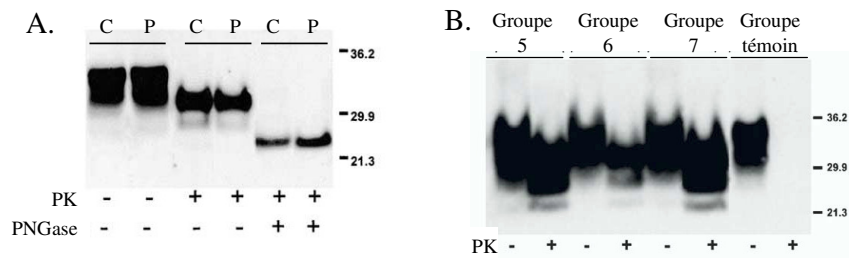


Figure 18 : Caractérisation de la PrP^{res} obtenue par PMCA.

A. La comparaison des profils électrophorétiques de la PrP issue de cerveau de hamster (C) ou obtenue par PMCA (P) met en évidence des caractéristiques très proches. B. Mise en évidence de l'infectiosité de la PrP^{res} obtenue par PMCA : les animaux du groupe 5 ont été infectés par un extrait de cerveau pathologique ; Les animaux du groupe 6 par de la PrP^{res} obtenue après une dilution d'un facteur 10^{10} puis PMCA ; les animaux du groupe 7 ont été inoculés par de la PrP^{res} obtenue après une dilution d'un facteur 10^{20} puis PMCA. D'après Castilla *et al.* (2003).

Récemment, des travaux ont permis d'amplifier de la PrP^{Sc} présente dans un extrait de cerveau en utilisant de la protéine prion recombinante comme source de PrP^c. ce qui permet de s'affranchir de la présence d'éventuels cofacteurs présents dans l'extrait de cerveau sain (Atarashi *et al.*, 2007).

IV- Les interactions de la protéine prion avec son environnement

La localisation préférentielle de la PrP au niveau des rafts lui permet d'établir des interactions étroites avec différents éléments de la membrane plasmique, mais aussi de la matrice extracellulaire. Des interactions avec divers partenaires (tableau 8) tels que des glycanes, des protéines, ou des acides nucléiques ont été décrites. Cependant, elles ont surtout été mises en évidence *in vitro*, et ne sont pas toujours vérifiables *in vivo*.

a. Interactions avec des acides nucléiques

Les premières études *in vitro* mettent en évidence l'interaction de l'ADN avec un peptide synthétique correspondant aux résidus 106 à 126 de la PrP humaine (Nandi 1997) ce qui provoque son agrégation (Forloni *et al.*, 1993). Les polymères obtenus se lient au rouge Congo de façon similaire à la PrP²⁷⁻³⁰ et sont partiellement résistants à une digestion par la protéinase K, ce qui suggère un rôle des acides nucléiques dans les processus de transconformation (Nandi et Leclerc 1999). Cette étude a ouvert la voie à d'autres travaux qui ont mis en évidence que la PrP interagit de manière spécifique avec des petits ARN très structurés que sont les ARNsh (« small hairpin » : épingle à cheveu). Le complexe nucléoprotéique formé possède des propriétés surprenantes non seulement de résistance à une dégradation par la PK, mais aussi à une dégradation par la RNase A (Adler *et al.*, 2003). L'interaction entre la PrP et les acides nucléiques aurait lieu principalement par l'intermédiaire de la région N-terminale globulaire de la protéine, cependant la région C-terminale pourrait également avoir un rôle (Lima *et al.*, 2006).

L'interaction de la PrP avec des acides nucléiques doit être confirmé *in vivo*. En effet la localisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique réduit la probabilité de rencontre avec les acides nucléiques. Cependant, au cours de son trafic intracellulaire, la PrP est retrouvée dans le cytosol et dans le noyau (Gu *et al.*, 2003 ; Jaegly *et al.*, 1998 ; Pfeifer *et al.*, 1993), ce qui rend possible une rencontre avec des acides nucléiques.

b. Interactions avec des partenaires protéiques

La protéine prion interagit avec la laminine, une protéine matricielle qui joue un rôle majeur dans la différenciation, la migration et la survie des neurones. Cette interaction PrP/laminine, de très haute affinité, est probablement impliquée dans les mécanismes de plasticité des neurones (Graner *et al.*, 2000).

Des interactions avec le précurseur du récepteur à la laminine (LRP, 37kDa) et avec sa forme mature (LR, 67 kDa) ont également été décrites (Hundt *et al.*, 2001 ; Rieger *et al.*, 1997). D'après ces travaux, cette liaison est directe, mais peut aussi dépendre des HSPG (Hundt *et al.*, 2001). La co-localisation de ces deux protéines à la surface des cellules suggère un rôle de LRP dans l'internalisation de la PrP, rôle confirmé par les travaux de Gauczynski *et al.* (2001). En effet, leurs résultats mettent en évidence que LRP se comporte comme un récepteur pour la PrP. Leur liaison induit une internalisation active de cette dernière. LRP est également un récepteur pour la PrP^{Sc}. Cette interaction est inhibée par des glycanes polysulfatés, analogues structuraux des GAGs de type HS (Gauczynski *et al.*, 2006). Ceci suggère un rôle de LRP dans la pathogénèse des ESST.

La PrP^c interagit également avec des protéines d'adhérence cellulaire, en particulier de type N-CAM. Cette interaction a été mise en évidence dans des cellules N2a par pontage réversible au formaldéhyde. Cette technique a permis de démontrer que la PrP^c fait partie d'un complexe protéique de haut poids moléculaire dont le constituant majeur est une N-CAM (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001). Cette interaction PrP^c / N-CAM a lieu aussi *in vivo*, puisqu'elle a été confirmée dans le cerveau de souris (Schmitt-Ulms *et al.*, 2004). Au niveau des rafts lipidiques, la PrP^c peut recruter les N-CAM et participer ainsi à l'activation de la kinase Fyn (Santuccione *et al.*, 2005).

D'autres protéines co-immunoprécipitent avec la PrP^c : c'est le cas de STI-1, une protéine de réponse au stress, décrite comme une chaperonne et prenant part à la formation des complexes macromoléculaires des HSP 70 et 90 (Zanata *et al.*, 2002). Cette interaction étaye un peu plus le rôle neuro-protecteur de la protéine prion

c. Interactions avec des glycoconjugués

i. Avec des glycolipides

Les rafts dans lesquels est concentrée la PrP sont particulièrement riches en glycolipides. En effet, la composition de ces rafts diffère de celle où est ancrée la protéine Thy-1, protéine glypiée la plus représentée au niveau des neurones (Brugger *et al.*, 2004). Les rafts associés à la PrP contiennent des acides gras plus insaturés que ceux associés à Thy-1. Des hexosylcéramides substitués par des chaînes d'acides gras particulièrement longues (C22-24 au lieu de C18) présents en très grande quantité reflètent également une composition propre aux rafts associés à la PrP (Brugger *et al.*, 2004). Les hexosylcéramides décrits sont probablement des glucosylcéramides, précurseurs des gangliosides. Or la PrP peut interagir avec les gangliosides, notamment le GM3, par l'intermédiaire de sa boucle V3-like, domaine d'interaction avec les sphingolipides (Mahfoud *et al.*, 2002). Cette interaction aurait un rôle protecteur de la PrP^c en stabilisant sa conformation, empêchant la conversion en PrP^{Sc} (Brugger *et al.*, 2004). Ces données sont appuyées par une récente étude qui fait état d'une altération du métabolisme du GM3 au cours de la pathogénèse, dans la rate de souris transgéniques ovinisées. Du fait de leurs charges négatives apportées par les acides sialiques, ces gangliosides créent un environnement particulier autour de la PrP, propice à la stabilisation de l'isoforme PrP^c. Une modification de l'expression du gène *St3gal5*, responsable de la sialylation du GM3, modifierait la composition des rafts, ce qui pourrait favoriser la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} (Guillerme-Bosselut *et al.*, 2009).

ii. Avec des glycosaminoglycannes

L'interaction de la PrP avec le LRP/LR est dépendante de la présence d'HS (Hundt *et al.*, 2001). Ces travaux suggèrent donc une interaction directe entre la protéine prion et les HS. Les travaux de Pan *et al.* (2002) ont permis de déterminer que l'interaction a lieu principalement dans le domaine N-terminal de la PrP, au niveau du site KKRPK (résidus 25 à 29), site riche en résidus chargés positivement. Des interactions plus faibles peuvent également se produire au niveau des résidus 34 à 46, et également au niveau des acides aminés 44 à 56, 54 à 65 et enfin 108 à 120 avec une affinité moindre. Des études récentes ont mis en évidence que la PrP se lie également aux chondroïtines sulfate (CS), en particulier aux CS A, et qu'il existe une corrélation linéaire entre cette liaison et la concentration en CS (Triantaphyllidou *et al.*, 2006). Certains auteurs suggèrent d'ailleurs que les HS et CS pourraient interagir selon la même affinité avec la PrP. Cependant, ces GAGs n'étant pas

répartis équitablement au sein des tissus, l'étude des interactions sera influencée par le tissu étudié (Ben-Zaken *et al.*, 2003).

Tableau 8 : Résumé des partenaires principaux de la protéine prion cellulaire, leur fonction supposée et leur localisation subcellulaire. D'après Vana *et al.* (2007).

Partenaires de PrP ^c	Fonction putative	Localisation subcellulaire	Références
Synapsine 1b	Transduction de signaux	Vésicules intra-cellulaires	(Spielhaupter et Schatzl 2001)
Grb2	Transduction de signaux	Vésicules intra-cellulaires	
Pint 1	Inconnue	Inconnue	
Fyn	Liaison / internalisation	Membrane plasmique	(Mouillet-Richard <i>et al.</i> , 2000)
Cavéoline 1	Liaison / internalisation	Cavéoles / rafts	
Clathrine	Liaison / internalisation	Puits recouverts de clathrine	
CK2	Liaison / internalisation	Cavéoles / rafts	(Meggio <i>et al.</i> , 2000)
STI 1	Neuroprotection, croissance des neurones	Surface cellulaire	(Zanata <i>et al.</i> , 2002)
Bcl-2	Anti apoptotique / pro apoptotique	Cytoplasme	(Laine <i>et al.</i> , 2001 ; Rambold <i>et al.</i> , 2006 ; Sakudo <i>et al.</i> , 2003)
p75	Liaison / internalisation	Cavéoles / rafts	(Della-Bianca <i>et al.</i> , 2001)
Laminine	Différenciation cellulaire / croissance cellulaire / Mouvement matriciels	Surface cellulaire	(Graner <i>et al.</i> , 2000)
GAGs	Pathogénèse des ESST / récepteur de PrP ^c	Surface cellulaire	(Hijazi <i>et al.</i> , 2005 ; Pan <i>et al.</i> , 2002)
HSPG / HS	Cofacteur de la formation de PrP ^{Sc} / Récepteur de PrP ^c et PrP ^{Sc}	Surface cellulaire	(Gabizon <i>et al.</i> , 1993 ; Horonchik <i>et al.</i> , 2005 ; Hundt <i>et al.</i> , 2001)
Hsp 60	Pourrait influencer la conversion de PrP	Mitochondries principalement. A un moindre degré : RE, Golgi, granules de sécrétion et fractions membranaires	(Edenhofer <i>et al.</i> , 1996)
Nrf 2	Inconnue	Inconnue	(Yehiely <i>et al.</i> , 1997)
Aplp 1	Inconnue	Surface cellulaire	
Récepteur à la laminine LR	Liaison et internalisation de PrP ^c et PrP ^{Sc}	Surface cellulaire	(Gauczynski <i>et al.</i> , 2006 ; Gauczynski <i>et al.</i> , 2001 ; Morel <i>et al.</i> , 2005 ; Rieger <i>et al.</i> , 1997)
NRAGE	Viabilité des neurones	Cytosol	(Bragason et Palsdottir 2005)
Tubuline	Trafic intracellulaire	Cytosquelette (réseau de microtubules)	(Niezanski <i>et al.</i> , 2005)
ZAP 70	Activation des lymphocytes T	Rafts	(Mattei <i>et al.</i> , 2004)

V- Les glycosaminoglycannes

La modulation des phénotypes par des évènements extracellulaires est une nouvelle façon d'appréhender l'ère post génomique de la biologie cellulaire. Cette nouvelle approche, liée à des avancées technologiques importantes, a fait prendre conscience que des composés glycaniques complexes tels que les glycosaminoglycannes (GAGs) pourraient avoir un rôle biologique fondamental, au même titre que les protéines ou les acides nucléiques. Ainsi, les GAGs, composants primaires de la matrice extra-cellulaire (MEC) interagissent avec de nombreuses protéines et modulent leur activité, prenant ainsi part à des processus biologiques complexes tels que le développement des organismes, l'angiogénèse, la croissance axonale, ou les phénomènes de coagulation (Sasisekhara *et al.*, 2006). Un nombre croissant de travaux font également état de leur implication dans des processus pathologiques tels que les cancers (Sasisekhara *et al.*, 2006), mais aussi les troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, ou les maladies à prions (Diaz-Nido *et al.*, 2002).

1. Les différents glycosaminoglycannes et leur structure chimique.

D'un point de vue chimique, les GAGs sont des polymères glycaniques linéaires non ramifiés, constitués de répétitions d'unités disaccharidiques (figure 19). Le plus souvent, ces unités sont constituées d'un sucre aminé et d'un acide uronique : les héparanes sulfates sont constitués d'un résidu acide glucuronique (GlcA) lié en $\beta(1-4)$ à un résidu *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) ; les kératanes d'un résidu galactose lié en $\beta(1-4)$ à un résidu GlcNAc ; les chondroïtines d'un GlcA lié en $\beta(1-3)$ à un résidu *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) . La structure des dermatanes est très proche de celles des chondroïtines mais le résidu GlcA est remplacé par un acide iduronique (IdoA). Enfin, l'acide hyaluronique est constitué de la répétition d'une unité GlcA liée en $\beta(1-4)$ à un GlcNAc.

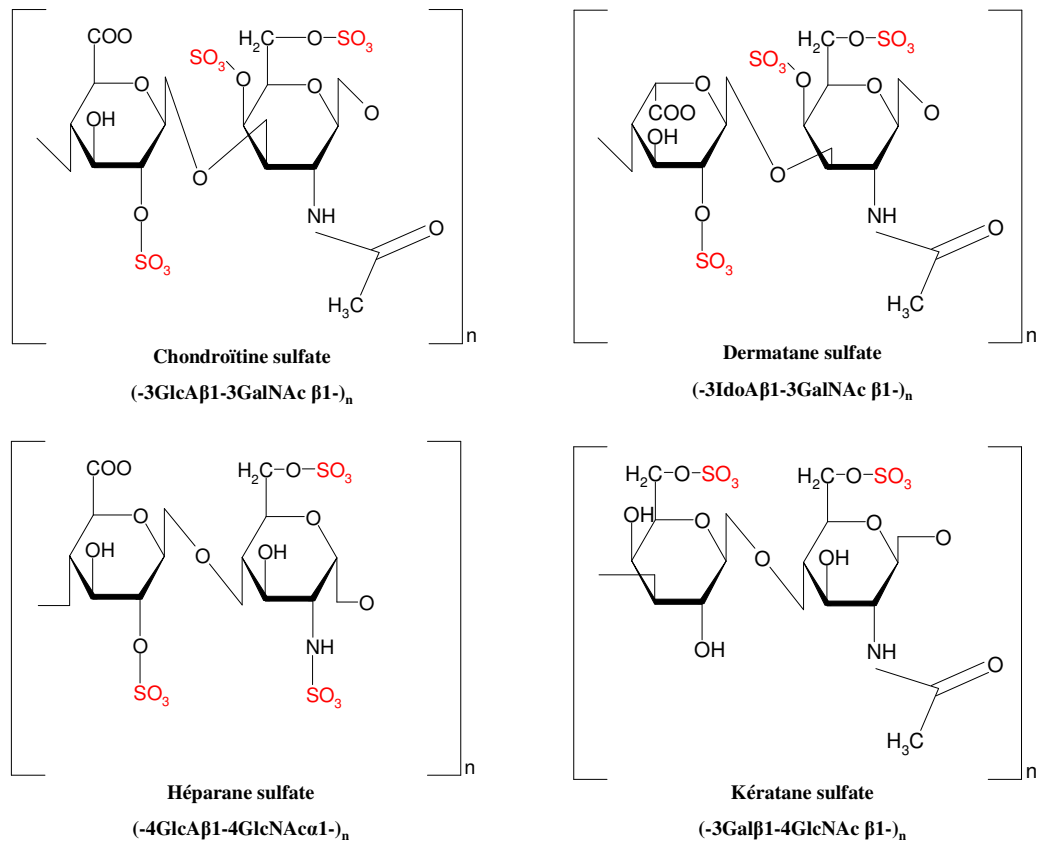


Figure 19 : Formules chimiques des unités dissaccharidiques constitutives des différents GAGs.
La présence des groupements sulfate (en rouge) n'est pas obligatoire.

Comme l'illustre la figure 19, chaque GAG porte des groupements sulfate SO_3^- en différentes positions, majoritairement sur des extrémités $-\text{OH}$ non réductrices. Ces groupements chimiques apportent des charges négatives aux GAGs qui deviennent des polyanions. Ce sont ces charges qui leur permettent d'interagir avec un grand nombre de ligands biologiques comme des facteurs de croissance, des récepteurs, des protéines de la MEC (Habuchi *et al.*, 2004) et mais aussi d'autres protéines comme la protéine prion qui possède plusieurs sites de liaison pour les HS (Pan *et al.*, 2002). La spécificité des interactions entre les GAGs et leurs ligands est due, au moins pour partie, à la répartition fine de ces groupements sulfate le long de la chaîne de GAGs (Habuchi *et al.*, 2004). Ces groupements sont greffés au cours de la synthèse des GAGs par des sulfotransférases, enzymes dédiées à cette fonction (Kusche-Gullberg et Kjellen 2003).

Dans la majorité des cas, les chaînes linéaires de GAGs sont liées à des protéines pour former une structure macromoléculaire : le protéoglycane (PG). Les héparanes sulfates (HS) et les chondroïtines / dermatanes sulfates (CS / DS) sont *O*-liées au cœur protéique du PG par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide sur un résidu sérine (figure 20).

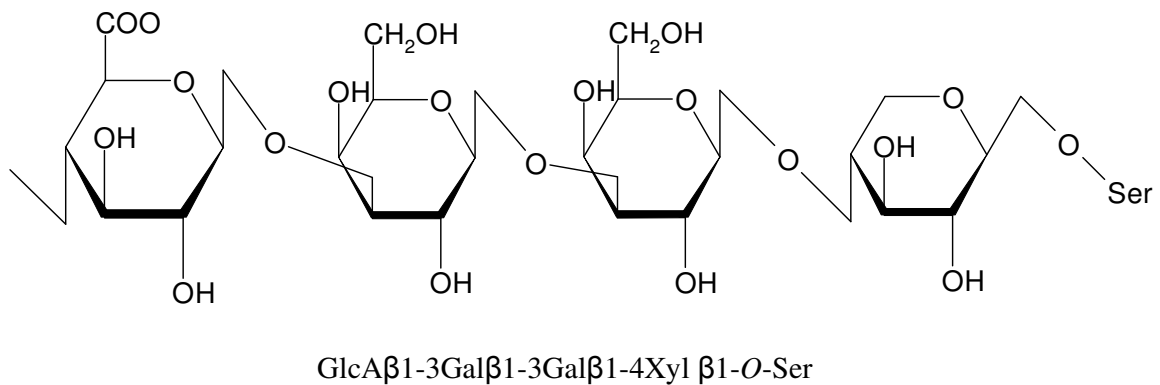


Figure 20 : Formule développée du tétrasaccharide de liaison.

Cette structure est commune aux HS, CS et DS, et permet aux GAGs de se lier au cœur protéique» pour former le PG.

En revanche, les kératanes sulfates (KS) sont soit *N*-liés (cas des KS I, rencontrés dans la cornée), soit *O*-liés (cas des KS II rencontrés dans les cartilages et KS III décrits dans le cerveau) au cœur protéique du PG (figure 21).

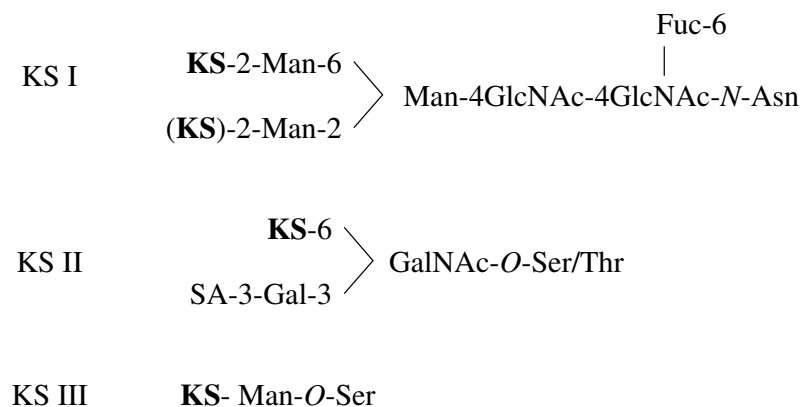


Figure 21 : Structure glycanique des différents types d'oligosaccharide de liaison rencontrés dans les PG à motif KS. D'après Funderburgh (2002).

Quant à l'acide hyaluronique, il forme des chaînes linéaires qui ne sont jamais associées à des protéines.

Les PG sont les constituants majeurs de la MEC. Celle-ci est présente dans tous les tissus, mais la distribution des molécules qui la composent et la manière selon laquelle elles s'organisent donnent lieu à des formes très diverses (Galtrey et Fawcett 2007) : on retrouve

majoritairement des PG à motif DS dans les fibres de collagène (Parry *et al.*, 1982), KS dans la cornée et le cartilage (Funderburgh 2002), HS dans le système cardio-vasculaire et dans le système nerveux central, et enfin les PG à motifs CS (CSPG), majoritairement représentés dans les cartilages et dans le système nerveux.

2. Le métabolisme des glycosaminoglycannes

La biosynthèse des GAGs de type HS ou CS/DS est un processus complexe qui implique un nombre important d'enzymes qui assemblent le polymère de GAG et lui greffent des groupements sulfate à des positions très précises (Sasisekharan *et al.*, 2006).

a. la synthèse des glycosaminoglycannes

i. La synthèse du tétrasaccharide de liaison commun aux héparanes et chondroïtines

Cette étape, qui initie la synthèse des GAGs de type HS ou CS, aboutit à la synthèse du tétra-saccharide de liaison : -GlcA β (1-3)Gal β (1-3)Gal β (1-4)Xyl- β 1-O-(Ser)-. Cette étape fait intervenir quatre enzymes différentes : la xylosyl transférase (XylT-I), la β 4-galactosyl transférase (GalT-I), la β 3-galactosyl transférase (GalT-II) et la β 3-GlcA transférase (GlcAT-I) qui transfèrent respectivement le xylose, le galactose en β (1-4), le galactose en β (1-3) et l'acide glucuronique en β (1-3). Comme le montre la figure 22, c'est l'addition du cinquième sucre qui détermine la nature finale du GAG. En effet, si un GlcNAc est ajouté en α (1-4) à la suite de l'acide glucuronique du tétra-saccharide de liaison, la chaîne synthétisée sera de nature héparane sulfate. L'activité GlcNAcTransférase I est portée par les protéines EXTL2 et EXTL3. Au contraire, si le cinquième sucre greffé est un GalNAc en β (1-4), il y aura initiation d'une chaîne de chondroïtine ou de dermatane. L'enzyme intervenant alors est la GalNAcTransférase I (Silbert et Sugumaran 2002 ; Sugahara et Kitagawa 2002). Ainsi, l'étape de la liaison d'un GlcNAc ou d'un GalNAc à la suite du tétra-saccharide de liaison apparaît comme un interrupteur moléculaire, orientant la synthèse soit vers les HS, soit vers les CS. Quelle que soit la voie empruntée, l'élongation a ensuite lieu pour former les chaînes de GAGs (figure 22).

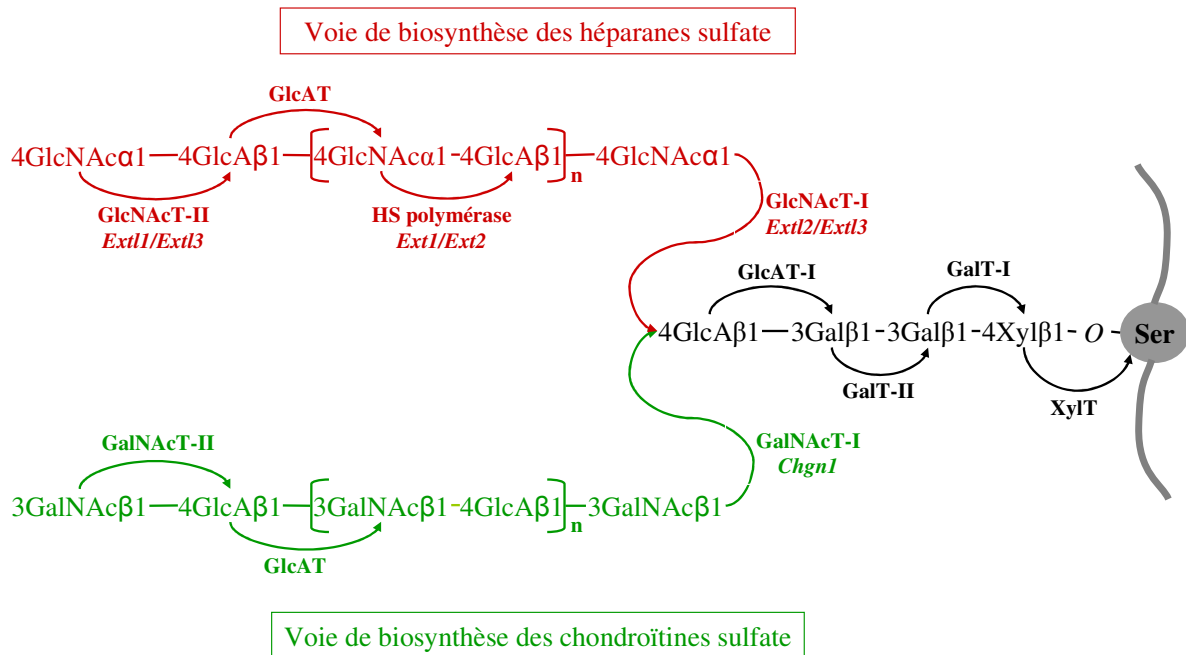


Figure 22 : Représentation schématique de la biosynthèse des GAGs de type HS et CS. Après la synthèse du tétra-saccharide de liaison (en noir) la synthèse est orientée soit vers la synthèse des HS (en rouge) soit vers la synthèse des CS (en vert). Le cœur protéique est représenté en gris. Les différentes glycosyltransférases sont représentées également. D'après Suguhara et Kitagawa (2002).

ii. Les héparanes sulfate

L'élongation des chaînes d'HS est assurée par l'HS polymérase, capable d'activité GlcNAcTransférase II et l'HS glucuronyltransférase (HS GlcAT-II). Cette enzyme est responsable de la synthèse des unités disaccharidiques -4GlcNAcα(1-4)GlcAβ1. Il s'agit d'un complexe hétéro-oligomérique composé des protéines EXT1 et EXT2 (Kobayashi *et al.*, 2000 ; McCormick *et al.*, 2000). Ces deux enzymes ne participent pas à l'élongation de la chaîne de GAG, leur rôle se limite à la formation des unités disaccharidiques (Suguhara et Kitagawa 2002). L'élongation de la chaîne d'HS est dévolue aux enzymes EXTL1 et EXTL3. Cette dernière possède également une activité GlcNAcTransférase I et pourrait intervenir aussi dans l'initiation des chaînes d'HS, au même titre que le complexe EXT1/EXT2 (Kim *et al.*, 2001). Après leur élongation, les chaînes d'héparane subissent un certain nombre de modifications : tout d'abord, le résidu GlcNAc est déacétylé puis *N*-sulfaté par l'enzyme NDST (*N*-deacétylase / *N*- sulfotransférase). Ceci est un préalable à toutes les modifications suivantes : l'épimérisation en C5 de l'acide glucuronique en acide iduronique (IdoA), la 2-*O*-sulfatation d'IdoA, les 6-*O* et 3-*O* sulfatation des résidus GlcNAc. Ces réactions sont catalysées respectivement par la C5-épimérase, la 2-*O*-sulfotransférase

HS2ST, la 6-*O*-sulfotransférase HS3ST et la 3-*O*-sulfotransférase HS6ST (Sugahara et Kitagawa 2002).

iii. Les chondroïtines sulfate

L'élongation des chaînes de CS est assurée par la chondroïtine synthase. De façon similaire à ce qui est observé dans la synthèse des HS, la chondroïtine synthase possède deux activités : une activité GlcATransférase et une activité GalNAcTransférase. Elles agissent de concert pour synthétiser les unités disaccharidiques. La GalNAcTransférase impliquée dans cette réaction est une GalNAcTransférase II, différente de la GalNAcTransférase I qui initie la chaîne de CS (Silbert et Sugumaran 2002). Au cours de leur synthèse les chaînes de CS subissent des modifications. Des cas de sulfatation du tétra-saccharide de liaison ont été observés sur l'un ou les deux résidus galactose. Ceci n'a jamais été observé sur les chaînes d'HS (Sugahara et Kitagawa 2000). Il est intéressant de noter qu'au sein d'un même syndécan, où l'on retrouve les deux types de GAG attachés au même cœur protéique, seules les chaînes des CS présentent des groupements sulfate sur les résidus Gal du tétra-saccharide de liaison (Ueno *et al.*, 2001). De plus, il apparaît que la position sur laquelle est greffé le groupement sulfate sur le galactose est spécifique des CS : on retrouve un Gal-4-sulfate dans les chondroïtines 4-sulfate, alors que des Gal-6-sulfate ne sont observés que dans les chondroïtines 6-sulfate. De plus, à l'heure actuelle, aucune sulfotransférase spécifique de la sulfatation du tétra-saccharide de liaison n'a été mise en évidence, ce qui suggère que la liaison des groupements sulfate sur les résidus galactose est réalisée par les mêmes enzymes que celles qui interviennent sur la chaîne de CS. Il semble également que cette modification n'ait lieu que tardivement dans le processus de synthèse et ne serait donc pas impliquée dans le processus de ciblage du PG en cours de synthèse dans le Golgi (Funderburgh 2002). La sulfatation des chaînes de CS / DS est très variable : des résidus GalNAc portant un groupement sulfate en position 4 uniquement, en position 6 uniquement ou en positions 4 et 6 sont retrouvés au sein de la même chaîne de CS. De même, les résidus GlcA peuvent occasionnellement arborer des groupements SO_3^- en positions 2 ou 3. Enfin des résidus GalNAc totalement non sulfatés sont également observés (Silbert et Sugumaran 2002). Le processus de sulfatation des chaînes de CS se produit de façon simultanée à leur élongation. En effet, des expériences de polymérisation interrompue ont permis de mettre en évidence que le processus de sulfatation commence dans les 30 secondes qui suivent l'initiation de la chaîne, pendant que la chaîne est activement en cours d'élongation (Sugumaran et Silbert 1990).

iv. Les kératanes sulfate

Comme ceci a déjà été évoqué (figure 21), il existe trois types d'oligosaccharides de liaison pour les KS, qui peuvent être de type *N*-glycane (KS I) ou *O*-glycane (KS II et KS III). La biosynthèse de l'oligosaccharide de liaison est un événement déterminant de la biosynthèse des KS (Funderburgh 2002). L'élongation des chaînes a lieu suite à l'action de deux glycosyltransférases qui greffent alternativement un résidu Gal et un résidu GlcNAc au polymère en croissance. Il s'agit respectivement des $\beta(1-4)$ galactosyltransférase ($\beta 4$ GalT-I) et $\beta(1-3)$ *N*-acétylglucosaminyltransférase. Les chaînes de KS sont modifiées au cours de leur synthèse par des processus de sulfatation (Keller *et al.*, 1989). Que la chaîne de KS soit *O*-liée ou *N*-liée, ce sont les mêmes sulfotransférases qui agissent : la KSGal6ST (Fukuta *et al.*, 1997) et des enzymes de la famille des GlcNAc6ST, proches des chondroïtine-6-sulfotransférases, mais dont le rôle n'est pas encore complètement élucidé. Il semblerait que la GlcNAc6ST5 soit impliquée dans la biosynthèse des KS cornéens (Akama *et al.*, 2002 ; Akama *et al.*, 2001). Ainsi, les positions 6 des résidus GlcNAc et Gal peuvent porter des groupements SO_3^- . Cependant leur répartition varie en fonction du tissu dans lequel se situe la chaîne de KS, car les enzymes qui interviennent dans ces processus ont une expression tissu-spécifique. De plus, la sulfatation sur les résidus Gal et les résidus GlcNAc n'intervient pas au même moment de la synthèse des KS. En effet, la sulfatation en 6 des résidus GlcNAc a lieu pendant l'élongation de la chaîne alors que la sulfatation des résidus Gal se produit quand le polymère est terminé (Kusche-Gullberg et Kjellen 2003).

v. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) est un long polymère de haut poids moléculaire (10^5 à 10^7 Dalton) dont la synthèse a lieu sur la face interne de la membrane plasmique par une enzyme transmembranaire : l'acide hyaluronique synthase (AHS) (Itano et Kimata 2002). Une fois synthétisé, l'AH est extrudé ou transloqué vers l'espace extracellulaire où il va interagir avec ses différents partenaires. Il ne subit pas de modifications pendant ou après sa synthèse, et n'est donc pas sulfaté.

b. Les compartiments subcellulaire de la synthèse des protéoglycannes

L'addition des chaînes de CS et HS se fait sur des protéines de la voie de sécrétion pour donner respectivement des CSPG et des HSPG. La synthèse des PG commence dans le réticulum endoplasmique avec la liaison du xylose sur un résidu sérine d'une protéine nouvellement synthétisée (figure 23). La synthèse du tétrasaccharide de liaison est achevée

dans l'appareil de Golgi avec l'addition de deux résidus Gal et du résidu GlcA. L'élongation des chaînes de GAGs ainsi que leur sulfatation a lieu dans le réseau trans-golgien. Lorsque la synthèse du PG est terminée, celui-ci est relargué dans l'espace extracellulaire ou transloqué à la membrane plasmique.

Pour les KS, le même processus d'élongation et de modification a lieu au niveau du réseau trans-golgien mais leur initiation dépend d'enzymes impliquées dans des étapes précoces de *N*-glycosylation ou de *O*-glycosylation.

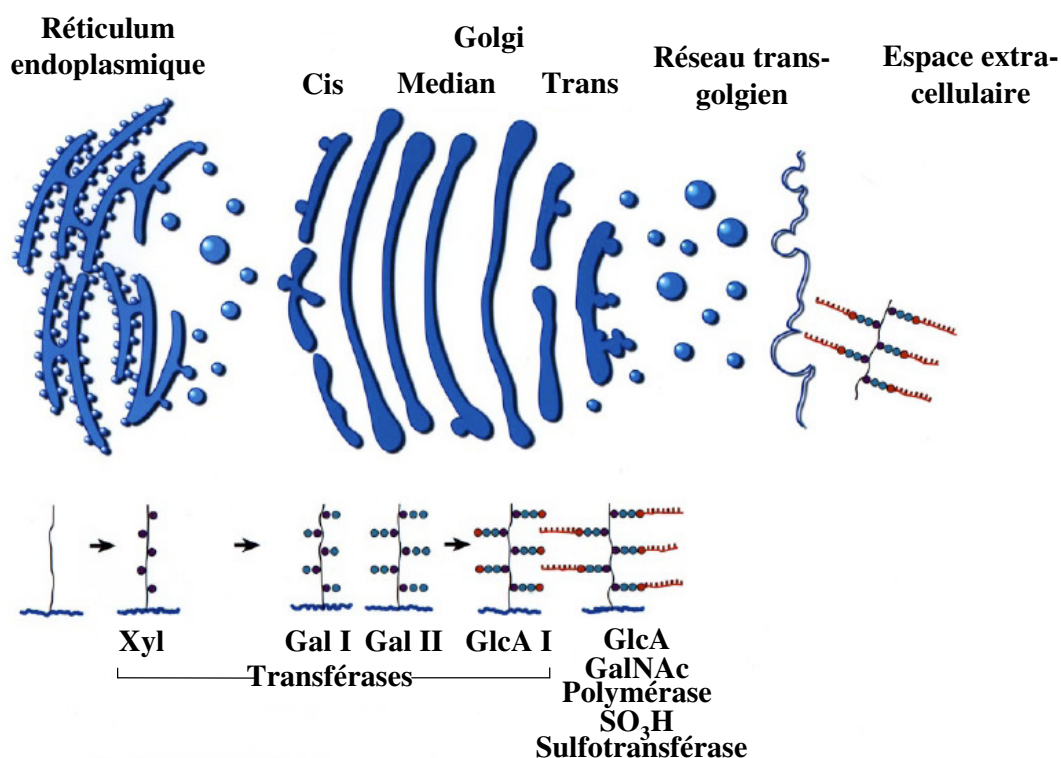


Figure 23 : Localisation subcellulaire de la synthèse des protéoglycannes à motif chondroïtine. D'après Silbert et Sugumaran (2002).

3. La fonction des protéoglycannes dans les tissus nerveux

Les PG sont localisés en des points stratégiques dans de nombreux tissus, et jouent un rôle central dans les interactions cellule-cellule et cellule-substratum au cours du développement, dans le tissu mature, ou pendant son vieillissement (Oohira *et al.*, 2000b). Ils sont aussi impliqués dans un certain nombre de pathologies. Au niveau du système nerveux, des PG à chaînes CS, HS et KS peuvent être impliqués dans la morphogénèse, la plasticité, et la réparation des tissus, le guidage des axones.

La MEC du système nerveux est unique : elle ne contient que très peu de protéines fibreuses comme le collagène ou la fibronectine, mais est constituée d'une grande quantité de

GAGs soit liés à une protéine (PG), soit libres sous la forme d'acide hyaluronique (Novak et Kaye 2000). Ce dernier est un composant majeur des matrices extra-cellulaires où il assure la cohésion entre les molécules qui la composent.

a. Les HSPG

On trouve de nombreux HSPG dans le cerveau. Compte tenu du grand nombre de modifications que peuvent subir ces chaînes de GAGs, un nombre considérable (10^{36}) de polymères différents peut être observé. En effet, chaque unité disaccharidique peut subir une épimérisation, une déacétylation et une sulfatation sur diverses positions (Esko et Lindahl 2001). Ceci est cohérent avec le fait que les chaînes d'HS ont la capacité de lier un nombre important de protéines différentes, qu'elles soient membranaires ou sécrétées. En effet, les HS se lient à des facteurs de croissance, à des protéines morphogènes, des composants de la MEC, des molécules d'adhésion cellulaire, ou encore des facteurs de guidage des axones. Ceci suggère que ce glycoconjugué est une molécule polymorphe qui a un rôle certain dans l'architecture des tissus (figure 24) (Van Vactor *et al.*, 2006).

De plus, les chaînes d'HS sont liées à différentes classes de protéines pour former les HSPG dont la localisation varie. On distingue trois topologies d'HSPG : transmembranaires (Syndecan), ancrés à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (Glypican), et sécrétés (Perlecan et Agrin). Les syndecans et glypicans peuvent également être libérés dans l'espace extra-cellulaire suite à l'action d'enzymes qui vont cliver le cœur protéique (Van Vactor *et al.*, 2006).

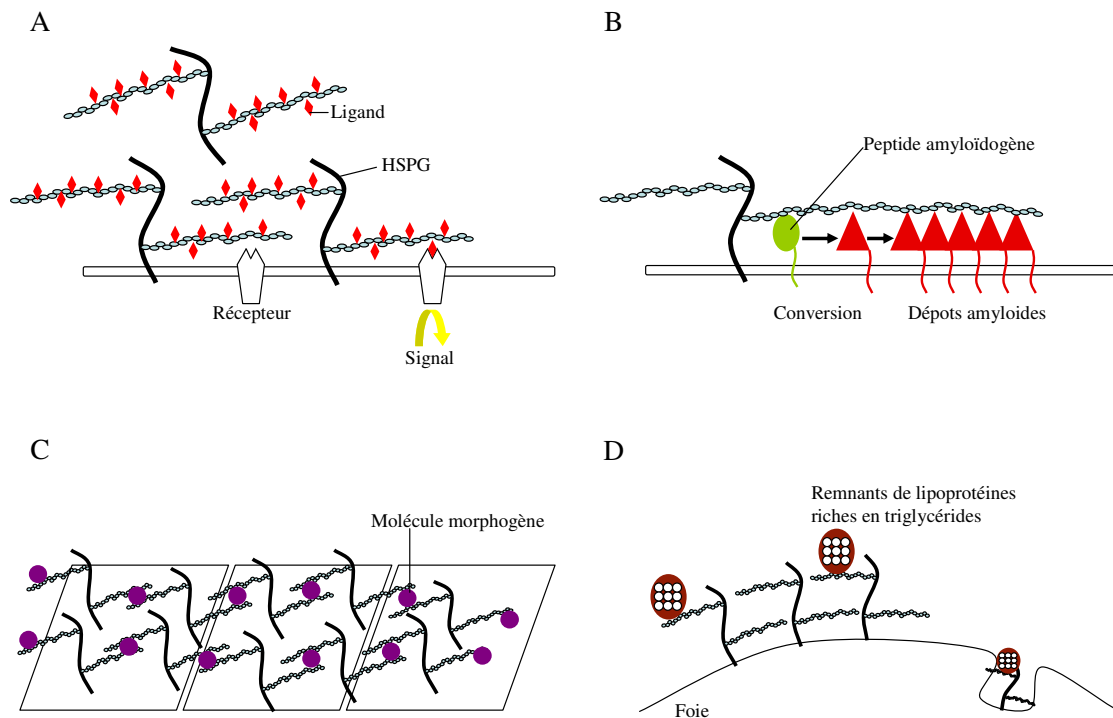


Figure 24 : Les différentes fonctions des HS. (A) Les HSPG exprimés à la surface des cellules où dans la MEC servent de réservoir à ligands ou de co-récepteurs. (B) Les HSPG accélèrent la transconformation de peptides amyloïdogènes monomériques en feuillets β , entraînant la formation de dépôts amyloïdes. (C) Les HSPG sont impliqués dans la formation de gradients de molécules morphogènes, responsables de l'architecture des tissus. (D) Au niveau du foie, les HSPG jouent un rôle crucial dans l'internalisation des lipoprotéines. D'après Nadanaka et Kitagama (2008).

Bien que les HSPG soient présents dans de très nombreux tissus, et à de nombreux stades de développement, l'analyse de leurs fonctions *in vivo* désigne le système nerveux comme une localisation où ces molécules ont un rôle important dans la régulation de l'architecture des cellules et des tissus. Des anomalies de la synthèse de ces GAGs vont donc provoquer des anomalies de morphogénèse, qui peuvent être à l'origine de multiples maladies.

b. Les CSPG

Les CSPG sont les GAGs les plus abondants dans la MEC du système nerveux central (Sugahara et Mikami 2007). Comme pour les HSPG, une grande diversité est générée par la variété des protéines, par le nombre de chaînes de GAGs ramifiées, et par les profils de sulfatation de ces chaînes qui définit leur type (tableau 9).

Tableau 9 : Les différents types de CS en fonction de la substitution des extrémités non-réductrices des résidus glycaniques. On trouve quatre types de CS définis par leur sulfatation. D'après Galtrey et Fawcett (2007).

des CS Type de CS	Disaccharides constitutif	Acide Glucuronique		
		2-R	4-R	6-R
A		— OH	— OSO ₃ ⁻	— OH
C		— OH	— OH	— OSO ₃ ⁻
D		— OSO ₃ ⁻	— OH	— OSO ₃ ⁻
E		— OH	— OSO ₃ ⁻	— OSO ₃ ⁻

La sulfatation des chaînes de GAGs en différentes positions aboutit à des profils particuliers qui vont déterminer leur capacité à se lier à d'autres molécules comme la laminine, la fibronectine, la tenascine, l'acide hyaluronique ou le collagène (Galtrey et Fawcett 2007 ; Rhodes et Fawcett 2004). Ces interactions dictent l'organisation de la matrice du système nerveux central. Chez l'adulte, des travaux ont permis de mettre en évidence un rôle des CSPG dans le contrôle de la plasticité matricielle. Les CSPG sont particulièrement abondants au niveau du réseau péri-neuronal dont la fonction est encore floue, mais pour lequel sont suspectés des rôles dans le maintien de l'architecture tissulaire ainsi qu'une implication dans la maturation des synapses des motoneurones (Rhodes et Fawcett 2004). A ce niveau les CSPG inhibent la plasticité des neurones, mais aussi leur croissance et leur régénération. Des expériences de digestion des chaînes de CS par la chondroïtinase ABC restaure une plasticité qui n'est normalement observée qu'au cours du développement. Pendant cette période, les CSPG agissent comme des molécules de guidage des axones : leur profil d'expression combiné à leur propriété d'inhiber la croissance des axones va permettre à ces dernières de ne se développer que dans des régions dépourvues de CSPG (Snow *et al.*, 1990b).

c. Les KSPG

Les chaînes de KS ont récemment été décrites dans le cerveau, dans une configuration particulière appelée KS-III (voir figure 21, page 63) (Funderburgh 2002). Dans cet organe, les KS sont connus pour être des inhibiteurs de la croissance des axones (Jones et Tuszynski 2002). Au cours du développement, leur localisation spatio-temporelle est donc réduite à des zones où la croissance axonale est faible. Par exemple, au cours du développement du rat, les KS sont présents au niveau du tube neural à partir de 12,5 jours pendant 24 heures maximum. C'est le laps de temps pendant lequel les neurones accroissent leurs axones (Snow *et al.*,

1990b). Chez l'adulte, ils sont présents au sein de la microglie, et sont impliqués dans la réponse à un traumatisme : une astrocytose réactive se développe et se localise autour de la zone lésée pour former une cicatrice gliale. Cependant cette cicatrice est un frein à la régénération des neurones, puisque cette réponse physiologique fait intervenir une augmentation de la quantité de KS et de CS, ces deux GAGs étant des inhibiteurs de la croissance axonale.

4. La sulfatation des glycosaminoglycannes : vers l'existence d'un code

a. L'hypothèse d'un code de sulfatation

D'après Habuchi *et al* (2004) il semble que la sulfatation des GAGs soit un élément clef de la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques, développementaux et pathologiques. Les auteurs proposent même l'existence d'un « code de sulfatation » nécessitant une régulation fine et une répartition précise des groupements sulfate le long des chaînes de GAG. Il a été montré que la protéine prion interagissait avec des GAGs. Les travaux de Ben-Zaken *et al* (2003) apportent des éléments en faveur de l'existence de ce code de sulfatation. En effet, ils mettent en évidence des profils de sulfatation particuliers au sein des chaînes d'HS nécessaires à leur interaction avec la protéine prion, par l'intermédiaire de régions hypersulfatées, encadrées par des régions moyennement sulfatées, elles-mêmes flanquées de régions non-sulfatées. Ces profils de sulfatation permettraient une liaison correcte avec la PrP^c, et stabiliseraient cette dernière sous sa conformation cellulaire. De plus, ces régions protégeraient les GAGs vis-à-vis de certaines enzymes de dégradation, aboutissant à des chaînes de GAGs de longueurs différentes (figure 25) (Ben-Zaken *et al.*, 2003).

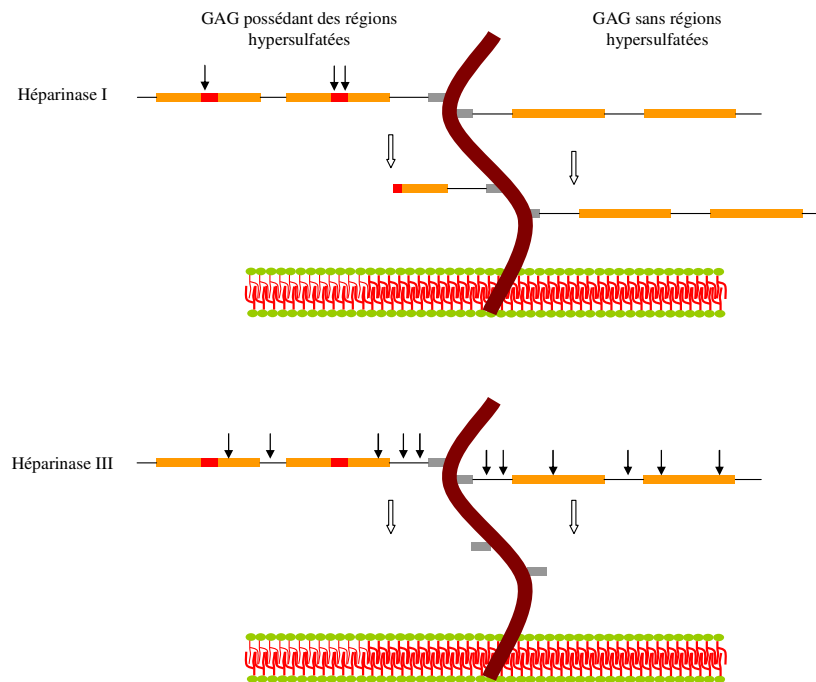


Figure 25: Influence du code de sulfatation sur la sensibilité des GAGs aux enzymes de dégradation. L'héparinase I digère uniquement au sein des régions hyper sulfatées (en rouge). Les fragments de GAGs produits sont donc différents selon que la chaîne possède ou non ces régions. L'héparinase III digère quant à elle au sein des régions moyennement sulfatées (en orange) ou non sulfatées (trait noir). Que la chaîne possède ou non des régions hyper sulfatées n'a donc pas d'incidence sur le profil de digestion résultant. Seul demeure le tétrasaccharide de liaison (en gris). D'après Ben-Zaken *et al.* (2003).

b. Des altérations du code de sulfatation à l'origine de graves pathologies

A l'heure actuelle un certain nombre d'organismes mutants présentant des défauts pour diverses sulfotransférases ont été produits. Ils mettent en évidence un rôle critique de la sulfatation des GAG dont des altérations conduisent à de graves pathologies ou problèmes de développement (tableau 10). Par exemple, des phénotypes sévères ont été observés chez la souris dont la sulfatation des héparanes en position 2 du résidu GlcNAc ne se fait pas : ces souris présentent une agénésie totale des reins (figure 26) (Bullock *et al.*, 1998).

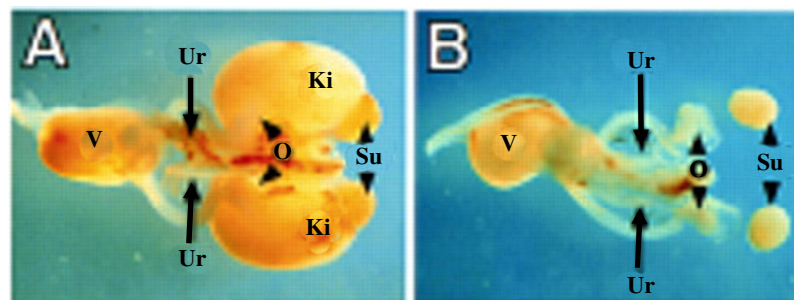


Figure 26 : Système urogénital de souris nouveau-née hétérozygote (A) et homozygote (B) pour la mutation *Hs2st*^{-/-}. La souris homozygote présente une agénésie rénale (Ki) bilatérale ainsi qu'un uretère (Ur) obstrué. (Su) Glande surrénale ; (o) ovaire ; (v) vessie. D'après Bullock *et al.* (1998).

Tableau 10 : Organismes mutants qui présentent des défauts dans la biosynthèse ou la sulfatation des GAGs D'après Habuchi *et al.* (2004).

GAGs impliqués	Espèce	Enzyme ou gène touché(e)	Activité enzymatique	Phénotype
HS	Souris	NDST-1	<i>N</i> -déacétylation et <i>N</i> -sulfatation de GlcNAc	Létal à la naissance, atélectasie pulmonaire, cyanose
		NDST-2	<i>N</i> -déacétylation et <i>N</i> -sulfatation de GlcNAc	Déficiance dans la synthèse de l'héparine dans les cellules mastocytaires
		C5-épimerase	Conversion de GlcA en IdoA dans les HS	Létal à la naissance, agénésie rénale, malformations pulmonaires
		HS2ST	2-O sulfatation de la glucosamine des HS	Létal à la naissance, agénésie rénale
		HS3ST-1	3-O sulfatation de la glucosamine des HS	Létal post-natal, retard de croissance <i>in utero</i> , coagulation normale
		EXT-1	HS copolymérase	Létal au niveau embryonnaire : défaut de la gastrulation
	Drosophile	<i>Sulfateless</i>	<i>N</i> -déacétylation et <i>N</i> -sulfatation de GlcNAc	Segmentation anormale
		<i>Tout velu</i>	HS copolymérase	Segmentation anormale
	<i>C. elegans</i>	<i>Rib-2</i>	HS copolymérase	Défaut de la gastrulation : les gènes à effets maternel ont une action létale
		Hse-5	Conversion de GlcA en IdoA dans les HS	Mauvais développement des axones
Hst-2		2-O sulfatation de la glucosamine des HS	Mauvais développement des axones	
Hst-6		6-O sulfatation de la glucosamine des HS	Mauvais développement des axones	
CS	Souris	C6ST	6-O sulfatation de GalNAc des CS	Réduction de la quantité de lymphocytes T dans la rate
	<i>C. elegans</i>	<i>Sqv-5</i>	Chondroïtine synthase	Défaut de morphogénèse vulvaire et de cytotokinésie

5. Les glycosaminoglycannes et les maladies neurodégénératives conformationnelles

De nombreux processus pathologiques impliquent les protéoglycannes. Les maladies conformationnelles neurodégénératives forment des dépôts amyloïdes auxquels sont très souvent associés des protéoglycannes de type HS. On les retrouve ainsi dans la composition des fibrilles d' α -synucléine responsables de la maladie de Parkinson, dans les plaques séniles développées au cours de la maladie d'Alzheimer, et dans les plaques amyloïdes liées à l'agrégation de la protéine prion, dans les ESST.

a. GAGs et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative liée à l'agrégation d'une protéine, l' α -synucléine. Elle se développe le plus souvent chez des sujets âgés de 45 à 70 ans, et se caractérise par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (ou *substantia nigra*). L' α -synucléine a pu être identifiée au sein des lésions pathologiques les plus précoces : les corps et les neurites de Lewy (Uversky et Fink 2004). Son agrégation sous forme de fibrilles pourrait être un élément à l'origine de la pathologie. Cet évènement est influencé par des mutations au sein du gène codant l' α -synucléine (Kruger *et al.*, 1998 ; Polymeropoulos *et al.*, 1997), mais également par des interactions avec des macromolécules chargées négativement comme les GAGs (El-Agnaf *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Narhi *et al.*, 1999).

L'agrin est un protéoglycanne à motif HS présent dans le système nerveux central. Ce HSPG se lie à l' α -synucléine, promeut son insolubilité, et accélère la formation de fibrilles. De plus, agrin et α -synucléine co-localisent au niveau des corps de Lewy. L'agrin et les HS semblent donc également participer à l'étiologie de la maladie de Parkinson, en modulant l'état d'agrégation de l' α -synucléine (Liu *et al.*, 2005).

b. GAGs et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer, décrite en 1907, se caractérise par le tableau clinique suivant : perte progressive de la mémoire, troubles du comportement, et déclin des fonctions cognitives. Ces symptômes s'accompagnent, d'un point de vue histologique, de lésions caractéristiques au niveau du cerveau : plaques séniles, neurofibrilles enchevêtrées, et angiopathie amyloïde. Ces lésions sont associées à une dégénérescence neuronale et vasculaire (pour revue, voir Selkoe 2001).

Le principal composant des plaques séniles et des amas amyloïdes vasculaires, est le peptide β -amyloïde ($A\beta$), dérivé d'un précurseur amyloïde, la protéine APP (Amyloid Precursor Protein). Les neurofibrilles enchevêtrées sont quant à elles majoritairement constituées d'une protéine hyper-phosphorylée impliquée dans l'assemblage des microtubules : la protéine τ (Lee *et al.*, 1991).

Les protéoglycannes sont associés à la fois aux dépôts amyloïdes liés au peptide $A\beta$, mais également aux neurofibrilles enchevêtrées formées par la protéine τ (Perry *et al.*, 1991 ; Snow *et al.*, 1988 ; Snow *et al.*, 1990c ; Snow *et al.*, 1987 ; Watson *et al.*, 1997 ; Young *et al.*, 1989). Le perlecan est le HSPG le plus abondant, présent dans les lésions cérébrales liées à la maladie d'Alzheimer (Snow *et al.*, 1994 ; Snow et Wight 1989). Cependant, des HSPG de type agrin, glypican 1 et syndecans 1 et 3 ont également été décrits dans des plaques amyloïdes et les neurofibrilles liées à τ (van Horssen *et al.*, 2002 ; Verbeek *et al.*, 1999). Leur rôle dans la pathologie est encore flou, mais une interaction entre les HSPG et la protéine APP pourrait influencer la formation du peptide (Narindrasorasak *et al.*, 1991 ; van Horssen *et al.*, 2003). Ces protéoglycannes pourraient jouer le rôle de chaperon envers le peptide $A\beta$ et le protéger d'une dégradation par des protéases (van Horssen *et al.*, 2003). Ils pourraient également jouer un rôle important dans la stabilisation des dépôts de protéine τ , en les protégeant d'une dégradation protéolytique (Snow et Wight 1989).

c. GAGs et maladies à prion

Les GAGs, et en particulier les HS jouent un rôle complexe dans la propagation des ESST et dans l'agrégation des protéines PrP^{Sc} (Diaz-Nido *et al.*, 2002 ; Snow *et al.*, 1990a). Les premières constatations établissant un lien entre des composés glycaniques et le développement des ESST remontent à la mise en évidence de GAGs de type HS dans des dépôts amyloïdes du système nerveux de patients atteints de GSS (Guiroy *et al.*, 1991 ; Snow *et al.*, 1990a). Par ailleurs, les HSPG co-localisent avec la protéine prion pathologique PrP^{Sc} dans le cerveau de souris atteintes de scrapie expérimentale (McBride *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que des GAGs sulfatés peuvent retarder l'apparition de la maladie, à la fois *in vivo* et *in vitro*, ce qui a conduit à l'utilisation de molécules analogues de GAG pour conduire des expériences à visée thérapeutique. Des glycanes sulfatés tels que l'héparine, la suramine, le pentosane polysulfate, le dextrane sulfate, ainsi qu'une nouvelle classe d'héparanes mimétiques (en particulier le HM2602) réduisent significativement l'accumulation de la PrP^{Sc} aussi bien dans des modèles cellulaires que chez des souris

atteintes de tremblante expérimentale (Barret *et al.*, 2005 ; Caughey et Raymond 1993 ; Ehlers et Diringer 1984 ; Gabizon *et al.*, 1993 ; Ladogana *et al.*, 1992 ; Ouidja *et al.*, 2007 ; Schonberger *et al.*, 2003).

La présence de GAGs endogènes est un pré-requis pour une liaison de la PrP^{Sc} à la cellule. En effet, dans des cellules CHO dans lesquelles l'expression des GAGs (HS) est abolie, la liaison de la PrP^{Sc} est impossible, ce qui empêche l'internalisation de la PrP^{Sc} infectieuse (Hijazi *et al.*, 2005). De même, une dégradation enzymatique des GAGs prévient la liaison et l'internalisation de la protéine PrP^{Sc} infectieuse dans des cellules N2a, CHO ou GT1-1 (Horonchik *et al.*, 2005). Les GAGs de la MEC sont donc des récepteurs pour la PrP^{Sc}.

Enfin, le métabolisme des GAGs est altéré au cours d'une infection par des prions. Des métabolites de GAGs sont ainsi retrouvés dans l'urine de moutons atteints de tremblante, ainsi que dans celle de patients souffrant de MCJ. Il est intéressant de noter que des souris *Prnp*^{-/-} présentent une forte quantité de GAGs dans leurs urines (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2005). Ces observations montrent que, si la présence des GAGs a un impact sur l'accumulation de la PrP^{Sc} dans les cellules, le contraire est également vrai : la présence de la PrP^{Sc} provoque une accumulation de GAGs, en particulier dans le compartiment lysosomal, entraînant leur dégradation. Des travaux récents montrent en effet que l'activité hexosaminidase, responsable de la dégradation des GAGs, est augmentée dans le cerveau de souris en présence de la PrP^{Sc}, aussi bien pendant la période d'incubation qu'une fois les premiers signes cliniques apparus (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2008).

Si la majorité de ces travaux impliquent les HS de manière prépondérante, Ben-Zaken *et al* (2003) suggèrent que les CS peuvent également avoir un rôle, dépendant de leur abondance dans le type cellulaire étudié.

Ainsi, un lien intime et réciproque existe entre la PrP, plus particulièrement la PrP^{Sc}, et les GAGs. Si le métabolisme des GAGs est affecté, la capacité de liaison de la PrP^{Sc} est amoindrie, et par conséquent sa capacité d'infection aussi. Au contraire, une infection par la PrP^{Sc} provoque une altération du métabolisme des GAGs, avec une augmentation de leur dégradation.

VI- La GalNAc-4-sulfotransférase 1 codée par *Chst8* et les chondroïtine sulfotransférases

L'ensemble des processus de sulfatation des GAGs est le fruit de l'activité enzymatique de sulfotransférases spécifiques. Chacune d'entre elles agit sur une structure oligosaccharidique unique, puisqu'elles reconnaissent des différences dans la structure des monosaccharides, dans les configurations anomériques, et la liaison de substrats accepteurs (Honke et Taniguchi 2002). La caractérisation d'un grand nombre de sulfotransférases a permis de déterminer leur mode d'action commun : chaque enzyme est constituée d'un domaine catalytique qui permet le transfert d'un groupement sulfate à partir d'un substrat donneur, le PAPS (5'-PhosphoAdénosine-3'-PhosphoSulfate), vers une position non réductrice du sucre accepteur.

La GalNAc4-SulfoTransférase 1 est codée par le gène *Chst8*. Elle appartient à la famille des HNK-sulfotransférases qui comprend également les chondroïtines-4-sulfotransférases 1, 2 et 3 (C4-SulfoTransférases 1, 2 et 3), la dermatane-4-sulfotransférase, la HNK-1 sulfotransférase et la GalNAc4-SulfoTransférase 2 (Hiraoka *et al.*, 2000 ; Okuda *et al.*, 2003). De fortes homologies de séquences peptidiques existent entre ces enzymes, notamment au niveau de leur domaine sulfotransférase (la C4-SulfoTransférase1 et la GalNAc4-SulfoTransférase 1 présentent entre elles 42 % d'identité et 60% d'homologie, figure 27), et une certaine ambiguïté vis-à-vis de leur spécificité de substrat en résulte (www.glycoforum.jp).

GalNAc4-ST1	142	lhqt	QQERKR	VMREACAKYR	ASSs	RRAVT	PRHVSRI	FVE	RHRVLYCEV	
C4ST	78	----	HQMRRD	QVTDTCRANS	AM	srkRRVLT	PNDLKHL	VVD	DHELIYCYV	
GalNAc4-ST1	191		PKAGCSNWKR	VLMVLa	--GL	ASSTADIQHN	TVHYGSALKR	DTFDRQGIV		
C4ST	124		PKVACTNWKR	LMMVLS	sgrGK	YSDPMEIPAN	EAHVSANLKT	NQYSIPEIN		
GalNAc4-ST1	239		HRLSTYTKML	FVREPFERLV	SAFRDKF	ehp	nsyy	HPVFG	AILARYRAN	
C4ST	174		HRLKSYMKFL	FVREPFERLV	SAYRNKF	tqk	yntsf	HKRYG	KIIRRQRKN	
GalNAc4-ST1	288		ASREALRTGS	GVQFPEFVQY	LLDVH	rpvgm	di	--HWDHVS	LCSPCLIDY	
C4ST	224		ATQEALRKGD	DVKFEEFVAY	LIDP	htqree	pfne	HWQTVY	LCHPCHIHV	
GalNAc4-ST1	336		DFVGKFESME	DDANFFLRLI	HAPGNL	TFPR	Fkdrhseea	R	TSRITHQYF	
C4ST	274		DLVGKYETLE	EDSNYVLQLA	GVSGYL	KFPPT	Yakst	----	R	TDEMTTEFF
GalNAc4-ST1	386		AQLSSLQRQR	TYDFYYMDYL	MFNYSKP	fsd	ly-			
C4ST	320		QNISAHQEQ	LYEVYKLDL	MFNYSVP	nyl	kld			

Figure 27 : Alignement des domaines sulfotransférase des protéines GalNAc4-ST1 et C4ST. Les acides aminés identiques sont indiqués en rouge, les homologues sont en bleu.

La GalNAc4-SulfoTransférase 1 est une enzyme transmembranaire de type II, à localisation golgienne (Xia *et al.*, 2000). Sous cette forme, elle catalyse le transfert d'un groupement sulfate à partir du substrat donneur, le PAPS, vers la position 4 non réductrice d'un résidu *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) (Okuda *et al.*, 2003 ; Xia *et al.*, 2000). Elle est particulièrement représentée au niveau de la glande pituitaire où son activité contribue au transfert de sulfate sur les oligosaccharides *N*-liés portés par la lutropine (Xia *et al.*, 2000). Cependant, une forme tronquée non golgienne de l'enzyme a été observée chez l'homme. Son activité s'exerce alors préférentiellement envers les chondroïtines (Xia *et al.*, 2000). Elle a été détectée par immunolocalisation au niveau de la région hypothalamo-hypophysaire chez la souris (figure 28) (Barret *et al.*, 2005).

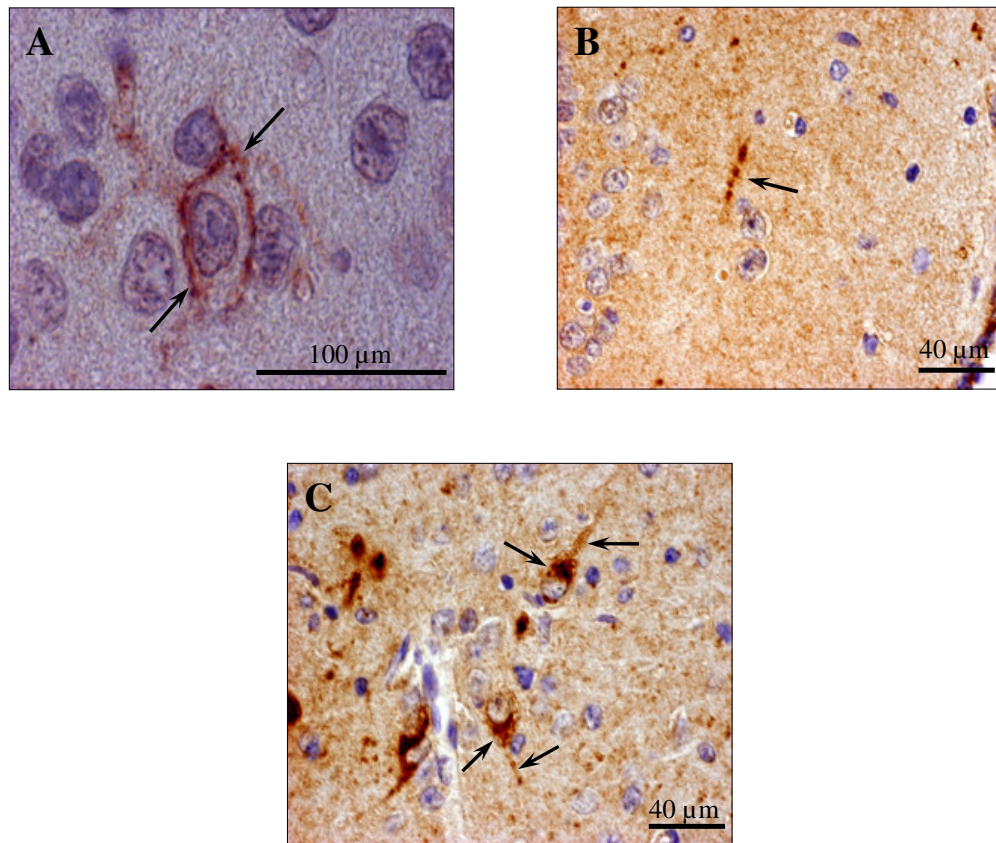


Figure 28 : Immunolocalisation de l'enzyme GalNAc4-ST1 sur cerveau de souris. (A et B) Coupes sagittales du cortex cérébral: le marquage correspondant à GalNAc4-ST1 est détecté au niveau de la membrane plasmique et des neurites. (C) Coupe latérale au niveau de l'hypothalamus: GalNAc4-ST1 est détectée au niveau cytoplasmique, mais aussi au niveau des extensions dendritiques. D'après Barret *et al.* (2005).

RESULTATS

Aujourd'hui, s'il est acquis que l'élément central des maladies à prions est la protéine prion elle-même, un certain nombre d'éléments suggèrent que des cofacteurs peuvent aussi être impliqués. En effet, nous avons vu que la PrP interagit avec différents partenaires dans son environnement, en particulier des partenaires glycosylés. Ainsi, la localisation subcellulaire de la protéine prion au niveau des rafts lui permet d'interagir avec des glycoconjugués tels que les glycolipides et les GAGs (figure 29).

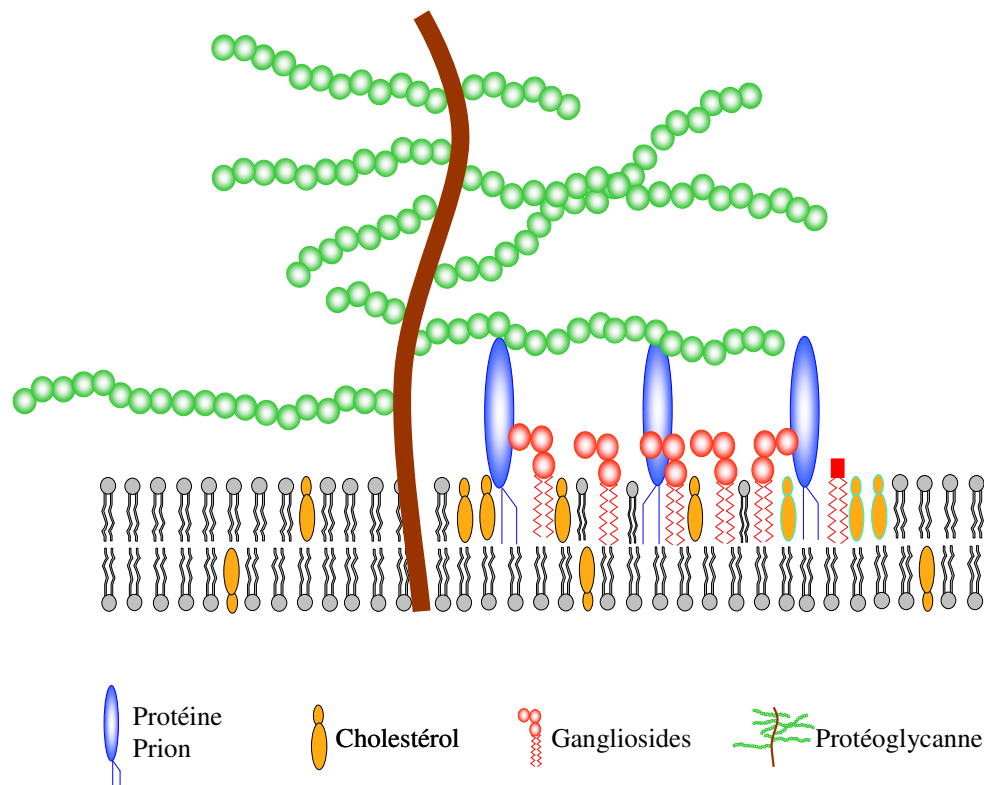


Figure 29 : Au sein des rafts, la protéine prion interagit avec des glycoconjugués de type gangliosides et GAGs.

L'interaction de la protéine prion avec les GAGs repose sur les charges portées par le partenaire glycosylé. En effet, ces polyanions interagissent avec la PrP par l'intermédiaire des charges négatives de leurs groupements sulfates. Ces sulfates diminueraient la capacité de la PrP à former des fibrilles et favoriseraient ainsi l'isoforme PrP^c (Diaz-Nido *et al.*, 2002). De plus, des expériences de cure de la PrP^{Sc} par des analogues de GAG dont le niveau de sulfatation est finement déterminé montrent que la sulfatation des GAGs est un élément central dans la pathogénèse des ESST (Barret *et al.*, 2005 ; Ouidja *et al.*, 2007 ; Schonberger *et al.*, 2003). Enfin, certains travaux font état d'une altération du métabolisme des GAGs chez des individus atteints d'ESST. En effet, des métabolites de GAGs ont été mis en

évidence non seulement dans l'urine de patients souffrant de MCJ, mais aussi dans l'urine d'animaux malades (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2005).

L'étude de l'implication des GAGs dans le métabolisme de la PrP a été initiée par l'équipe d'A. Taraboulos dans des cellules N2a infectées (ScN2a) : ces cellules soumises à l'action de l'héparinase III montrent une diminution forte du titre de PrP^{Sc}, contrairement à des cellules soumises à l'action de la chondroïtinase ABC (Ben-Zaken *et al.*, 2003). Par contre, HS et CS peuvent restaurer la présence de la PrP^{Sc} après un traitement au chlorate qui inhibe jusqu'à 96 % de leur sulfatation (Greve *et al.*, 1988), ce qui suggère que les CS ont également un rôle. Les auteurs suggèrent que les CS peuvent jouer un rôle identique aux HS dans les cellules si celles-ci les expriment fortement, ce qui n'est pas le cas des cellules N2a dans lesquelles les HS sont fortement majoritaires (Ben-Zaken *et al.*, 2003).

Des travaux menés par la même équipe mettent en évidence que les GAGs de type HS auraient également un rôle de récepteur pour les particules de prion infectieuses dans les cellules N2a, CHO-K1 et GT1-1. En effet, l'élimination des HS, l'inhibition de leur sulfatation, ou encore une compétition avec des glycanes sulfatés inhibent la liaison des particules infectieuses, mais aussi leur internalisation (Horonchik *et al.*, 2005).

Des études ont été engagées dans mon laboratoire d'accueil (UMR-INRA 1061 / Université de Limoges) et concernent l'analyse des modifications d'expression des gènes liés à la glycosylation lors du processus infectieux observé dans les maladies à prion. Les analyses ont été réalisées dans un premier temps sur une lignée cellulaire murine dérivée de l'hypothalamus (lignée GT1-7). Dans ce modèle cellulaire, il a été mis en évidence une altération prononcée de l'expression de deux gènes (*ChGn1* et *Chst8*), intervenant respectivement dans l'orientation préférentielle de la synthèse des glycosaminoglycannes vers la synthèse de chaînes de chondroïtine (figure 23), et dans la sulfatation en position 4-OH des résidus GalNAc. Lorsque l'on traite des cellules GT1 infectées avec le HM2602, un « agent curant » de type héparane mimétique, le signal PrP^{Sc} disparaît dans les cellules, mais seule l'expression du gène *Chst8* évolue vers des valeurs équivalentes à celles observées pour les cellules témoins (figure 30) (Barret *et al.*, 2005).

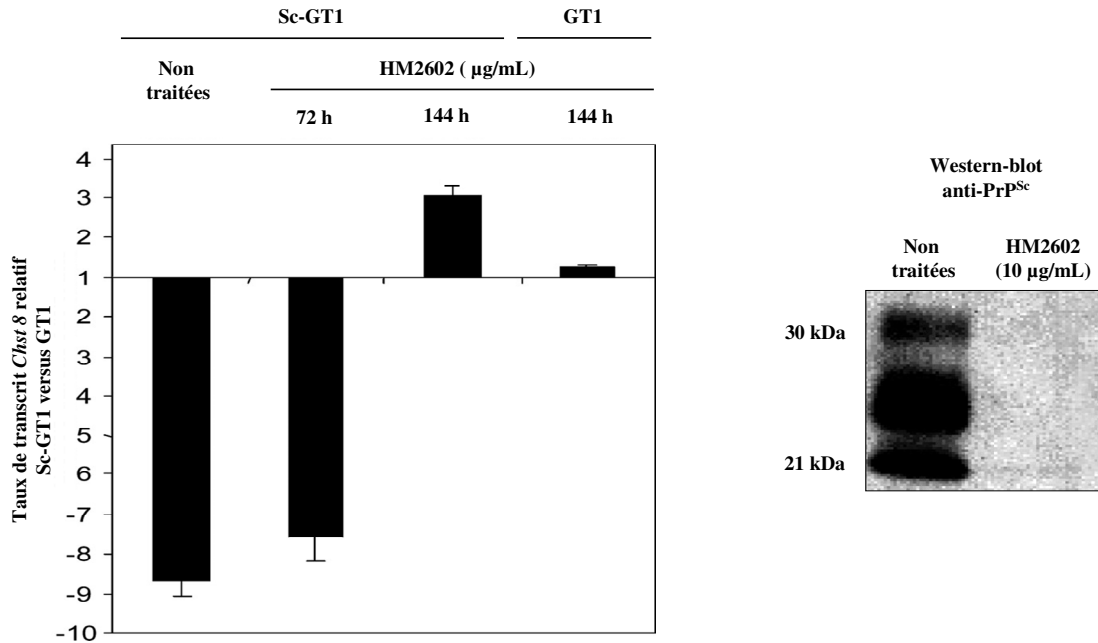


Figure 30 : Expression du gène *Chst8* dans les cellules GT1 et Sc-GT1 au cours de la réversion par un agent curant, le HM2602.

Des cellules Sc-GT1 non traitées par le HM2602 présentent une sous expression du gène *Chst8*. Après 144 heures de traitement, l'expression du gène retrouve une valeur de base légèrement sur exprimée. Dans des cellules contrôles GT1, l'emploi du HM2602 n'engendre pas de modification de l'expression du gène.

L'analyse par Western-Blotting révèle que l'agent HM2602 a fait disparaître le signal PrP^{Sc} après 144h de traitement dans les cellules Sc-GT1. D'après Barret *et al.* (2005).

La sous-expression du gène *Chst8* est donc liée à la présence de la PrP^{Sc} dans les cellules GT1-7. Cependant, le rôle de *Chst8* demeure flou. En effet, si l'enzyme codée par ce gène, la GalNAc-4-ST1, a été décrite comme une sulfotransférase golgienne de type II dont l'activité s'exerce sur la position 4-OH des résidus GalNAc, la spécificité de son substrat est ambiguë. Les travaux d'Okuda *et al.* (2000) et de Xia *et al.* (2000) ont montré que cette enzyme est impliquée dans la sulfatation des glycanes portés par les *N*-glycoprotéines, et en particulier la lutropine. Cependant, au vu des homologies de séquence qui existent entre les différentes carbohydre-sulfotransférases, en particulier au niveau du domaine catalytique, il semblerait que la région tige de l'enzyme soit le support de la spécificité de substrat. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Xia *et al.* (2000) qui mettent en évidence une forme tronquée de l'enzyme humaine, dépourvue de région tige. Cette forme aurait une activité envers les GAGs à motif chondroïtine. Les résultats de Barret *et al.* (2005) mettent quant à eux en évidence l'existence d'une forme non golgienne de l'enzyme murine (figure 28) qui serait localisée dans l'espace péri-cellulaire proche de la membrane plasmique, et

dans les neurites. Cette localisation extra-golgienne implique que la protéine est amputée de son domaine transmembranaire, et rend possible une activité envers les CS.

Ce contexte m'a amené à me poser un certain nombre de questions auxquelles j'ai voulu apporter des éléments de réponses au cours de mon travail de thèse.

Quels liens de causalité existent entre l'expression de *Chst8* et le(s) processus de transconformation ?

Les résultats de Barret *et al.* (2005) mettent en évidence qu'il existe un lien de concomitance entre l'accumulation de la protéine prion scrapie PrP^{Sc} et la modification de l'expression du gène *Chst8* dans le modèle cellulaire GT1. Cependant, cet évènement est-il propre au modèle GT1 ou bien se produit-il dans d'autres modèles cellulaires, et existe-il un lien de dépendance entre ces deux évènements ? Afin de répondre à ces deux questions, j'ai choisi de travailler sur la lignée MOv, modèle cellulaire issu de souris transgéniques tg338 très sensibles à l'agent de la tremblante (Archer *et al.*, 2004). Celles-ci constituent un modèle d'étude particulièrement adapté puisqu'elles surexpriment le variant VRQ de la protéine prion ovine, ce qui les rend très sensibles à l'agent de la tremblante (127S), et n'expriment pas la PrP murine, ce qui élimine les artéfacts liés à cette protéine. Les cellules sont mises en contact avec un inoculum constitué d'un extrait de cerveau infectieux, puis repiquées cinq fois successivement. L'expression du gène *Chst8* est alors mesurée et corrélée à l'apparition de la PrP^{Sc}.

Quelle est la part de la PrP dans la dérégulation du gène *Chst8* ?

Les résultats observés suite à l'infection par un extrait de cerveau sont-ils liés à la présence de la PrP^{Sc} uniquement, ou bien sont-ils liés à un facteur autre, présent dans l'extrait de cerveau infectieux seul ? Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé un contact des cellules MOv avec une protéine prion recombinante purifiée sous conformations α et β , mimant respectivement les protéines PrP^c ou PrP^{Sc}. Lors des cinq repiquages successifs, j'ai analysé l'apparition de la PrP^{res} par western blotting et mesuré l'expression du gène *Chst8*.

Qu'en est-il de l'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs et de leur sulfatation ?

L'UMR 1061-INRA est un laboratoire spécialisé dans la glycobiochimie et dispose de technologies novatrices, développées en collaboration avec la société Applied Biosystems, permettant d'analyser l'expression de l'ensemble des gènes liés aux processus de glycosylation. Parmi ceux-ci, 41 gènes présentent une activité liée à la synthèse, la dégradation, la déacétylation et la sulfatation des glycosaminoglycannes. J'ai donc réalisé l'analyse de ces 41 gènes en parallèle dans les cellules MOv inoculées par la PrP^α et la PrP^β et j'ai étudié leur profil d'expression tout au long de l'expérience.

Quel est l'impact de l'expression du gène *Chst8* sur la sulfatation des GAGs et sur le processus de transconformation de la PrP ?

La protéine PrP^{Sc} est thermodynamiquement plus stable que la protéine PrP^C (Baskakov *et al.*, 2001). Cette dernière, pour être maintenue dans sa conformation cellulaire, pourrait nécessiter des cofacteurs, parmi lesquels les GAGs pourraient être des candidats sérieux. En effet, ceux-ci, en interagissant avec la PrP pourraient la stabiliser (Caughey et Baron 2006). En me basant sur l'hypothèse de l'existence d'un code de sulfatation des GAG (Habuchi *et al.*, 2004), qui serait un pré-requis pour une interaction stabilisant la PrP^C, je me suis interrogé quant à l'impact de l'expression du gène *Chst8*, premièrement sur la sulfatation des chondroïtines, et deuxièmement, sur l'implication de sa dérégulation dans l'apparition de l'isoforme PrP^{Sc}. Afin d'élucider ces deux questions, j'ai créé des lignées cellulaires MOv dont l'expression du gène *Chst8* est altérée par un système d'ARNsi spécifique. J'ai ensuite entrepris la caractérisation de ces cellules sur le plan phénotypique, mais aussi moléculaire, puisque j'ai étudié l'impact de la sous-expression de *Chst8* dans les cellules MOv, sur la quantité de GAGs sulfatés, en particulier de chondroïtines, mais aussi l'impact sur la protéine prion elle-même.

Chapitre I : Analyse de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des glycosaminoglycannes au cours du processus de transconformation de la PrP.

I- La conversion de PrP^c en PrP^{res} est associée à des modifications d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des glycosaminoglycannes

Les travaux de Barret *et al.* (2005) ont mis en évidence une dérégulation du gène *Chst8* dans des cellules GT1 infectées de façon chronique par la PrP^{Sc}. Afin de comprendre l'implication de la dérégulation de ce gène au cours du processus de conversion, nous avons choisi d'infecter une lignée cellulaire, et de suivre l'évolution du taux de transcrits de *Chst8* en parallèle de l'accumulation de PrP^{Sc}. Les cellules GT1 employées précédemment étant difficiles à infecter, et les seules souches de prion auxquelles elles sont sensibles étant des souches adaptées aux rongeurs, il ne nous a pas paru opportun de les utiliser pour notre étude. Les cellules MOv quant à elles surexpriment 6 fois la protéine prion ovine, ce qui permet de s'affranchir du phénomène de barrière d'espèce, et les rend très sensibles à un agent infectieux naturel, la souche 127S.

Nos travaux mettent en évidence une dérégulation précoce de *Chst8* : une sous-expression du gène quand la formation de PrP^{Sc} est induite par l'agent infectieux naturel (sous forme d'un broyat de cerveau), une sur-expression quand la formation de PrP^{res} est induite par une protéine prion recombinante purifiée sous conformation β . Ces résultats suggèrent que si la PrP seule est capable d'induire à la fois l'apparition de PrP^{res} et de moduler l'expression de *Chst8*, les différences observées (sur-expression dans un cas, sous-expression dans l'autre), suggèrent la présence de cofacteurs dans le cerveau qui pourraient avoir une implication dans le processus de conversion. Il nous a paru judicieux d'étendre l'analyse à l'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs dans les cellules infectées par la protéine recombinante. Il apparaît que nombre d'entre eux subissent des modifications, liées à l'apparition de la PrP^{res}. Cependant, l'utilisation d'une protéine recombinante sous conformation α induit également l'apparition de PrP^{res}, mais celle-ci disparaît rapidement. Nous mettons ainsi en évidence que l'expression chronique de PrP^{res} est un phénomène qui se déroule en deux phases : la première consiste en la conversion de PrP^c en PrP^{res}, la seconde en l'expression chronique de PrP^{res}. Ces deux étapes sont associées à l'expression de six gènes, qui varient spécifiquement en fonction de la protéine recombinante utilisée, et donc de la présence à long terme ou non de PrP^{res} dans les cellules.

L'ensemble de ces résultats est décrit dans l'article intitulé « **PrP^C/PrPres conversion is associated with modifications of the expression of gene encoding enzymes involved in glycosaminoglycan metabolism.** » Cet article a été soumis au *Journal of Biological Chemistry*, le 19 mai 2009.

Manuscript Title: PrPC/PrPres conversion is associated with modifications of the expression of gene encoding enzymes involved in glycosaminoglycan metabolism

Manuscript No: JBC/2009/023085

Manuscript Type: Regular Paper

Date Submitted by the Author: 19 May 2009

Complete List of Authors: Aurélien Le Duc, Renaud Martin, Daniel Petit, Raymond Julien, and Paul-François Gallet

Keywords: CARBOHYDRATE/Glycoconjugate; CELL/Neuron;
DISEASED/Prions ; ENZYMES/Sulfotransferase;
EXTRACELLULAR MATRIX/Glycosaminoglycans ;
GENE/Regulation ; GLYCOSYLATION; ORGANISMS/Mouse

II- Analyse de l'expression du gène *Chst8* dans la lignée MOv exprimant la PrP^{Sc} de façon chronique

L'expression du gène *Chst8* est dérégulée dans le modèle cellulaire MOv, au cours des premiers stades d'apparition de la PrP^{res}. Ces modifications sont induites par une souche naturelle de prion (127S) ou par une protéine prion recombinante sous conformation α ou β . Bien que la réponse à ces deux types d'inducteurs soit différente (sous expression de *Chst8* induite par la souche 127S, sur expression induite par la PrP recombinante quelle que soit sa conformation), la formation de PrP^{res} se produit avec les deux types d'inducteurs de conversion utilisés. Pourtant, l'expression chronique de PrP^{res} n'est observée qu'avec la souche 127S et la PrP recombinante en conformation riche en feuillets β .

Nous avons étudié l'expression du gène *Chst8* dans les cellules MOv exprimant fortement et de façon chronique la PrP^{Sc}, soit 15 repiquages après leur inoculation avec la souche 127S. Le gène est à nouveau sous exprimé, puisque nous avons mesuré une diminution du taux de transcrite d'un facteur 43 par rapport aux cellules témoins. Ceci est cohérent avec ce qui a été observé dans le modèle GT1 (Barret *et al.*, 2005), où l'expression du gène *Chst8* est également diminuée (-17) quand les cellules expriment de fortes quantités de PrP^{Sc} de façon chronique. Cependant, ces résultats soulèvent la question suivante : quel mécanisme interne à la cellule exprimant PrP^{Sc} permet la sous expression tardive de *Chst8* ?

1. Matériel et méthodes

Pour ces travaux les cellules MOv ont subi 15 repiquages successifs après avoir été en contact avec l'inoculum, un extrait de cerveau contenant la souche de prion 127S.

L'immunodétection par western blot ainsi que la quantification des transcrits de *Chst8* font appel aux techniques décrites préalablement dans l'article précédent.

La quantification des GAGs sulfatés a été réalisée en suivant la méthode décrite par Barbosa *et al.* (2003) mais avec quelques modifications. Les cellules MOv à confluence sont rincées deux fois dans du PBS avant d'être décollées par grattage dans 6 mL de PBS. Elles sont récupérées et centrifugées pendant 5 min à 2 000xg. Les culots sont remis en suspension dans un 1 mL de tampon de lyse (K₂HPO₄ 100 mM pH 8,0 ; Triton X-100 1% (v/v)) et incubés 10 min à 4°C. Les lysats sont centrifugés 30 min à 13 000xg pour éliminer l'ADN génomique. Une digestion par la protéinase K (50 µg/µL) de ces lysats est ensuite réalisée pendant 24 h à 56°C. Après inactivation de la PK par dénaturation pendant 10 min à 100°C, les échantillons digérés sont filtrés à travers des cartouches Ultrafree-MC (Millipore,

Bedford, MA), afin d'éliminer l'ADN résiduel. Des échantillons de 25 μ L sont traités à la PK et utilisés pour déterminer la quantité de GAGs sulfatés totaux : ils sont additionnés à 1 mL de solution de complexation (DMMB 34 mg/L dissous dans une solution contenant de l'éthanol à 5%, GuHCl 0.2 mM, formate de sodium 2% et acide formique 0.15 %). Les mélanges réactionnels sont agités vigoureusement pendant 30 min puis centrifugés 30 min à 13 000xg. Les culots contenant les complexes insolubles GAG-DMMB sont dissous par agitation forte dans 1 mL de solution de décomplexation (Acétate de sodium 50 mM pH 6.8, GuHCl 4M, propan-1-ol 10% (v/v)). Pour évaluer la quantité de chondroïtine sulfate présente dans les échantillons, les héparanes sulfates ont été éliminés : 100 μ L des lysats filtrés sont incubés pendant 1h dans 100 μ L de nitrite de sodium 5% (p/v) et 100 μ L d'acide acétique à 33% (v/v). La réaction est arrêtée par addition de 100 μ L de sulfamate d'ammonium à 12,5% (p/v). Une fraction de 100 μ L est complexée au DMMB selon le protocole décrit ci-dessus. L'absorbance de ces mélanges décomplexés est mesurée à 656 nm, et la quantité de GAG totaux ou de chondroïtine sulfate a été calculée à partir d'une courbe de calibration réalisée avec des mélanges en quantités égales de chondroïtine sulfate A, C et D. Les résultats sont exprimés en ng de GAGs / μ g de protéines dans chaque échantillon.

2. Résultats

L'analyse des cellules MOv inoculées avec un extrait de cerveau contenant la souche 127S (figure 31A) montre qu'après 15 repiquages, un important signal PrP^{Sc} (après digestion PK) est détecté. Ces cellules expriment donc la PrP^{Sc} de façon chronique. La quantification du taux de transcrits de *Chst8* par PCR quantitative met en évidence une forte sous expression (-43.4 ± 6.7) du gène dans ces cellules *Sc*-MOv, en comparaison avec les cellules *C*-MOv, inoculées par un extrait de cerveau sain (figure 31B). Afin d'évaluer l'impact de cette sous-expression sur les GAGs sulfatés présents dans la MEC, leur quantité a été mesurée (figure 31C). Une augmentation de 36% des GAGs sulfatés totaux est mise en évidence dans les cellules *Sc*-MOv, dans lesquelles la part des CS est diminuée par rapport aux cellules *C*-MOv (Figure 31D), et la part des HS est augmentée.

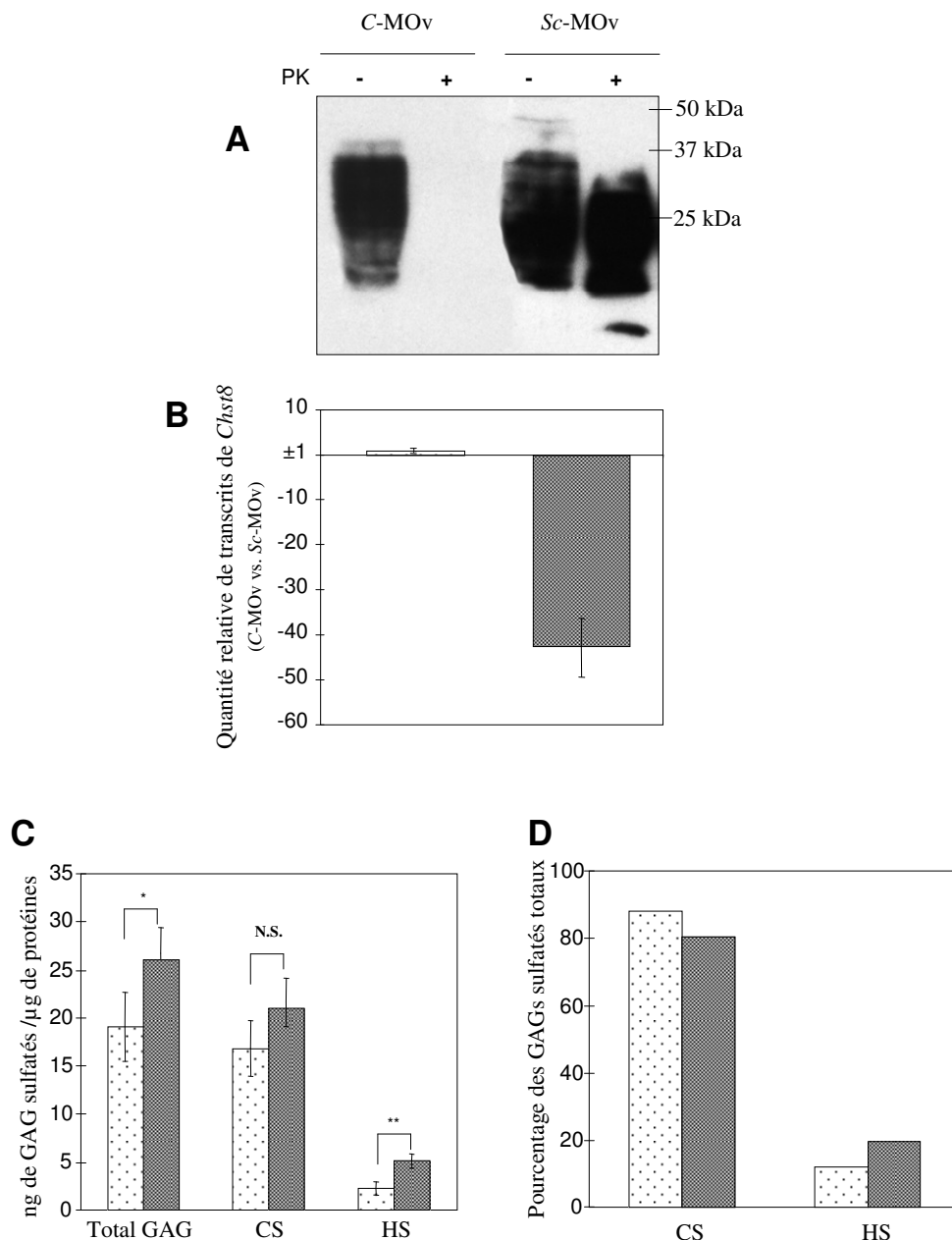


Figure 31 : Détection de la PrP^{Sc}, taux de transcrits de *Chst8* et quantités de GAGs sulfatés dans les cellules C-MOv, et Sc-MOv, 15 repiquages après inoculation. A. Détection de PrP^c et PrP^{Sc} par western blotting dans les cellules C-MOv et Sc-MOv. Les échantillons, correspondant à 25 μ g (échantillon non digéré PK) et 100 μ g (échantillon digéré PK) d'extraits cellulaires protéiques, ont été résolus dans un gel SDS-PAGE à 12%. La détection de la PrP a été réalisée à l'aide de l'anticorps SAF 84 (67 ng/mL). (-): non traité; (+): digéré à la PK. **B.** Quantification des taux de transcrits de *Chst8* dans les cellules C-MOv et Sc-MOv. La variation relative observée au niveau des quantités d'ARNm entre les cellules Sc-MOv et C-MOv a été mesurée en utilisant une sonde TaqMan et 60 ng de ADNc. Les valeurs représentent la moyenne de 9 mesures effectuées sur 3 cultures indépendantes. **C.** Quantification des GAGs sulfatés dans les cellules C-MOv (□) et Sc-MOv (■). Les mesures ont été réalisées en suivant le protocole décrit par Barbosa *et al.* (2003), sur trois cultures cellulaires indépendantes. La significativité des résultats a été déterminée par une analyse ANOVA (n=6, *:p \leq 0.05; **:p \leq 0.01; NS: non significatif). **D.** Pourcentage des CS et HS.

3. Conclusion

L'analyse de l'expression du gène *Chst8* dans des cellules MOv exprimant de façon chronique la PrP^{Sc} met en évidence une dérégulation tardive du gène, accompagnée de modifications de la composition en GAGs sulfatés de la MEC. Ces résultats confirment un lien entre la dérégulation de *Chst8* et la composition de la MEC.

Comparés aux résultats obtenus sur la lignée GT1 exprimant la PrP^{Sc} de façon chronique (Barret *et al.*, 2005), dans laquelle *Chst8* est sous exprimé d'un facteur 17, ces résultats sont logiques.

Cependant, nos premières analyses ont mis une évidence une dérégulation précoce du gène *Chst8* au cours du processus de conversion, avec un retour à des valeurs de base après cinq repiquages. Pourquoi l'expression *Chst8* est-elle de nouveau dérégulée après quinze repiquages ? Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est la suivante : l'accumulation de fortes quantités de PrP^{Sc} dans les cellules, après un grand nombre de passages pourrait s'accompagner d'une forte proportion de formes infectieuses libres dans le milieu, mais également dans les différents compartiments cellulaires. Ainsi, une partie de la PrP^{Sc} endogène nouvellement formée jouerait le même rôle que la PrP^{Sc} exogène apportée par l'inoculum, provoquant à nouveau la dérégulation de *Chst8*. Afin d'étayer cette hypothèse, une analyse de l'expression du gène à des repiquages intermédiaires est nécessaire. Elle renseignerait quant au moment précis auquel se produit cette nouvelle dérégulation. Une analyse parallèle de l'accumulation de PrP^{Sc} dans les cellules, mais surtout sa présence dans le milieu de culture ainsi que dans différents compartiments de la cellule, permettrait également de corroborer cette théorie. Enfin, une analyse précise de la composition des GAGs sulfatés permettrait quant à elle de mieux comprendre le rôle de la MEC dans le processus d'expression chronique de PrP^{Sc}.

**Chapitre II : Analyse de l'impact de la modulation de l'expression
du gène *Chst8* sur la transconformation de la PrP : création et
caractérisation préliminaire de nouvelles lignées cellulaires.**

Les résultats décrits dans le chapitre I suggèrent une implication de la matrice extracellulaire dans le processus de conversion de la PrP^c en PrP^{res}. En effet, les gènes impliqués dans le métabolisme et la sulfatation des GAGs, composants majeurs de la MEC, subissent des modifications de leur expression associées à l'apparition de la PrP^{res}. En particulier, les analyses réalisées sur la lignée MOv suggèrent une implication précoce du gène *Chst8*, qui subit une dérégulation dès le contact avec la protéine infectieuse. Afin d'étudier plus précisément son rôle dans l'apparition de la PrP^{Sc}, des lignées cellulaires MOv qui sous-expriment de façon stable le gène *Chst8* ont été créées par l'utilisation d'un système rétroviral. Ce système a permis d'insérer de façon stable dans le génome des cellules, une séquence d'ADN codant un ARNsh spécifique de *Chst8*. Les premières analyses ont porté sur la sélection des clones et la caractérisation des nouvelles lignées, et mettent en évidence une modification de la quantité de GAGs dans les cellules, ainsi que des perturbations métaboliques qui se traduisent par une morphologie différente, une vitesse d'adhérence altérée, et des caractéristiques de la protéine prion modifiées. Cependant, ce travail reste à approfondir afin de déterminer l'action précise de *Chst8* envers les GAGs. Ces lignées pourront alors servir d'outil pour étudier l'impact de l'expression du gène *Chst8* sur la vitesse de conversion de la PrP.

I- Matériel et Méthodes

1. Modèles biologiques

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour cette partie du travail. Il s'agit de la lignée MOv, déjà décrite dans l'article précédent, et de la lignée HEK 293T. Cette lignée correspond à des cellules embryonnaires rénales humaines (HEK : Human Embryonic Kidney) modifiées afin d'exprimer l'antigène T du virus SV (Simian Virus) 40. La présence de cet antigène permet à ces cellules de répliquer un ADN viral avec une bonne efficacité (Patel et Tikoo 2006). Ces cellules, fournies par E. Julien (Institut de Génétique Moléculaire, UMR 5535 / IFR 122 CNRS Montpellier) sont cultivées à 37°C (5% CO₂ ; 95 % d'humidité) dans un milieu DMEM (Sigma) supplémenté de SVF (Hyclone) 10% (v/v), de Pénicilline / Streptomycine (5.10⁻² mg/mL final) et de L-Glutamine (2mM final).

2. Création de lignées MOv sous-exprimant le gène *Chst8*

a. Choix de la séquence cible et insertion dans le vecteur

La séquence cible du gène *Chst8* a été choisie en utilisant la banque de données disponible sur le site <http://codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl>. Ce site répertorie ou recherche

une séquence nucléotidique capable d'éteindre spécifiquement un gène d'intérêt. Dans le cas du gène *Chst8*, une séquence cible 5'-GACTCGGATGGATGCTTTA-3' a été retenue car son efficacité avait déjà été testée. Un oligonucléotide, comprenant cette séquence répétée de manière palindromique autour d'une séquence permettant la formation d'une boucle et suivie d'une séquence de polyadénylation : 5'-GATCCG/GACTCGGATGGATGCTTTA/AAGTTCTCT/TAAAGCATCCATCCGAGTC/CTTTTTTACGCGTG-3' a été synthétisé. Cette séquence sous forme double-brin a été insérée dans le vecteur RNAi Ready pSIREN-RetroQ (Clontech). Après la transcription dans le système eucaryote hôte grâce à un promoteur de type pU6 spécifique de l'ARN polymérase, l'hybridation des deux séquences palindromiques permet la formation d'une épingle à cheveux, formant ainsi un ARNsh (small hairpin). Celui-ci se comporte comme une molécule d'ARNsi capable de porter l'information de l'extinction spécifique d'un gène. Le vecteur utilisé possède un gène de résistance à la puromycine comme marqueur de sélection.

b. Synthèse des rétrovirus

La synthèse des particules virales a été effectuée dans la lignée HEK 293T. Les cellules sont cotransfectées avec trois plasmides : le vecteur RNAi Ready pSIREN-RetroQ contenant la séquence cible de *Chst8*, et les plasmides p182, codant les gènes *gag* et *env* (responsables de l'encapsidation), et p183 codant le gène *pol* (polymérase). Une solution contenant 3 µg de plasmide d'intérêt, 1 µg de plasmide p182 et 1 µg de plasmide p183 dans 250 µL de NaCl (150 mM) est réalisée et incubée 20 minutes à température ambiante avec une seconde solution de 250 µL de NaCl (150 mM) contenant l'agent transfectant : le Jet-Perm™ (3 µL / µg d'ADN). Ce mélange est ensuite dilué avec 5 mL de milieu de culture complet préparé puis mis au contact de cellules HEK 293T à 80% de confluence dans des boîtes de cultures de 10 cm de diamètre. Après 4h d'incubation à 37°C le surnageant de culture est éliminé et remplacé par 10 mL de milieu de culture frais. Afin d'augmenter l'efficacité de la production virale, une seconde transfection identique est réalisée 24h plus tard. Après 48 heures de production des particules virales, le surnageant est récupéré, filtré, fractionné en aliquotes de 2mL et stocké à -80°C.

c. Infection de la lignée MOv

Le milieu de culture contenant les particules virales est décongelé et homogénéisé dans un volume final de 5 mL de milieu complet, contenant 4 µL de polybrene® (1,5-diméthyl-1,5-diazaundecaméthylène polyméthobromide, hexadiméthrine bromide), molécule

neutralisant la répulsion due aux charges entre le virion et les acides sialiques de la membrane cellulaire (Davis *et al.*, 2004). Les cellules MOv à 80% de confluence en boîte de culture de 10 cm de diamètre sont mises en contact avec ce milieu d'infection pendant 12h, à l'issue desquelles le milieu est éliminé et remplacé par 10 mL de milieu frais. Après 24h, la sélection par la puromycine (10 µg/ mL) débute afin d'isoler les cellules infectées par le rétrovirus. Ces cellules forment des clones qui sont isolés en plaques 12 puits dans un premier temps, puis mis en culture dans des boîtes de 10 cm de diamètre. La pression de sélection est maintenue jusqu'à ce que les clones soient caractérisés.

3. Caractérisation des clones obtenus

a. Analyses biochimiques et moléculaires

Une première analyse des clones obtenus a consisté en la mesure de la quantité relative de transcrits de *Chst8*, la mesure de la quantité de GAGs sulfatés, la détection de la protéine prion dans ces cellules et la détermination de la résistance à la PK ou non. Les protocoles correspondant à ces travaux ont été préalablement décrits dans le chapitre I. Enfin, les différences phénotypiques qui existent entre les clones ont été observées.

b. Analyse phénotypiques

Afin d'évaluer les différences phénotypiques entre les différents clones sélectionnés, ceux-ci ont étéensemencés à densité égale (200 000 cellules viables par flasque de 25 cm²). Des clichés photographiques ont été réalisés aux temps T= 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h et 168h à l'aide d'un microscope inversé Olympus IMT-2, grossissement $\times 100$. La longueur des axones a été mesurée (en nombre de pixels) aux temps t=48h à l'aide du logiciel Photoshop CS3 extended (Adobe) sur 15 cellules. Leur longueur relative a été déterminée par rapport à la moyenne des longueurs des axones témoins, arbitrairement établie à 1. Le dénombrement des neurites a été réalisé sur 20 cellules. Une analyse statistique de type ANOVA permet de confirmer ou non la significativité des résultats observés.

II- Résultats

1. Sélection des clones sous exprimant le gène *Chst8*

L'infection rétrovirale de cellules MOv dans le but d'insérer la séquence codant un ARNsh spécifique de *Chst8*, sous la dépendance d'un promoteur rétroviral humain de type U6, a permis de sélectionner 12 clones, après traitement par la puromycine.

Afin d'évaluer l'effet de l'insertion dans le génome de la séquence codant l'ARNsh, la quantité de transcrits de *Chst8* a été mesurée, deux repiquages après l'isolement des clones (figure 32). Les 12 clones testés ont une expression du gène *Chst8* dérégulée vers la sous-expression, ce qui confirme l'efficacité de la séquence codant l'ARNsh. De plus, les 12 clones ne présentent pas des niveaux équivalents de sous expression : celle-ci s'étend d'un facteur -16 ± 1.86 pour le clone 12 à -267 ± 28 pour le clone 5, les autres clones ayant des valeurs de sous expression intermédiaires.

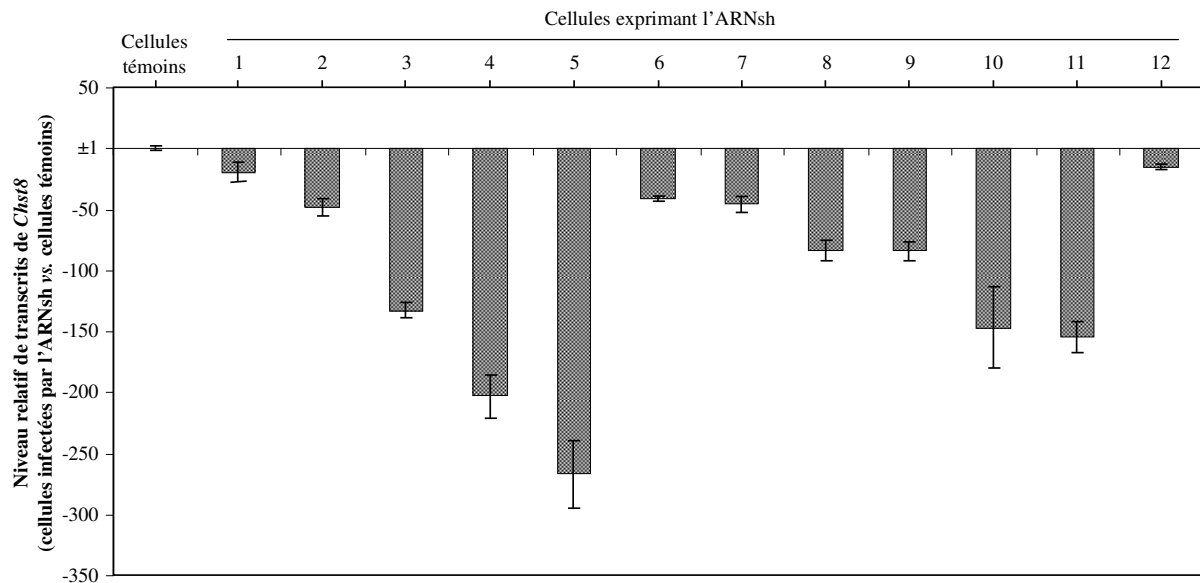


Figure 32 : Expression relative du gène *Chst8* dans les cellules exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8*.

Les mesures du taux d'expression relatif du gène *Chst8* ont été réalisées sur les différents clones deux repiquages après l'isolement des clones, et les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène *Tbp* (Milhiet *et al.*, 1998).

Parmi les 12 clones, cinq (clones 1 à 5) ont été sélectionnés pour leur niveau de sous-expression croissant de *Chst8*. La stabilité de ces clones a été testée au cours de 20 repiquages successifs réalisés sans pression de sélection. Dès le cinquième repiquage, la sous-expression du gène se stabilise (table 11). L'écart-type important observé pour le clone 4 est lié au fait que le gène est si peu exprimé que le niveau de fluorescence de la sonde se situe au seuil de détection de l'appareil utilisé.

Tableau 11 : Expression relative du gène *Chst8* dans les clones MOv après cinq repiquages

Clones	Expression relative de <i>Chst8</i>
1	-2,76 ± 0,35
2	-282 ± 91
3	-651 ± 99
4	-998 ± 664
5	-104,62 ± 29,19

2. Impact de la sous-expression de *Chst8* sur les GAGs

Afin d'étudier les caractéristiques des cellules obtenues, et surtout l'impact de la sous-expression du gène *Chst8* sur la quantité de GAGs sulfatés dans les cellules, leur quantité et en particulier celle des chondroïtines présentes a été mesurée (figure 33A). Les clones 1 et 4 montrent des quantités de GAGs sulfatés équivalentes à celle présentes dans les cellules témoins. Les clones 2, 3 et 5 présentent des quantités de GAGs significativement réduites de facteurs 1,9, 4,2 et 1,75 respectivement.

3. Impact de la sous-expression de *Chst8* sur la protéine prion

Au vu du lien fort déjà décrit entre la protéine prion et les GAGs, en particulier les chondroïtines sulfate, l'impact de la sous-expression de *Chst8* sur la protéine prion a été observé en analysant son profil électrophorétique (figure 33C). Si les clones 1 et 3 ne montrent pas de modifications marquées du profil électrophorétique de la PrP, l'intensité du signal, calculée par densitométrie et normalisée par TffId, est beaucoup plus faible que dans les cellules témoins (tableau 12). Les clones 2, 4 et 5 présentent quant à eux des profils très différents de ceux observés pour les cellules témoins, donnée confirmée par l'analyse densitométrique portant sur le pourcentage de différentes glycoformes (tableau 13). De plus, les intensités des signaux dans les clones 2 et 4 sont très faibles puisqu'elles ne représentent respectivement que 5,3% et 25,5% de l'intensité du témoin. Ces deux clones possèdent une proportion de forme bi-glycosylée supérieure à celle des témoins (tableau 13). Enfin, le clone 5 possède une répartition des différentes glycoformes différente de celle des cellules témoins avec une forme non-glycosylée fortement majoritaire (51,8%) et une forme mono-glycosylée moins représentée (31,2%).

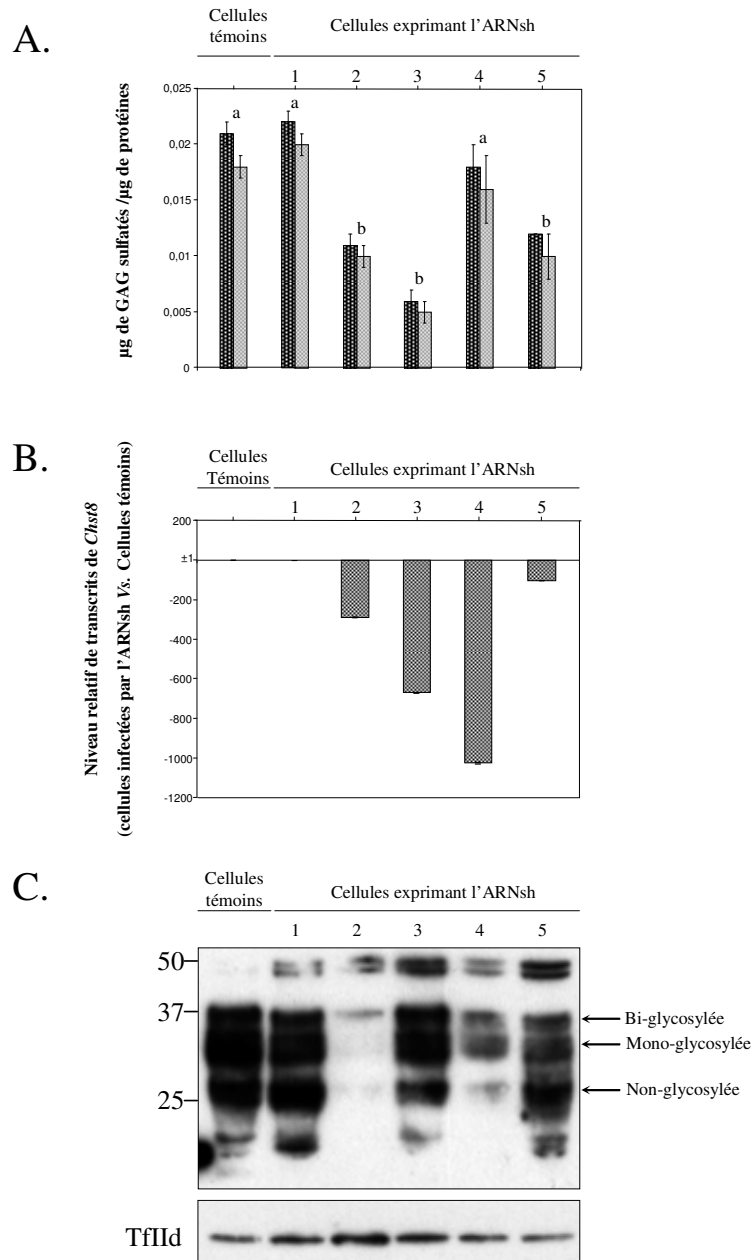


Figure 33 : Caractérisation préliminaire des cellules MOv exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8*.

A : Quantification des GAGs sulfatés totaux (▨) et des chondroïtines sulfatées (▩) dans les 5 clones de cellules MOv exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8*. Les lettres a et b correspondent à des populations statistiquement différentes au risque de 0,05. B : Taux relatif de transcrits de *Chst8* dans les cellules MOv. C : Immunodétection de la protéine prion sur un lysat de 25µg de protéines totales. La protéine prion est détectée par l'anticorps SAF84 (SPIbio), TffII par un anticorps Sc-204 (Santa-Cruz Biotechnologies Inc).

Toutes les analyses présentées ont été effectuées au 13^{ème} repiquage.

Tableau 12 : Intensité relative du signal PrP dans les différents clones exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8*

Population cellulaire	Témoins	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5
Intensité du signal (%)	100	36,2	5,3	42,3	25,5	68

Tableau 13 : Distribution des différentes glycoformes de la PrP dans les cellules exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8*.

Glycoforme	Témoins	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5
Bi-glycosylée	19,2 %	19,5 %	35,5 %	23,9 %	29,8 %	17 %
Mono-glycosylée	43,4 %	38,1 %	42,5 %	47,5 %	51,6 %	31,2 %
Non-glycosylée	37,4 %	42,4 %	22 %	28,6 %	18,5 %	51,8 %

4. Impact de la sous expression de *Chst8* sur la morphologie des cellules MOv

Afin de visualiser l'effet de la sous-expression de *Chst8* sur la morphologie des cellules MOv, les différents clones de cellules MOv sous exprimant *Chst8* ont été cultivés dans les mêmes conditions, et des clichés photographiques ont été réalisés à différents temps de la croissance : 12h, 24h, 48h, 72h et 96h après ensemencement.

Les clichés (figure 34) montrent que la durée de la phase d'adhérence des cellules MOv est modifiée quand l'expression du gène *Chst8* est altérée. Chaque clone présente une proportion de cellules adhérentes très supérieure à la population contrôle 12h après l'ensemencement (tableau 15).

Tableau 14 : Proportion de cellules adhérentes 12 heures après ensemencement.

Cellules	Témoins	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5
Cellules adhérentes (en %)	38	87	77	81	82	83

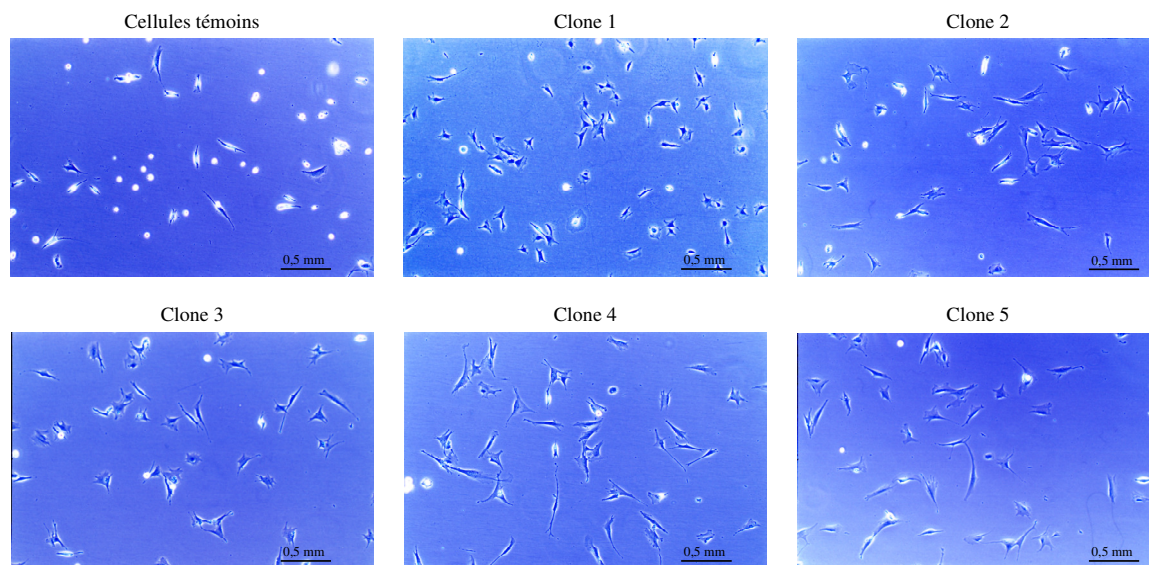


Figure 34 : Photographie optique des cellules MOv 12h après ensemencement.

Les cellules MOv adhérentes se caractérisent par une coloration bleue foncée, et une forme étoilée due à la présence de neurites. Les cellules non encore adhérentes ne présentent pas la même réfringence et sont donc blanches, et sont dépourvues de neurites. Grossissement $\times 10$. L'inoculum est réalisé avec 200 000 cellules viables pour chaque population

Ces différences importantes de la vitesse d'adhérence cellulaire suggèrent des changements physiologiques importants des cellules. Afin de confirmer ces variations, une analyse de la morphologie des cellules (longueur des axones et nombres de neurites, deux caractéristiques importantes des cellules neuronales) a été réalisée 48 heures après ensemencement, temps pour lequel les cellules sont très peu confluentes, mais suffisamment adhérentes pour permettre des mesures précises et de confiance (figure 34). Le nombre, la morphologie et la localisation des dendrites, permettent de différencier différentes familles de neurones (Tritsch *et al.*, 1998). La mesure de la longueur relative des axones met en évidence que les clones 1, 2 et 5 subissent des variations significatives ($p \leq 0,001$), comparativement aux cellules témoins. Les clones 3 et 4 ne présentent quant à eux pas de différence significative (figure 36 A).

Le dénombrement du nombre de neurites met lui aussi en évidence des modifications profondes de la physiologie des cellules MOv, lorsqu'elles expriment l'ARNsh spécifique de *Chst8*. En effet, une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du nombre de neurites est observée pour les cinq clones sous-exprimant *Chst8* (figure 36 B). Ceci retient sur la forme des cellules : si les cellules témoins ont un corps cellulaire souvent triangulaire avec une axone et deux dendrites, les cellules exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8* ont quant à elle une morphologie très différente : les cellules du clone 1 ont une morphologie proche de celle du témoin, mais avec des neurites plus nombreuses, et parfois un corps cellulaire étoilé ; les

cellules du clone 2 présentent une grande hétérogénéité au niveau de la morphologie du corps cellulaire, qui ne présente pas de forme prédominante, tout comme les cellules des clones 4 et 5 ; les cellules du clone 3 ont un corps cellulaire très allongé (figure 35).

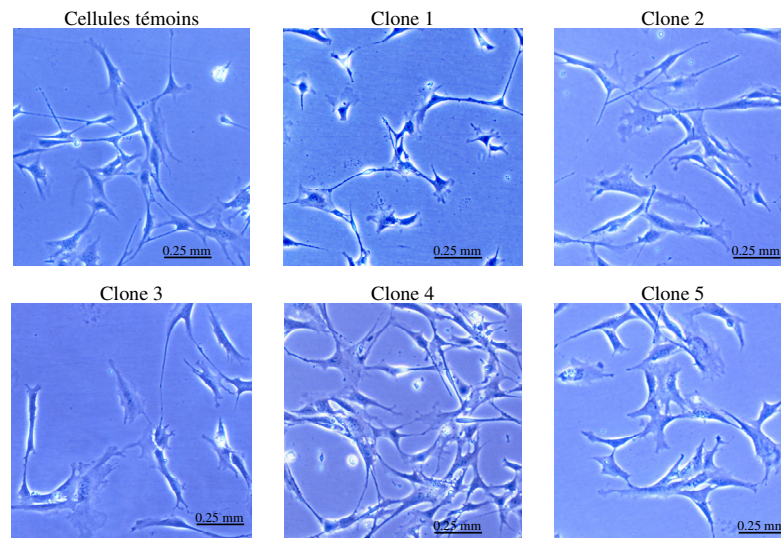


Figure 35 : Aspect morphologique des cellules MOv 48 heures après ensemencement. (Grossissement x10)

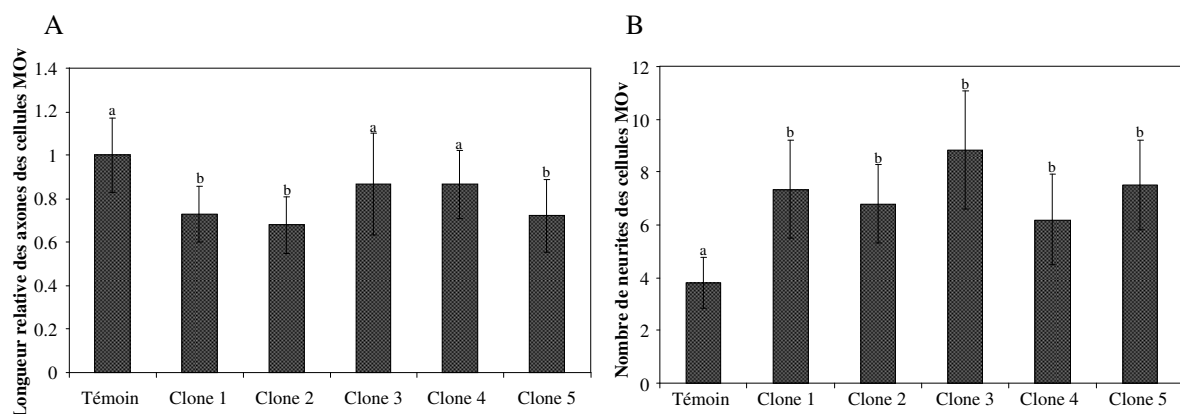


Figure 36 : Caractéristiques morphologiques des cellules MOv 48 heures après ensemencement.

A : Longueur relative des axones des cellules MOv. La significativité des différences observées entre les clones exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8* et les cellules témoins a été déterminée par une ANOVA n=90). B : Nombre de neurites des cellules MOv. La significativité des différences observées entre les différentes populations a été déterminée par une ANOVA (n=120). Les lettres a et b correspondent à des populations statistiquement différentes au risque de 0,001.

Enfin, des clichés des cellules à confluence (figure 37) montrent premièrement que celle-ci est atteinte à des temps différents : 120 h pour le clone témoin, 144 h pour les clones 1 et 2, 168h pour les clones 3, 4, et 5 ; deuxièmement que l'organisation des cellules à confluence est différente selon les clones considérés. En effet, les cellules témoins sont organisées en faisceaux directionnels bien ordonnés. Au contraire, les cellules issues des

clones 1, 3, et 4 exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8* ont une disposition beaucoup plus anarchique, sans organisation en faisceau directionnels apparente. Seuls les clones 2 et 5 présentent des pseudo-faisceaux.

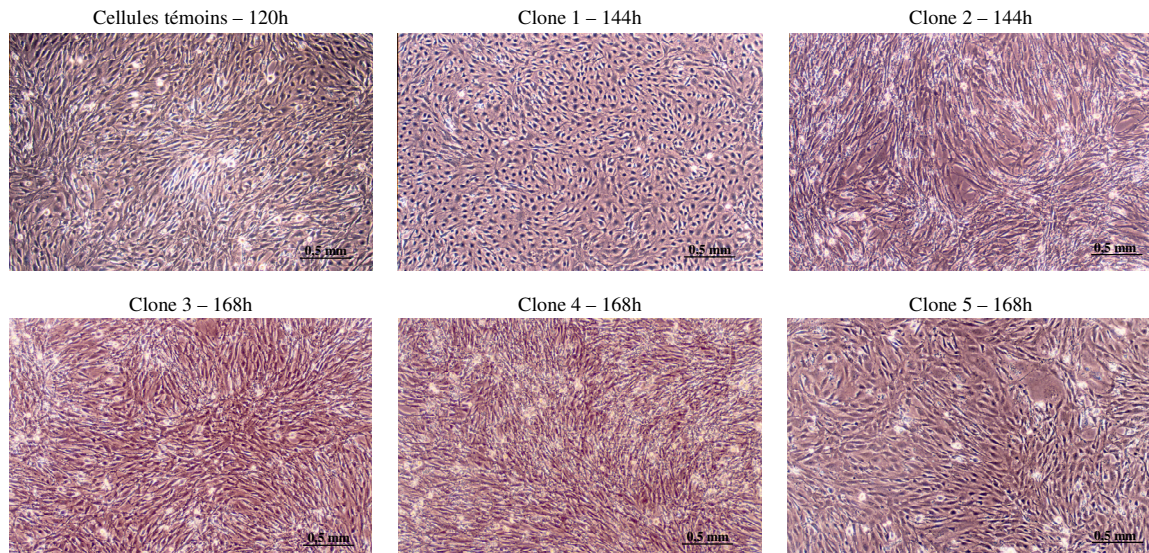


Figure 37 : Morphologie des cellules MOv à confluence. (Grossissement x10)

III- Discussion

De nombreuses études, ainsi que les travaux présentés dans le chapitre I, suggèrent que la composition de la matrice extra-cellulaire (MEC), en particulier les glycosaminoglycannes et leur sulfatation, sont associés au processus de conversion de la protéine prion (Barret *et al.*, 2005 ; Ben-Zaken *et al.*, 2003 ; Caughey *et al.*, 2006 ; Horonchik *et al.*, 2005 ; Ouidja *et al.*, 2007 ; Schonberger *et al.*, 2003) et pourraient, de ce fait, constituer les cofacteurs nécessaires à la stabilisation de la PrP^c (Caughey *et al.*, 2006). En effet, la conformation de l'isoforme PrP^{Sc} est thermodynamiquement plus stable que celle de la PrP^c (Baskakov *et al.*, 2001). L'existence supposée d'un code de sulfatation (Habuchi *et al.*, 2004), associé aux GAGs, ainsi que la dérégulation précoce du gène *Chst8* dans les cellules MOv exprimant la PrP^{res} pourrait perturber l'équilibre de liaison de la PrP aux GAGs que certains auteurs supposent liés à la conformation de la PrP (Yin *et al.*, 2007). Ces données nous ont conduits à créer des lignées cellulaires MOv dont l'expression du gène *Chst8* est modulée, permettant ainsi d'étudier l'impact de la dérégulation du gène *Chst8* sur la conformation de la protéine prion.

Dans le but de reproduire les phénomènes observés (sous-expression du gène *Chst8*) dans des cellules inoculées avec la souche naturelle de prion 127S, les cellules ont été génétiquement modifiées par insertion stable dans le génome d'une séquence codant un

ARNsh capable de produire des ARNsi spécifiques du gène cible. Le choix de l'insertion stable de la séquence d'ARNsh par une infection rétrovirale a été dicté par la nécessité d'obtenir des clones homogènes et stables dans le temps pour pouvoir procéder à des contacts avec un agent provoquant la conversion de la PrP. Contrairement à l'inactivation par « knocking-out », l'extinction de l'expression d'un gène par des ARNsi est incomplète et atteint au mieux 80 à 90 % d'inhibition du gène cible (Reynolds *et al.*, 2004 ; Shi 2003 ; Song *et al.*, 2008). Cette caractéristique est un avantage dans de nombreuses situations, puisqu'elle permet de s'affranchir de la létalité que peut entraîner une extinction complète d'un gène. Ceci est d'autant plus applicable à la situation présente car des programmes d'inactivation de gènes codant des sulfotransférases ont abouti à une létalité du modèle affecté (Bullock *et al.*, 1998 ; Habuchi *et al.*, 2004). De plus, l'efficacité aléatoire des ARNsi a permis d'obtenir des clones de cellules MOv dont le niveau d'extinction du gène cible est différent.

Les cinq clones sélectionnés ont des niveaux de sous expression du gène *Chst8* variables (facteurs -2 à -1000) entre eux, mais stables pendant au moins 20 repiquages sans pression de sélection, ce qui est une caractéristique importante pour un outil d'étude : la molécule de sélection n'interagira pas avec l'inoculum, et les variations d'expression observées ne pourront être imputées qu'à la présence de la PrP^{Sc}.

L'étude préliminaire de ces différents clones a mis en évidence des perturbations importantes au niveau moléculaire et biochimique, mais aussi phénotypique. Tout d'abord, les résultats obtenus montrent que le produit du gène *Chst8* semble avoir une action (directe ou indirecte) envers les chondroïtines, puisque leur quantité est affectée par sa sous-expression. Ceci est en accord avec les travaux de Xia *et al* (2000) qui avaient montré qu'une forme tronquée de l'enzyme humaine pouvait exercer une activité sulfotransférase envers les chondroïtines, et ce dans le milieu extracellulaire. De plus, les travaux de Barret *et al* (2005) avaient mis en évidence la présence d'une forme non-golgienne chez la souris. Cependant, les résultats présentés ici montrent qu'il n'y a pas de proportionnalité entre le facteur de sous expression de *Chst8* et la quantité de chondroïtines sulfates mesurée. Ceci peut être imputé au fait qu'il existe d'autres enzymes dévolues à la sulfatation des chondroïtines : les chondroïtine-4- et 6-sulfotransférases (C4ST-1 et C6ST-1) catalysent également le transfert d'un groupement sulfate sur les positions 4 et 6 respectivement des résidus GalNAc des chaînes de chondroïtines (Honke et Taniguchi 2002 ; Mizumoto *et al.*, 2009 ; Silbert et Sugumaran 2002). Dans le clone 4, où le gène *Chst8* présente un degré d'inhibition très fort, les autres chondroïtines sulfotransférases prennent probablement un relais, expliquant une

quantité de GAGs sulfatés significativement mais faiblement moins présents que dans le contrôle. De plus, la technique de quantification utilisée ne permet pas discriminer les CS-4 des CS-6, ni ne permet de déterminer si la modification observée est due à une diminution globale de la sulfatation, ou bien à une diminution de la quantité de GAGs de sulfatation égale.

La modulation de l'expression du gène *Chst8* modifie le profil électrophorétique de la PrP. En effet, à la fois la répartition des différents glycoformes, et l'intensité du signal sont altérées. De telles modifications ont déjà été rapportées dans le modèle cellulaire bipolaire de différenciation neuronale 1C11 (Ermonval *et al.*, 2009). Les cellules différenciées dans une voie noradrénergique présentent un glissement du profil vers des poids moléculaires plus importants, avec une prédominance de formes bi-glycosylées. Ces changements au niveau du profil sont associés à des modifications de l'expression du glycométabolisme, en particulier des gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs, dont *Chst8* qui est surexprimé d'un facteur 300 dans les cellules différenciées dans la voie noradrénergique. De plus, la modification du profil est la plus importante dans la fraction de la PrP présente au sein des rafts, donc en contact avec la MEC. Nos résultats, en association avec ceux d'Ermonval *et al.* (2009), constituent une preuve supplémentaire de l'implication des GAGs sulfatés de la MEC dans le métabolisme de la protéine prion.

Les travaux de Macé *et al.* (2002) mettent en évidence un rôle des chondroïtines sulfates (CS) et des kératanes sulfates (KS) dans la migration, l'adhésion et la croissance des cellules neuronales chez le rat (Mace *et al.*, 2002). En particulier, une surexpression de l'enzyme C6ST-1 facilite la migration des cellules de Schwann au cours de la croissance axonale (Liu *et al.*, 2006). Au contraire, chez le poisson-zèbre, l'extinction du gène codant l'enzyme C4ST-1 provoque quant à elle des défauts au niveau de la formation des somites, ainsi que des axones anormalement ramifiées, et mal positionnées (Mizumoto *et al.*, 2009). En effet, les GAGs sulfatés, en particulier les CS, sont des molécules régulatrices de la plasticité, du guidage des axones et de la croissance neuronale au cours du développement et de la régénération (Oohira *et al.*, 2000b ; Snow *et al.*, 1990b). De plus, les CS et les KS promeuvent non seulement l'adhésion de cellules neuronales sur un substratum, mais aussi l'élongation des neurites (Oohira *et al.*, 2000a). Nos résultats sont en accord avec ces données faisant état de modifications du métabolisme des CS se répercutant sur la morphologie, l'adhésion, la taille et la croissance des cellules. Ainsi, nos observations sur les clones de cellules MOv exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8* corroborent notre hypothèse selon laquelle *Chst8* est impliqué dans le métabolisme des CS.

IV- Conclusion

Les résultats obtenus en provoquant une expression faible du gène *Chst8* dans les cellules MOv mettent indirectement en évidence l'implication du produit de ce gène, la Galnac4st-1 dans le métabolisme des GAGs. Si de nombreux éléments plaident en faveur d'une action sur la sulfatation des chaînes de CS, aucune preuve formelle n'a été apportée à ce sujet. Seule une étude fine et précise de la composition des chaînes de GAG permettra de faire la lumière sur la répartition des groupements sulfate, et donc de déterminer avec certitude l'activité de cette enzyme vis-à-vis des CS.

Que l'implication de l'expression du gène *Chst8* sur le métabolisme des GAGs soit directe ou indirecte, la modulation de son expression affecte la morphologie des cellules MOv, mais aussi leur physiologie, puisque le métabolisme de la protéine prion est altéré. Ceci suggère que ces cellules pourraient constituer de nouveaux outils d'études de la conversion de la PrP, puisqu'elles permettront d'aborder le côté mécanistique de cet évènement, décrit comme la clef des ESST.

Dans cette optique, la caractérisation approfondie de ces cellules est en cours. L'étude du nombre de copies ainsi que du lieu d'insertion de la séquence codant l'ARNsh spécifique de *Chst8* devrait permettre d'expliquer les différences observées entre les différents clones, tant au niveau du niveau d'expression du gène cible qu'au niveau des quantités de GAGs. Enfin, l'observation en microscopie confocale des chondroïtines sulfatées en position 4 permettra de déterminer la sous-localisation des GAGs les plus affectés par la sous expression de *Chst8*.

Chapitre III: travaux parallèles:

Modifications de l'expression du glycotranscriptome au cours de la différenciation neuronale.

In vivo, les maladies à prion se caractérisent par une neuro dégénérescence induite par l'accumulation de l'isoforme « scrapie » de la protéine prion, riche en feuillets β . Les analyses présentées précédemment dans ce manuscrit ainsi que les travaux de Barret *et al.* (2005) et de Guillaume-Bosselut *et al.* (2009) mettent en évidence des altérations de la machinerie de la glycosylation liées à la présence de la PrP^{Sc} dans des modèles d'étude de la conversion PrP^c / PrP^{Sc}. En particulier, des modifications de l'expression des gènes liés au métabolisme des GAGs et des ganagliosides sont rapportées.

Pendant ma thèse, j'ai également participé à des travaux portant sur l'analyse de l'expression du glycogénome au cours de la différenciation neuronale dans le modèle bipolaire de différenciation 1C11. Les cellules 1C11 dites « précurseurs » ont la capacité de se différencier soit dans une voie sérotoninergique (1C11^{5-HT}) sous l'action du dibutyril AMP cyclique (d-AMPC), soit dans une voie noradrénergique (1C11^{NE}) sous l'action conjointe du d-AMPC et de DMSO. L'immunodétection de la protéine PrP^c met en évidence des variations des profils électrophorétiques au cours de la différenciation, ce qui suggère des modifications de la machinerie de glycosylation. Des analyses comparées du glyco-transcriptome mettent en évidence que 44 gènes sur les 375 analysés voient leur expression modifiée. Parmi ces 44 gènes, 9 sont liés au métabolisme des GAGs, ce qui est en adéquation avec l'implication de ces glycoconjugués dans le développement et la plasticité neuronale. De manière intéressante, le gène *Chst8* subit, dans ce processus de différenciation, des variations d'une amplitude importante (surexprimé 300 fois dans la lignée 1C11^{NE}), et l'ensemble des modifications observées au niveau transcriptomique sur les 9 gènes liés aux GAGs se traduit par des modifications des quantités de GAGs sulfatés dans les cellules.

Ce travail, issu d'une collaboration entre l'institut Pasteur et l'UMR1061-INRA, a fait l'objet d'une publication dans le *Glycoconjugate journal*.

Conclusion générale et perspectives

L'analyse *in vitro* (cellules MOv) des modifications de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs, lors du processus de conversion de la PrP^C en PrP^{res} met en évidence qu'une majorité d'entre eux sont affectés. Ces modifications d'expression sont observées dès le contact des cellules avec les deux agents inducteurs utilisés : la protéine prion d'origine naturelle (souche de prion 127S) ou la protéine prion synthétique sous deux conformations, correspondant à une isoforme riche en hélices α , ou riche en brins β .

Indépendamment de l'origine et de la structure de la protéine prion inductrice, l'apparition de la PrP^{res} est observée et elle s'accompagne de modifications spécifiques de l'expression du gène *Chst8*. Une diminution de la quantité de transcrits du gène est observée lorsque l'inducteur est la souche naturelle de prion. Par contre, quand la protéine prion recombinante induit la conversion, une augmentation de la quantité de transcrits est observée, indépendamment de la conformation de la PrP utilisée.

La formation de la PrP^{res} est un phénomène biphasique avec une première phase d'apparition de la PrP^{res} observée pour les deux conformations α et β de la PrP inductrice. Lors de cette étape, les modifications d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs sont identiques pour les deux types structuraux d'inducteurs. La seconde phase correspond à l'expression chronique de la PrP^{res} et n'est observée qu'avec la PrP sous conformation β . Cette phase est associée à l'expression différentielle de six gènes, impliqués dans la synthèse (*Has3*) et la dégradation (*Hyal3*) de l'acide hyaluronique, véritable composant architectural de la MEC, mais aussi dans la sulfatation des chaînes de chondroïtine (*Chst4*, *Chst7*), de kératane (*Chst4*, *Chst5*), et d'héparane (*Hs3st3a1*). Il est à noter que les gènes impliqués dans la 4-O sulfatation des chaînes de GAGs (en particulier *Chst8*) semblent associés à la phase de conversion de PrP^{res}, indépendamment de la structure de la PrP exogène. Au contraire, les gènes responsables de la 6-O sulfatation (*Chst4*, *Chst5*, *Chst7*) semblent impliqués dans l'expression chronique de la PrP^{res}. Cette observation étaye l'hypothèse de l'existence d'un code de sulfatation, nécessaire au maintien d'un contexte physiologique de la cellule. Des modifications de ce code susciteraient des changements (en particulier électrostatiques liés à la sulfatation des chaînes de GAGs) au sein de l'environnement matriciel de la PrP et pourraient favoriser dans un cas le maintien de la forme PrP^{res}, dans l'autre un retour à une conformation cellulaire.

Bien que ces résultats confortent l'hypothèse de la protéine seule, selon laquelle une protéine peut interagir avec une autre protéine et lui imposer sa conformation (Prusiner 1982 ; Prusiner 1998), ils suggèrent également l'implication de cofacteurs moléculaires.

La souche 127S a été apportée par un extrait de cerveau qui constitue un ensemble complexe au sein duquel la PrP peut interagir avec de nombreuses molécules. Les GAGs sont des molécules candidates car ils constituent des récepteurs pour la PrP (Horonchik *et al.*, 2005), et peuvent la séquestrer, diminuant ainsi la probabilité de rencontre avec les récepteurs présents à la surface des cellules MOv. Les voies de signalisation induites par la liaison de la PrP à ses récepteurs pourraient en être altérées. L'élimination des GAGs de ces extraits de cerveau par des traitements enzymatiques (chondroïtinase, héparanase, hyaluronidase) permettrait de déterminer le rôle de ces composés sur l'intensité de la réponse induite au niveau de l'expression des gènes cibles. Cependant, à l'heure actuelle, si le nombre de molécules qui interagissent avec la PrP croît, leur rôle reste flou. Ainsi, des partenaires protéiques pourraient également influencer la réponse à l'inoculation. Les cofacteurs pourraient aussi être de nature oligonucléotidique : dans des cerveaux de souris atteintes de tremblante expérimentale, l'expression de miARN est dérégulée (Saba *et al.*, 2008) et la plupart semble cibler des facteurs de transcription. Ces petites molécules, très stables, pourraient jouer ce rôle de cofacteurs, et expliquer la différence d'expression observée entre les cellules inoculées par un extrait de cerveau, et celles ayant été en contact avec la PrP synthétique. Leur élimination par la RNase H dans l'extrait de cerveau utilisé comme inoculum pourrait permettre d'observer une réponse semblable à celle décrite dans les cellules traitées à l'aide de la PrP recombinante.

La relation de cause à effet entre les deux phénomènes étudiés, à savoir l'apparition de la PrP^{res} et la modulation de l'expression des gènes liés au métabolisme des GAGs, reste à préciser. La présence de la PrP exogène infectieuse provoque-t-elle les modifications d'expression des gènes, qui à leur tour vont modifier l'environnement et favoriser la conversion de la PrP ? Ou est-ce la conversion de la PrP endogène qui provoque des modifications du métabolisme de la cellule et influence l'expression des gènes liés au métabolisme des GAGs ? Des éléments de réponse à ces questions peuvent être apportés par différentes voies.

Tout d'abord, un protocole expérimental, similaire à celui développé dans ce manuscrit, mais appliqué à une lignée cellulaire murine dans laquelle le gène *Prnp* serait invalidé permettrait de déterminer le rôle potentiel de la PrP endogène dans la dérégulation

des gènes liés au métabolisme des GAGs. Si, au contact de ces cellules avec la protéine prion inductrice, la dérégulation des gènes est toujours observée, cela signifierait que ladite dérégulation pourrait être la résultante d'une cascade de signalisation induite par la liaison de la PrP exogène avec un récepteur présent à la surface de la cellule. Le récepteur à la laminine (LRP) peut se lier à la fois à la PrP^c et à la PrP^{Sc} : il est donc un bon candidat pour remplir ce rôle. L'utilisation de lignées cellulaires dont le gène codant le LRP est invalidé apporterait des renseignements précieux concernant la voie de signalisation à l'origine de la dérégulation des gènes liés au métabolisme des GAGs. Cette approche, bien qu'envisageable, semble compliquée à mettre en œuvre car il existe 6 copies du gène codant le LRP chez la souris (Jackers *et al.*, 1996). Une approche de sous-expression par l'intermédiaire de ARNsi spécifiques pourrait en revanche être réalisée (Chen *et al.*, 2009).

Une autre technique consiste à provoquer la dérégulation du gène d'intérêt (ici : *Chst8*) et à observer les effets d'une telle modification sur la conversion de la PrP^c en PrP^{res}. Cette approche, initiée dans ce travail, est en cours de développement. L'utilisation des lignées MOv dont l'expression de *Chst8* est diminuée par l'utilisation d'ARNsh spécifiques permettra d'évaluer les conséquences d'une probable hypo-sulfatation des CS présents dans la MEC. En effet, les premières analyses relatives à cette lignée mettent en évidence des modifications de la quantité de GAGs sulfatés, de la morphologie des cellules, mais aussi des caractéristiques moléculaires de la protéine prion. Ces données, qui suggèrent un lien entre l'expression du gène *Chst8* et la protéine prion, permettent de formuler l'hypothèse selon laquelle l'hypo-sulfatation des CS, conséquence de la sous-expression de *Chst8*, entrainerait une modification de l'environnement matriciel de la PrP, et la déstabiliserait. Des analyses de la vitesse de conversion de la PrP dans ce contexte permettraient idéalement de confirmer cette hypothèse.

Des modifications du fonctionnement de la machinerie de glycosylation ne sont pas seulement impliquées dans les phénomènes de neuro-dégénérescence induite par la conversion de la PrP. En effet, l'analyse du glycotranscriptome au cours de la différenciation neuronale met en évidence que la voie de différenciation bioaminergique empruntée par les cellules 1C11 influence l'expression des gènes liés à la glycosylation, et en particulier ceux liés au métabolisme des GAGs. Le gène *Chst8*, par exemple, n'est exprimé que dans les cellules 1C11^{NE}, c'est-à-dire différenciées dans la voie noradrénergique. D'autres gènes liés aux GAGs et à leur sulfatation présentent un niveau d'expression différent entre les cellules précurseur (1C11), les cellules 1C11^{5-HT} (différenciées dans la voie sérotoninergique) et

1C11^{NE}. C'est le cas de *Has1*, *Has2*, *Ust*, *Hs3st3a1*, *Chst3*, *Chst5*, *Extl1*. Ces modifications d'expression de gènes s'accompagnent de modifications de la composition en GAGs de la MEC, ainsi que de variations des profils électrophorétiques de la PrP qui reflètent des niveaux de complexité variables des *N*-glycanes qu'elle porte.

Ces résultats suggèrent une nouvelle fois l'implication du code de sulfatation, lié à la protéine prion cellulaire, dans un processus physiologique de différenciation neuronale.

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit souligne l'implication de la « machinerie » de glycosylation, en particulier des GAGs présents dans la MEC, dans des processus neuronaux physiologiques et pathologiques. Ainsi, l'existence d'un code de sulfatation des GAGs est de plus en plus probable, puisque des modifications de l'expression des gènes impliqués dans l'élaboration du profil de sulfatation ont un impact important sur le développement de pathologies neurodégénératives, mais aussi sur les phénomènes de différenciation neurale.

De plus, l'implication des GAGs dans le processus de conversion et d'accumulation de la PrP^{res}, mais également dans d'autres maladies conformationnelles neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, et surtout la maladie d'Alzheimer dont le développement est lié à la PrP^c, ouvrent de nouveaux champs thérapeutiques. En effet, en agissant sur le métabolisme et la sulfatation des GAGs, ou en utilisant des composés chimiques analogues aux GAGs, l'agrégation des protéines incriminées (PrP, α -synucléine, peptide β -amyloïde, protéine τ) pourrait être retardée, et la dégradation des complexes amyloïdes facilitée.

Références bibliographiques

- Abid, K. et Soto, C. (2006). "The intriguing prion disorders." *Cell Mol Life Sci* **63**(19-20): 2342-2351
- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kascsak, R., Rubenstein, R. et Grossman, A. (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., Baumann, F. et Bremer, J. (2008). "The prion's elusive reason for being." *Annu Rev Neurosci* **31**(439-477)
- Aguzzi, A. et Heikenwalder, M. (2006). "Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook." *Nat Rev Microbiol* **4**(10): 765-775
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M. et Polymenidou, M. (2007). "Insights into prion strains and neurotoxicity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 552-561
- Aguzzi, A. et Polymenidou, M. (2004). "Mammalian prion biology: one century of evolving concepts." *Cell* **116**(2): 313-327
- Aguzzi, A. et Weissmann, C. (1997). "Prion research: the next frontiers." *Nature* **389**(6653): 795-798
- Aigner, T. et McKenna, L. (2002). "Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage." *Cell Mol Life Sci* **59**(1): 5-18
- Akama, T.O., Misra, A.K., Hindsgaul, O. et Fukuda, M.N. (2002). "Enzymatic synthesis in vitro of the disulfated disaccharide unit of corneal keratan sulfate." *J Biol Chem* **277**(45): 42505-42513
- Akama, T.O., Nakayama, J., Nishida, K., Hiraoka, N., Suzuki, M., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., Fukuda, M. et Fukuda, M.N. (2001). "Human corneal GlcNac 6-O-sulfotransferase and mouse intestinal GlcNac 6-O-sulfotransferase both produce keratan sulfate." *J Biol Chem* **276**(19): 16271-16278
- Alper, T. (1985). "Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation." *Nature* **317**(6039): 750
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A. et Clarke, M.C. (1967). "Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?" *Nature* **214**(90): 764-766
- Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J.L. et Laude, H. (2004). "Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection." *J Virol* **78**(1): 482-490
- Asante, E.A., Linehan, J.M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A.L., Welch, J., Hill, A.F., Lloyd, S.E., Wadsworth, J.D. et Collinge, J. (2002). "BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein." *Embo J* **21**(23): 6358-6366

- Atarashi, R., Moore, R.A., Sim, V.L., Hughson, A.G., Dorward, D.W., Onwubiko, H.A., Priola, S.A. et Caughey, B. (2007). "Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein." *Nat Methods* **4**(8): 645-650
- Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G.P., Meeker, H.C., Kascsak, R., Carp, R.I. et Wisniewski, T. (2001). "Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie." *J Clin Invest* **108**(5): 703-708
- Barmada, S., Piccardo, P., Yamaguchi, K., Ghetti, B. et Harris, D.A. (2004). "GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice." *Neurobiol Dis* **16**(3): 527-537
- Baron, G.S., Wehrly, K., Dorward, D.W., Chesebro, B. et Caughey, B. (2002). "Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes." *Embo J* **21**(5): 1031-1040
- Barret, A., Forestier, L., Deslys, J.P., Julien, R. et Gallet, P.F. (2005). "Glycosylation-related gene expression in prion diseases: PrP^{Sc} accumulation in scrapie infected GT1 cells depends on beta-1,4-linked GalNAc-4-SO₄ hyposulfation." *J Biol Chem* **280**(11): 10516-10523
- Baskakov, I.V., Legname, G., Prusiner, S.B. et Cohen, F.E. (2001). "Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control." *J Biol Chem* **276**(23): 19687-19690
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. et Weissmann, C. (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." *Cell* **46**(3): 417-428
- Baybutt, H. et Manson, J. (1997). "Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells." *Gene* **184**(1): 125-131
- Beekes, M., Baldauf, E. et Diringer, H. (1996). "Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie." *J Gen Virol* **77** (Pt 8)(1925-1934
- Beekes, M. et McBride, P.A. (2000). "Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie." *Neurosci Lett* **278**(3): 181-184
- Beekes, M. et McBride, P.A. (2007). "The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies." *Febs J* **274**(3): 588-605
- Beggs, H.E., Soriano, P. et Maness, P.F. (1994). "NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice." *J Cell Biol* **127**(3): 825-833
- Ben-Zaken, O., Tzaban, S., Tal, Y., Horonchik, L., Esko, J.D., Vlodaysky, I. et Taraboulos, A. (2003). "Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions." *J Biol Chem* **278**(41): 40041-40049

- Beranger, F., Mange, A., Goud, B. et Lehmann, S. (2002). "Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells." *J Biol Chem* **277**(41): 38972-38977
- Beringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T.L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A.G., Baron, T., Vilotte, J.L. et Laude, H. (2006). "Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy." *PLoS Pathog* **2**(10): e112
- Beringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haik, S., Vilotte, J.L., Fontes, M. et Laude, H. (2008). "Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD." *PLoS ONE* **3**(1): e1419
- Bockman, J.M., Kingsbury, D.T., McKinley, M.P., Bendheim, P.E. et Prusiner, S.B. (1985). "Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins in human brains." *N Engl J Med* **312**(2): 73-78
- Bockman, J.M., Prusiner, S.B., Tateishi, J. et Kingsbury, D.T. (1987). "Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins: host species-specific epitopes." *Ann Neurol* **21**(6): 589-595
- Bolton, D.C., McKinley, M.P. et Prusiner, S.B. (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." *Science* **218**(4579): 1309-1311
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A. et Prusiner, S.B. (1992). "Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway." *J Biol Chem* **267**(23): 16188-16199
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G. et LeBlanc, A. (2001). "Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis." *J Biol Chem* **276**(42): 39145-39149
- Bragason, B.T. et Palsdottir, A. (2005). "Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis." *Mol Cell Neurosci* **29**(2): 232-244
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. et Kretzschmar, H. (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." *Nature* **390**(6661): 684-687
- Brown, H.R., Goller, N.L., Rudelli, R.D., Merz, G.S., Wolfe, G.C., Wisniewski, H.M. et Robakis, N.K. (1990). "The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells." *Acta Neuropathol* **80**(1): 1-6
- Brown, K.L., Stewart, K., Ritchie, D.L., Mabbott, N.A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W.I. et Bruce, M.E. (1999). "Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells." *Nat Med* **5**(11): 1308-1312
- Brown, P. et Cervenakova, L. (2005). "A prion lexicon (out of control)." *Lancet* **365**(9454): 122

- Brown, P., Coker-Vann, M., Pomeroy, K., Franko, M., Asher, D.M., Gibbs, C.J., Jr. et Gajdusek, D.C. (1986). "Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by Western blot identification of marker protein in human brain tissue." *N Engl J Med* **314**(9): 547-551
- Brugger, B., Graham, C., Leibrecht, I., Mombelli, E., Jen, A., Wieland, F. et Morris, R. (2004). "The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition." *J Biol Chem* **279**(9): 7530-7536
- Brunelle, B.W., Greenlee, J.J., Seabury, C.M., Brown, C.E., 2nd et Nicholson, E.M. (2008). "Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle." *BMC Vet Res* **4**(36)
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. et Weissmann, C. (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." *Cell* **73**(7): 1339-1347
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S. et Wilson, V.A. (1998). "Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase." *Genes Dev* **12**(12): 1894-1906
- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C.M., Lario, P., Avdievich, N.I., Antholine, W.E., Olmstead, M.M., Vrieling, A., Gerfen, G.J., Peisach, J., Scott, W.G. et Millhauser, G.L. (2002). "Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein." *Biochemistry* **41**(12): 3991-4001
- Buschmann, A. et Groschup, M.H. (2005). "Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle." *J Infect Dis* **192**(5): 934-942
- Campana, V., Sarnataro, D. et Zurzolo, C. (2005). "The highways and byways of prion protein trafficking." *Trends Cell Biol* **15**(2): 102-111
- Carleton, A., Tremblay, P., Vincent, J.D. et Lledo, P.M. (2001). "Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus." *Pflugers Arch* **442**(2): 223-229
- Castilla, J., Gutierrez Adan, A., Brun, A., Pintado, B., Ramirez, M.A., Parra, B., Doyle, D., Rogers, M., Salguero, F.J., Sanchez, C., Sanchez-Vizcaino, J.M. et Torres, J.M. (2003). "Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice." *Arch Virol* **148**(4): 677-691
- Castilla, J., Gutierrez-Adan, A., Brun, A., Pintado, B., Salguero, F.J., Parra, B., Segundo, F.D., Ramirez, M.A., Rabano, A., Cano, M.J. et Torres, J.M. (2005a). "Transgenic mice expressing bovine PrP with a four extra repeat octapeptide insert mutation show a spontaneous, non-transmissible, neurodegenerative disease and an expedited course of BSE infection." *FEBS Lett* **579**(27): 6237-6246
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. et Soto, C. (2005b). "In vitro generation of infectious scrapie prions." *Cell* **121**(2): 195-206

- Caughey, B. et Baron, G.S. (2006). "Prions and their partners in crime." *Nature* **443**(7113): 803-810
- Caughey, B., Caughey, W.S., Kocisko, D.A., Lee, K.S., Silveira, J.R. et Morrey, J.D. (2006). "Prions and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) chemotherapeutics: A common mechanism for anti-TSE compounds?" *Acc Chem Res* **39**(9): 646-653
- Caughey, B., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J. et Chesebro, B. (1989). "Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells." *J Virol* **63**(1): 175-181
- Caughey, B. et Raymond, G.J. (1993). "Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells." *J Virol* **67**(2): 643-650
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F. et Caughey, W.S. (1991). "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy." *Biochemistry* **30**(31): 7672-7680
- Chen, F.X., Duan, Y.H., Ren, W.W., Yang, Y., Zhang, C.C., Qian, Y.R., Qiu, Y.M. et Ji, Y.H. (2009). "Down-regulation of 67LR reduces the migratory activity of Human Glioma Cells in vitro." *Brain Res Bull*
- Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S. et Schachner, M. (2003). "Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival." *Mol Cell Neurosci* **22**(2): 227-233
- Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P. et Autilio-Gambetti, L. (1995). "Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases." *J Biol Chem* **270**(32): 19173-19180
- Clinton, J., Forsyth, C., Royston, M.C. et Roberts, G.W. (1993). "Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study." *Neuroreport* **4**(1): 65-68
- Cohen, A.S. et Calkins, E. (1959). "Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins." *Nature* **183**(4669): 1202-1203
- Cohen, A.S., Shirahama, T. et Skinner, M. (1982). "Electron Microscopy of Amyloid." *Electron Microscopy of Proteins* **3**(Harris, J.R.) New York 165-205
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J. et Hill, A.F. (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." *Nature* **383**(6602): 685-690
- Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. et Baron, T. (2001). "Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene." *J Virol* **75**(11): 5328-5334
- Daude, N. (2004). "Prion diseases and the spleen." *Viral Immunol* **17**(3): 334-349

- Davies, P. et Brown, D.R. (2008). "The chemistry of copper binding to PrP: is there sufficient evidence to elucidate a role for copper in protein function?" *Biochem J* **410**(2): 237-244
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R. et Yarmush, M.L. (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." *Biophys J* **86**(2): 1234-1242
- Della-Bianca, V., Rossi, F., Armato, U., Dal-Pra, I., Costantini, C., Perini, G., Politi, V. et Della Valle, G. (2001). "Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126)." *J Biol Chem* **276**(42): 38929-38933
- Deslys, J.P. et Picot, A. (2001). "La vache folle, les risques pour l'homme". 127. Flammarion. 2-080300261
- Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Pietu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D. et Chouaib, S. (2004). "Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death." *Cancer Res* **64**(2): 719-727
- Diaz-Nido, J., Wandosell, F. et Avila, J. (2002). "Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases." *Peptides* **23**(7): 1323-1332
- Dickinson, A.G. (1976). "Scrapie in sheep and goats." *Slow Virus Diseases of Animals and Man* (Kimberlin, R.) Amsterdam 209-241
- Dickinson, A.G., Fraser, H., McConnell, I. et Outram, G.W. (1978). "Mitogenic stimulation of the host enhances susceptibility to scrapie." *Nature* **272**(5648): 54-55
- Dickinson, A.G. et Outram, G.W. (1988). "Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis." *Ciba Found Symp* **135**(63-83)
- Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. et Winnacker, E.L. (1996). "Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family." *J Virol* **70**(7): 4724-4728
- Ehlers, B. et Diringer, H. (1984). "Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen." *J Gen Virol* **65** (Pt 8)(1325-1330
- El-Agnaf, O.M., Jakes, R., Curran, M.D. et Wallace, A. (1998). "Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of alpha-synuclein protein implicated in Parkinson's disease." *FEBS Lett* **440**(1-2): 67-70
- Elsen, J.M., Amigues, Y., Schelcher, F., Ducrocq, V., Andreoletti, O., Eychenne, F., Khang, J.V., Poivey, J.P., Lantier, F. et Laplanche, J.L. (1999). "Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov." *Arch Virol* **144**(3): 431-445
- Ermonval, M., Petit, D., Le Duc, A., Kellermann, O. et Gallet, P.F. (2009). "Glycosylation-related genes are variably expressed depending on the differentiation state of a

- bioaminergic neuronal cell line: implication for the cellular prion protein." *Glycoconj J* **26**(4): 477-493
- Esko, J.D. et Lindahl, U. (2001). "Molecular diversity of heparan sulfate." *J Clin Invest* **108**(2): 169-173
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. et Raposo, G. (2004). "Cells release prions in association with exosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9683-9688
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. et Weissmann, C. (1996). "Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie." *Embo J* **15**(6): 1255-1264
- Ford, M.J., Burton, L.J., Li, H., Graham, C.H., Frobert, Y., Grassi, J., Hall, S.M. et Morris, R.J. (2002a). "A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS." *Neuroscience* **111**(3): 533-551
- Ford, M.J., Burton, L.J., Morris, R.J. et Hall, S.M. (2002b). "Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse." *Neuroscience* **113**(1): 177-192
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. et Tagliavini, F. (1993). "Neurotoxicity of a prion protein fragment." *Nature* **362**(6420): 543-546
- Fournier, J.G., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T. et Robain, O. (1995). "Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus." *C R Acad Sci III* **318**(3): 339-344
- Fraser, H. et Dickinson, A.G. (1970). "Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen." *Nature* **226**(5244): 462-463
- Fraser, H. et Dickinson, A.G. (1978). "Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus." *J Comp Pathol* **88**(4): 563-573
- Fukuta, M., Inazawa, J., Torii, T., Tsuzuki, K., Shimada, E. et Habuchi, O. (1997). "Molecular cloning and characterization of human keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase." *J Biol Chem* **272**(51): 32321-32328
- Funderburgh, J.L. (2002). "Keratan sulfate biosynthesis." *IUBMB Life* **54**(4): 187-194
- Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M. et Ben-Sasson, S.A. (1993). "Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate." *J Cell Physiol* **157**(2): 319-325
- Gabriel, J.M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. et Prusiner, S.B. (1992). "Molecular cloning of a candidate chicken prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 9097-9101
- Galtrey, C.M. et Fawcett, J.W. (2007). "The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system." *Brain Res Rev* **54**(1): 1-18

- Gauczynski, S., Nikles, D., El-Gogo, S., Papy-Garcia, D., Rey, C., Alban, S., Barritault, D., Lasmezas, C.I. et Weiss, S. (2006). "The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as a receptor for infectious prions and is inhibited by polysulfated glycanes." *J Infect Dis* **194**(5): 702-709
- Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. et Weiss, S. (2001). "The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein." *Embo J* **20**(21): 5863-5875
- Geldermann, H., Preuss, S., Eckert, J., Han, Y. et Ollesch, K. (2003). "Analysis of polymorphic microsatellites within the bovine and ovine prion protein (PRNP) genes." *Anim Genet* **34**(4): 283-289
- Goldfarb, L.G., Brown, P., McCombie, W.R., Goldgaber, D., Swergold, G.D., Wills, P.R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C.J., Jr. et Gajdusek, D.C. (1991). "Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10926-10930
- Goldmann, W. (2008). "PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies." *Vet Res* **39**(4): 30
- Goldmann, W., O'Neill, G., Cheung, F., Charleson, F., Ford, P. et Hunter, N. (1999). "PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA." *J Gen Virol* **80** (Pt 8)(2275-2283
- Gommerman, J.L., Mackay, F., Donskoy, E., Meier, W., Martin, P. et Browning, J.L. (2002). "Manipulation of lymphoid microenvironments in nonhuman primates by an inhibitor of the lymphotoxin pathway." *J Clin Invest* **110**(9): 1359-1369
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R. et Brentani, R.R. (2000). "Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis." *Brain Res Mol Brain Res* **76**(1): 85-92
- Greve, H., Cully, Z., Blumberg, P. et Kresse, H. (1988). "Influence of chlorate on proteoglycan biosynthesis by cultured human fibroblasts." *J Biol Chem* **263**(26): 12886-12892
- Griffith, J.S. (1967). "Self-replication and scrapie." *Nature* **215**(5105): 1043-1044
- Gu, Y., Hinnerwisch, J., Fredricks, R., Kalepu, S., Mishra, R.S. et Singh, N. (2003). "Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein." *Neurobiol Dis* **12**(2): 133-149
- Guillerme-Bosselut, F., Forestier, L., Jayat-Vignoles, C., Vilotte, J.L., Popa, I., Portoukalian, J., Le Dur, A., Laude, H., Julien, R. et Gallet, P.F. (2009). "Glycosylation-related gene expression profiling in brain and spleen of scrapie-affected mouse." *Glycobiology*

- Guiroy, D.C., Yanagihara, R. et Gajdusek, D.C. (1991). "Localization of amyloidogenic proteins and sulfated glycosaminoglycans in nontransmissible and transmissible cerebral amyloidoses." *Acta Neuropathol* **82**(2): 87-92
- Habuchi, H., Habuchi, O. et Kimata, K. (2004). "Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code?" *Glycoconj J* **21**(1-2): 47-52
- Haigh, C.L., Edwards, K. et Brown, D.R. (2005). "Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover." *Mol Cell Neurosci* **30**(2): 186-196
- Haigh, C.L., Wright, J.A. et Brown, D.R. (2007). "Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the Prnp gene." *J Mol Biol* **368**(4): 915-927
- Harris, D.A., Huber, M.T., van Dijken, P., Shyng, S.L., Chait, B.T. et Wang, R. (1993). "Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites." *Biochemistry* **32**(4): 1009-1016
- Hayatsu, N., Ogasawara, S., Kaneko, M.K., Kato, Y. et Narimatsu, H. (2008). "Expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in human glioblastoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **368**(2): 217-222
- Heaton, M.P., Leymaster, K.A., Freking, B.A., Hawk, D.A., Smith, T.P., Keele, J.W., Snelling, W.M., Fox, J.M., Chitko-McKown, C.G. et Laegreid, W.W. (2003). "Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer." *Mamm Genome* **14**(11): 765-777
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. et Lingappa, V.R. (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." *Science* **279**(5352): 827-834
- Heppner, F.L., Christ, A.D., Klein, M.A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J.P. et Aguzzi, A. (2001). "Transepithelial prion transport by M cells." *Nat Med* **7**(9): 976-977
- Herms, J.W., Tings, T., Dunker, S. et Kretzschmar, H.A. (2001). "Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells." *Neurobiol Dis* **8**(2): 324-330
- Herrmann, L.M., Cheevers, W.P., Davis, W.C., Knowles, D.P. et O'Rourke, K.I. (2003). "CD21-positive follicular dendritic cells: A possible source of PrP^{Sc} in lymph node macrophages of scrapie-infected sheep." *Am J Pathol* **162**(4): 1075-1081
- Hijazi, N., Kariv-Inbal, Z., Gasset, M. et Gabizon, R. (2005). "PrP^{Sc} incorporation to cells requires endogenous glycosaminoglycan expression." *J Biol Chem* **280**(17): 17057-17061
- Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T.O., Fukuda, M.N. et Fukuda, M. (2000). "Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family." *J Biol Chem* **275**(26): 20188-20196

- Honke, K. et Taniguchi, N. (2002). "Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides." *Med Res Rev* **22**(6): 637-654
- Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y. et Shinagawa, M. (1997). "Alternative usage of exon 1 of bovine PrP mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* **233**(3): 650-654
- Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodaysky, I. et Taraboulos, A. (2005). "Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions." *J Biol Chem* **280**(17): 17062-17067
- Huang, F.P., Farquhar, C.F., Mabbott, N.A., Bruce, M.E. et MacPherson, G.G. (2002). "Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut." *J Gen Virol* **83**(Pt 1): 267-271
- Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. et Weiss, S. (2001). "Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor." *Embo J* **20**(21): 5876-5886
- Hunter, N. (2003). "Scrapie and experimental BSE in sheep." *Br Med Bull* **66**(171-183)
- Hunter, N. (2007). "Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches." *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 619-628
- Hunter, N., Foster, J.D., Dickinson, A.G. et Hope, J. (1989). "Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep." *Vet Rec* **124**(14): 364-366
- Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N. et Shinagawa, M. (1997). "Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron." *J Vet Med Sci* **59**(3): 175-183
- Ironside, J.W. (2001). "From BSE to Creutzfeld-Jakob". *Biofutur* (Avril 2001): 6 - 10
- Itano, N. et Kimata, K. (2002). "Mammalian hyaluronan synthases." *IUBMB Life* **54**(4): 195-199
- Jackers, P., Clause, N., Fernandez, M., Berti, A., Princen, F., Wewer, U., Sobel, M.E. et Castronovo, V. (1996). "Seventeen copies of the human 37 kDa laminin receptor precursor/p40 ribosome-associated protein gene are processed pseudogenes arisen from retropositional events." *Biochim Biophys Acta* **1305**(1-2): 98-104
- Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R. et Collinge, J. (2001). "Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8531-8535
- Jaegly, A., Mouthon, F., Peyrin, J.M., Camugli, B., Deslys, J.P. et Dormont, D. (1998). "Search for a nuclear localization signal in the prion protein." *Mol Cell Neurosci* **11**(3): 127-133

- Jarrett, J.T. et Lansbury, P.T., Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" *Cell* **73**(6): 1055-1058
- Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C.M., Brown, K.L. et Bruce, M.E. (2000). "Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immunoelectron microscopy." *J Pathol* **191**(3): 323-332
- Jobling, M.F., Huang, X., Stewart, L.R., Barnham, K.J., Curtain, C., Volitakis, I., Perugini, M., White, A.R., Cherny, R.A., Masters, C.L., Barrow, C.J., Collins, S.J., Bush, A.I. et Cappai, R. (2001). "Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126." *Biochemistry* **40**(27): 8073-8084
- Jones, L.L. et Tuszynski, M.H. (2002). "Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors." *J Neurosci* **22**(11): 4611-4624
- Juling, K., Schwarzenbacher, H., Williams, J.L. et Fries, R. (2006). "A major genetic component of BSE susceptibility." *BMC Biol* **4**(33)
- Kanaani, J., Prusiner, S.B., Diacovo, J., Baekkeskov, S. et Legname, G. (2005). "Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro." *J Neurochem* **95**(5): 1373-1386
- Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F.E. et Prusiner, S.B. (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): 2333-2338
- Kato, Y., Hayatsu, N., Kaneko, M.K., Ogasawara, S., Hamano, T., Takahashi, S., Nishikawa, R., Matsutani, M., Mishima, K. et Narimatsu, H. (2008). "Increased expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in malignant astrocytic tumors." *Biochem Biophys Res Commun* **369**(4): 1041-1046
- Keller, R., Stuhlsatz, H.W. et Greiling, H. (1989). "Sulphation, chain elongation and chain termination in keratan sulphate biosynthesis." *Keratan sulphate, Chemistry, Biology, Chemical Pathology* Greiling, H. and Scott, J.E.) London 39-52
- Kim, B.T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. et Sugahara, K. (2001). "Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7176-7181
- King, A., Doey, L., Rossor, M., Mead, S., Collinge, J. et Lantos, P. (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
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. et Tateishi, J. (1991). "Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease." *J Virol* **65**(11): 6292-6295

- Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A.J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R.M. et Aguzzi, A. (1997). "A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie." *Nature* **390**(6661): 687-690
- Kobayashi, S., Morimoto, K., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H. et Shirasawa, T. (2000). "Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(3): 860-867
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T. et Caughey, B. (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." *Nature* **370**(6489): 471-474
- Kong, Q., Huang, S., Zou, W., Vanegas, D., Wang, M., Wu, D., Yuan, J., Zheng, M., Bai, H., Deng, H., Chen, K., Jenny, A.L., O'Rourke, K., Belay, E.D., Schonberger, L.B., Petersen, R.B., Sy, M.S., Chen, S.G. et Gambetti, P. (2005). "Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models." *J Neurosci* **25**(35): 7944-7949
- Kong, Q., Surewicz, K.A., Petersen, R.B., Zou, W., Chen, S.G., Gambetti, P., Parchi, P., Capellari, S., Goldfarb, L., Montagna, P., Lugaresi, E., Piccardo, P. et Ghetti, B. (2004). *Prion Biology and Diseases* **41**(Prusiner, S.B.) Cold Spring Harbor, NY 673-775
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L. et Riess, O. (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." *Nat Genet* **18**(2): 106-108
- Krusius, T., Finne, J., Margolis, R.K. et Margolis, R.U. (1986). "Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain." *J Biol Chem* **261**(18): 8237-8242
- Kusche-Gullberg, M. et Kjellen, L. (2003). "Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis." *Curr Opin Struct Biol* **13**(5): 605-611
- Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Yokoyama, T., Itohara, S. et Onodera, T. (1999). "Prions prevent neuronal cell-line death." *Nature* **400**(6741): 225-226
- Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y.G., Masullo, C. et Pocchiari, M. (1992). "Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters." *J Gen Virol* **73** (Pt 3)(661-665
- Laine, J., Marc, M.E., Sy, M.S. et Axelrad, H. (2001). "Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum." *Eur J Neurosci* **14**(1): 47-56
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., Essalmani, R. et Vilotte, J.L. (2002). "New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives." *C R Biol* **325**(1): 49-57

- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W. et Strittmatter, S.M. (2009). "Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers." *Nature* 457(7233): 1128-1132
- Lawson, V.A., Collins, S.J., Masters, C.L. et Hill, A.F. (2005). "Prion protein glycosylation." *J Neurochem* 93(4): 793-801
- Lee, I.Y., Westaway, D., Smit, A.F., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S.B. et Hood, L.E. (1998). "Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species." *Genome Res* 8(10): 1022-1037
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Jr. et Trojanowski, J.Q. (1991). "A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau." *Science* 251(4994): 675-678
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. et Prusiner, S.B. (2004). "Synthetic mammalian prions." *Science* 305(5684): 673-676
- Lehmann, S., Milhavel, O. et Mange, A. (1999). "Trafficking of the cellular isoform of the prion protein." *Biomed Pharmacother* 53(1): 39-46
- Leliveld, S.R., Dame, R.T., Wuite, G.J., Stitz, L. et Korth, C. (2006). "The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions." *J Biol Chem* 281(6): 3268-3275
- Leliveld, S.R., Stitz, L. et Korth, C. (2008). "Expansion of the octarepeat domain alters the misfolding pathway but not the folding pathway of the prion protein." *Biochemistry* 47(23): 6267-6278
- Li, J., Uversky, V.N. et Fink, A.L. (2001). "Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein." *Biochemistry* 40(38): 11604-11613
- Li, J., Uversky, V.N. et Fink, A.L. (2002). "Conformational behavior of human alpha-synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T." *Neurotoxicology* 23(4-5): 553-567
- Liemann, S. et Glockshuber, R. (1999). "Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein." *Biochemistry* 38(11): 3258-3267
- Lima, L.M., Cordeiro, Y., Tinoco, L.W., Marques, A.F., Oliveira, C.L., Sampath, S., Kodali, R., Choi, G., Foguel, D., Torriani, I., Caughey, B. et Silva, J.L. (2006). "Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid." *Biochemistry* 45(30): 9180-9187
- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I. et Brentani, R.R. (2008). "Physiology of the prion protein." *Physiol Rev* 88(2): 673-728

- Liu, I.H., Uversky, V.N., Munishkina, L.A., Fink, A.L., Halfter, W. et Cole, G.J. (2005). "Agrin binds alpha-synuclein and modulates alpha-synuclein fibrillation." *Glycobiology* **15**(12): 1320-1331
- Liu, J., Chau, C.H., Liu, H., Jang, B.R., Li, X., Chan, Y.S. et Shum, D.K. (2006). "Upregulation of chondroitin 6-sulphotransferase-1 facilitates Schwann cell migration during axonal growth." *J Cell Sci* **119**(Pt 5): 933-942
- Lysek, D.A., Schorn, C., Nivon, L.G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Guntert, P. et Wuthrich, K. (2005). "Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 640-645
- Ma, J., Wollmann, R. et Lindquist, S. (2002). "Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol." *Science* **298**(5599): 1781-1785
- Mabbott, N.A. et MacPherson, G.G. (2006). "Prions and their lethal journey to the brain." *Nat Rev Microbiol* **4**(3): 201-211
- Mace, K., Saxod, R., Feuerstein, C., Sadoul, R. et Hemming, F.J. (2002). "Chondroitin and keratan sulfates have opposing effects on attachment and outgrowth of ventral mesencephalic explants in culture." *J Neurosci Res* **70**(1): 46-56
- Mackay, F. et Browning, J.L. (1998). "Turning off follicular dendritic cells." *Nature* **395**(6697): 26-27
- Magalhaes, A.C., Silva, J.A., Lee, K.S., Martins, V.R., Prado, V.F., Ferguson, S.S., Gomez, M.V., Brentani, R.R. et Prado, M.A. (2002). "Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein." *J Biol Chem* **277**(36): 33311-33318
- Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. et Fantini, J. (2002). "Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins." *J Biol Chem* **277**(13): 11292-11296
- Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G. et Collinge, J. (2002). "Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration." *Embo J* **21**(3): 202-210
- Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y. et Lehmann, S. (2004). "Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein." *Biol Cell* **96**(2): 125-132
- Manson, J., McBride, P. et Hope, J. (1992). "Expression of the PrP gene in the brain of Sine congenic mice and its relationship to the development of scrapie." *Neurodegeneration* **1**(45-52)
- Manson, J.C., Clarke, A.R., McBride, P.A., McConnell, I. et Hope, J. (1994). "PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology." *Neurodegeneration* **3**(4): 331-340

- Manuelidis, L., Valley, S. et Manuelidis, E.E. (1985). "Specific proteins associated with Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie share antigenic and carbohydrate determinants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4263-4267
- Martin, R., Gallet, P.F., Rocha, D. et Petit, D. (2009). "Polymorphism of the prion protein in mammals: a phylogenetic approach." *Recent patents on DNA & Gene Sequences* **3**(1): 1-12
- Masuoka, J., Hegenauer, J., Van Dyke, B.R. et Saltman, P. (1993). "Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin." *J Biol Chem* **268**(29): 21533-21537
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A. et Sorice, M. (2004). "Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation." *FEBS Lett* **560**(1-3): 14-18
- Mayer-Sonnenfeld, T., Avrahami, D., Friedman-Levi, Y. et Gabizon, R. (2008). "Chemically induced accumulation of GAGs delays PrP(Sc) clearance but prolongs prion disease incubation time." *Cell Mol Neurobiol* **28**(7): 1005-1015
- Mayer-Sonnenfeld, T., Zeigler, M., Halimi, M., Dayan, Y., Herzog, C., Lasmezas, C.I. et Gabizon, R. (2005). "The metabolism of glycosaminoglycans is impaired in prion diseases." *Neurobiol Dis* **20**(3): 738-743
- McBride, P.A. et Beekes, M. (1999). "Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie." *Neurosci Lett* **265**(2): 135-138
- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretschmar, H.A. et Beekes, M. (2001). "Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves." *J Virol* **75**(19): 9320-9327
- McBride, P.A., Wilson, M.I., Eikelenboom, P., Tunstall, A. et Bruce, M.E. (1998). "Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice." *Exp Neurol* **149**(2): 447-454
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T. et Tufaro, F. (2000). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 668-673
- McLennan, N.F., Brennan, P.M., McNeill, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K.A., Ritchie, D., Brannan, F., Head, M.W., Ironside, J.W., Williams, A. et Bell, J.E. (2004). "Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage." *Am J Pathol* **165**(1): 227-235
- Mead, S. (2006). "Prion disease genetics." *Eur J Hum Genet* **14**(3): 273-281

- Meggio, F., Negro, A., Sarno, S., Ruzzene, M., Bertoli, A., Sorgato, M.C. et Pinna, L.A. (2000). "Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2." *Biochem J* **352 Pt 1**(191-196
- Milhiet, P.E., Vacherot, F., Caruelle, J.P., Barritault, D., Caruelle, D. et Courty, J. (1998). "Upregulation of the angiogenic factor heparin affinal regulatory peptide by progesterone in rat uterus." *J Endocrinol* **158**(3): 389-399
- Mironov, A., Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. et Peters, P.J. (2003). "Cytosolic prion protein in neurons." *J Neurosci* **23**(18): 7183-7193
- Mishra, R.S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W.Q., Mishra, R., Li, R., Chen, S.G., Gambetti, P., Fujioka, H. et Singh, N. (2004). "Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine." *J Neurosci* **24**(50): 11280-11290
- Mitteregger, G., Vosko, M., Krebs, B., Xiang, W., Kohlmansperger, V., Nolting, S., Hamann, G.F. et Kretzschmar, H.A. (2007). "The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein." *Brain Pathol* **17**(2): 174-183
- Miura, T., Hori-i, A. et Takeuchi, H. (1996). "Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein." *FEBS Lett* **396**(2-3): 248-252
- Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H. et Sugahara, K. (2009). "Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish." *Biochem J* **419**(2): 387-399
- Mohan, J., Hopkins, J. et Mabbott, N.A. (2005). "Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure." *Immunology* **116**(1): 122-133
- Moore, R.C., Hope, J., McBride, P.A., McConnell, I., Selfridge, J., Melton, D.W. et Manson, J.C. (1998). "Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent." *Nat Genet* **18**(2): 118-125
- Morel, E., Andrieu, T., Casagrande, F., Gauczynski, S., Weiss, S., Grassi, J., Rousset, M., Dormont, D. et Chambaz, J. (2005). "Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor." *Am J Pathol* **167**(4): 1033-1042
- Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J. et La Bonnardiere, C. (2001). "Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures." *J Gen Virol* **82**(Pt 8): 2017-2024
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. et Kellermann, O. (2000). "Signal transduction through prion protein." *Science* **289**(5486): 1925-1928

- Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Pradines, E., Pietri, M., Ermonval, M., Grassi, J., Richards, J.G., Mutel, V., Launay, J.M. et Kellermann, O. (2007). "Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells." *Ann N Y Acad Sci* **1096**(106-119)
- Moya, K.L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J. et Di Giamberardino, L. (2000). "Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain." *Microsc Res Tech* **50**(1): 58-65
- Nadanaka, S. et Kitagawa, H. (2008). "Heparan sulphate biosynthesis and disease." *J Biochem* **144**(1): 7-14
- Nandi, P.K. (1997). "Interaction of prion peptide HuPrP106-126 with nucleic acid." *Arch Virol* **142**(12): 2537-2545
- Nandi, P.K. et Leclerc, E. (1999). "Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution." *Arch Virol* **144**(9): 1751-1763
- Narhi, L., Wood, S.J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G.M., Anafi, D., Kaufman, S.A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., Louis, J.C., Wypych, J., Biere, A.L. et Citron, M. (1999). "Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation." *J Biol Chem* **274**(14): 9843-9846
- Narindrasorasak, S., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Poorman, R.A., Greenberg, B. et Kisilevsky, R. (1991). "High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan." *J Biol Chem* **266**(20): 12878-12883
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. et Taraboulos, A. (1997). "Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform." *J Biol Chem* **272**(10): 6324-6331
- Nieznanski, K., Nieznanska, H., Skowronek, K.J., Osiecka, K.M. et Stepkowski, D. (2005). "Direct interaction between prion protein and tubulin." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(2): 403-411
- Nishida, N., Harris, D.A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavel, O. et Lehmann, S. (2000). "Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein." *J Virol* **74**(1): 320-325
- Novak, U. et Kaye, A.H. (2000). "Extracellular matrix and the brain: components and function." *J Clin Neurosci* **7**(4): 280-290
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E. et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." *Cell* **40**(4): 735-746
- Oglecka, K., Lundberg, P., Magzoub, M., Goran Eriksson, L.E., Langel, U. et Graslund, A. (2008). "Relevance of the N-terminal NLS-like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects." *Biochim Biophys Acta* **1778**(1): 206-213

- Okuda, T., Sawada, T., Nakano, H., Matsubara, K., Matsuda, Y., Fukuta, M. et Habuchi, O. (2003). "Mouse N-acetylgalactosamine 4-sulfotransferases-1 and -2. Molecular cloning, expression, chromosomal mapping and detection of their activity with GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-octyl." *J Biochem (Tokyo)* **134**(1): 111-120
- Oohira, A., Kushima, Y., Tokita, Y., Sugiura, N., Sakurai, K., Suzuki, S. et Kimata, K. (2000a). "Effects of lipid-derivatized glycosaminoglycans (GAGs), a novel probe for functional analyses of GAGs, on cell-to-substratum adhesion and neurite elongation in primary cultures of fetal rat hippocampal neurons." *Arch Biochem Biophys* **378**(1): 78-83
- Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S. et Aono, S. (2000b). "Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development." *Arch Biochem Biophys* **374**(1): 24-34
- Ouidja, M.O., Petit, E., Kerros, M.E., Ikeda, Y., Morin, C., Carpentier, G., Barritault, D., Brugere-Picoux, J., Deslys, J.P., Adjou, K. et Papy-Garcia, D. (2007). "Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies." *Biochem Biophys Res Commun* **363**(1): 95-100
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. 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): 10962-10966
- Pan, T., Wong, B.S., Liu, T., Li, R., Petersen, R.B. et Sy, M.S. (2002). "Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans." *Biochem J* **368**(Pt 1): 81-90
- Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A. et Raeber, A.J. (2001). "Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells." *J Biol Chem* **276**(48): 44627-44632
- Parry, D.A., Flint, M.H., Gillard, G.C. et Craig, A.S. (1982). "A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils." *FEBS Lett* **149**(1): 1-7
- Patel, A.K. et Tikoo, S.K. (2006). "293T cells expressing simian virus 40 T antigen are semi-permissive to bovine adenovirus type 3 infection." *J Gen Virol* **87**(Pt 4): 817-821
- Perini, F., Vidal, R., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. et Prelli, F. (1996). "PrP²⁷⁻³⁰ is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets." *Biochem Biophys Res Commun* **223**(3): 572-577
- Perry, G., Siedlak, S.L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalaria, R.N., Galloway, P.G., Scardina, J.M., Cordell, B., Greenberg, B.D. et et al. (1991). "Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **11**(11): 3679-3683
- Peters, P.J., Mironov, A., Jr., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S.J., Burton, D.R., Williamson, R.A., Vey, M. et Prusiner, S.B. (2003). "Trafficking of

- prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway." *J Cell Biol* **162**(4): 703-717
- Pfeifer, K., Bachmann, M., Schroder, H.C., Forrest, J. et Muller, W.E. (1993). "Kinetics of expression of prion protein in uninfected and scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells." *Cell Biochem Funct* **11**(1): 1-11
- Pike, L.J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." *J Lipid Res* **47**(7): 1597-1598
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. et Nussbaum, R.L. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science* **276**(5321): 2045-2047
- Prado, M.A., Alves-Silva, J., Magalhaes, A.C., Prado, V.F., Linden, R., Martins, V.R. et Brentani, R.R. (2004). "PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein." *J Neurochem* **88**(4): 769-781
- Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M.A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K. et Aguzzi, A. (2002). "Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 919-924
- Prusiner, S.B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." *Science* **216**(4542): 136-144
- Prusiner, S.B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." *Science* **252**(5012): 1515-1522
- Prusiner, S.B. (1998). "Prions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13363-13383
- Qin, K., Yang, D.S., Yang, Y., Chishti, M.A., Meng, L.J., Kretzschmar, H.A., Yip, C.M., Fraser, P.E. et Westaway, D. (2000). "Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation." *J Biol Chem* **275**(25): 19121-19131
- Race, R.E., Fadness, L.H. et Chesebro, B. (1987). "Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells." *J Gen Virol* **68** (Pt 5)(1391-1399
- Rambold, A.S., Miesbauer, M., Rapaport, D., Bartke, T., Baier, M., Winklhofer, K.F. et Tatzelt, J. (2006). "Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP." *Mol Biol Cell* **17**(8): 3356-3368
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. et Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nat Immunol* **2**(4): 361-367

- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. et Khvorova, A. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." *Nat Biotechnol* **22**(3): 326-330
- Rhodes, K.E. et Fawcett, J.W. (2004). "Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?" *J Anat* **204**(1): 33-48
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I. et Weiss, S. (1997). "The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells." *Nat Med* **3**(12): 1383-1388
- Riesner, D. (2003). "Biochemistry and structure of PrPc and PrPSc." *Br Med Bull* **66**(21-33)
- Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G. et LeBlanc, A. (2005). "Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells." *Cell Death Differ* **12**(7): 783-795
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C.G. et LeBlanc, A.C. (2003). "Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons." *J Biol Chem* **278**(42): 40877-40881
- Rudd, P.M., Merry, A.H., Wormald, M.R. et Dwek, R.A. (2002). "Glycosylation and prion protein." *Curr Opin Struct Biol* **12**(5): 578-586
- Saba, R., Goodman, C.D., Huzarewich, R.L., Robertson, C. et Booth, S.A. (2008). "A miRNA signature of prion induced neurodegeneration." *PLoS ONE* **3**(11): e3652
- Saborio, G.P., Permanne, B. et Soto, C. (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." *Nature* **411**(6839): 810-813
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C. et Gibbs, C.J., Jr. (1993). "Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein." *J Biol Chem* **268**(27): 20276-20284
- Sah, P. (1996). "Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation." *Trends Neurosci* **19**(4): 150-154
- Sah, P. et Davies, P. (2000). "Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**(9): 657-663
- Sakudo, A., Lee, D.C., Saeki, K., Matsumoto, Y., Itohara, S. et Onodera, T. (2003). "Tumor necrosis factor attenuates prion protein-deficient neuronal cell death by increases in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **310**(3): 725-729
- Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di Giamberardino, L. et Moya, K.L. (1998). "Cellular prion protein localization in rodent and primate brain." *Eur J Neurosci* **10**(7): 2464-2471
- Sander, P., Hamann, H., Drogemuller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K. et Leeb, T. (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): 37408-37414
- Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M.H., Ziegler, U., Distl, O. et Leeb, T. (2004). "Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds." *Neurogenetics* **5**(1): 19-25
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I. et Schachner, M. (2005). "Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth." *J Cell Biol* **169**(2): 341-354
- Sarnataro, D., Paladino, S., Campana, V., Grassi, J., Nitsch, L. et Zurzolo, C. (2002). "PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts." *Traffic* **3**(11): 810-821
- Sasisekharan, R., Raman, R. et Prabhakar, V. (2006). "Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans." *Annu Rev Biomed Eng* **8**(181-231
- Schatzl, H.M., Laszlo, L., Holtzman, D.M., Tatzelt, J., DeArmond, S.J., Weiner, R.I., Mobley, W.C. et Prusiner, S.B. (1997). "A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis." *J Virol* **71**(11): 8821-8831
- Schmitt-Ulms, G., Hansen, K., Liu, J., Cowdrey, C., Yang, J., DeArmond, S.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. et Baldwin, M.A. (2004). "Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues." *Nat Biotechnol* **22**(6): 724-731
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M.A., Ball, H.L., Bradon, N., Bosque, P.J., Crossin, K.L., Edelman, G.M., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. et Prusiner, S.B. (2001). "Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein." *J Mol Biol* **314**(5): 1209-1225
- Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S. et Kellermann, O. (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): 13326-13331
- Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barritault, D. et Taraboulos, A. (2003). "Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis." *Biochem Biophys Res Commun* **312**(2): 473-479
- Scott, M., Foster, D., Miranda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J. et et al. (1989). "Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques." *Cell* **59**(5): 847-857
- Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J. et Prusiner, S.B. (1999). "Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15137-15142

- Selkoe, D.J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* 81(2): 741-766
- Shearer, J. et Soh, P. (2007). "The copper(II) adduct of the unstructured region of the amyloidogenic fragment derived from the human prion protein is redox-active at physiological pH." *Inorg Chem* 46(3): 710-719
- Shi, Y. (2003). "Mammalian RNAi for the masses." *Trends Genet* 19(1): 9-12
- Shyng, S.L., Heuser, J.E. et Harris, D.A. (1994). "A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits." *J Cell Biol* 125(6): 1239-1250
- Shyng, S.L., Huber, M.T. et Harris, D.A. (1993). "A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells." *J Biol Chem* 268(21): 15922-15928
- Shyu, W.C., Lin, S.Z., Chiang, M.F., Ding, D.C., Li, K.W., Chen, S.F., Yang, H.I. et Li, H. (2005). "Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model." *J Neurosci* 25(39): 8967-8977
- Silbert, J.E. et Sugumaran, G. (2002). "Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate." *IUBMB Life* 54(4): 177-186
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F. et Caughey, B. (2005). "The most infectious prion protein particles." *Nature* 437(7056): 257-261
- Sipe, J.D. et Cohen, A.S. (2000). "Review: history of the amyloid fibril." *J Struct Biol* 130(2-3): 88-98
- Snow, A.D., Willmer, J. et Kisilevsky, R. (1987). "Sulfated glycosaminoglycans: a common constituent of all amyloids?" *Lab Invest* 56(1): 120-123
- Snow, A.D., Mar, H., Nochlin, D., Kimata, K., Kato, M., Suzuki, S., Hassell, J. et Wight, T.N. (1988). "The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 133(3): 456-463
- Snow, A.D. et Wight, T.N. (1989). "Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses." *Neurobiol Aging* 10(5): 481-497
- Snow, A.D., Wight, T.N., Nochlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S.J. et Prusiner, S.B. (1990a). "Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie." *Lab Invest* 63(5): 601-611
- Snow, D.M., Steindler, D.A. et Silver, J. (1990b). "Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier." *Dev Biol* 138(2): 359-376
- Snow, A.D., Mar, H., Nochlin, D., Sekiguchi, R.T., Kimata, K., Koike, Y. et Wight, T.N. (1990c). "Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid

- protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome." *Am J Pathol* **137**(5): 1253-1270
- Snow, A.D., Sekiguchi, R., Nochlin, D., Fraser, P., Kimata, K., Mizutani, A., Arai, M., Schreier, W.A. et Morgan, D.G. (1994). "An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain." *Neuron* **12**(1): 219-234
- Song, J., Giang, A., Lu, Y., Pang, S. et Chiu, R. (2008). "Multiple shRNA expressing vector enhances efficiency of gene silencing." *BMB Rep* **41**(5): 358-362
- Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **4**(1): 49-60
- Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T. 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): 7358-7362
- Spielhafter, C. et Schatzl, H.M. (2001). "PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways." *J Biol Chem* **276**(48): 44604-44612
- Stahl, N. et Prusiner, S.B. (1991). "Prions and prion proteins." *Faseb J* **5**(13): 2799-2807
- Sugahara, K. et Kitagawa, H. (2000). "Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans." *Curr Opin Struct Biol* **10**(5): 518-527
- Sugahara, K. et Kitagawa, H. (2002). "Heparin and heparan sulfate biosynthesis." *IUBMB Life* **54**(4): 163-175
- Sugahara, K. et Mikami, T. (2007). "Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system." *Curr Opin Struct Biol* **17**(5): 536-545
- Sugumaran, G. et Silbert, J.E. (1990). "Relationship of sulfation to ongoing chondroitin polymerization during biosynthesis of chondroitin 4-sulfate by microsomal preparations from cultured mouse mastocytoma cells." *J Biol Chem* **265**(30): 18284-18288
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M.W. et Morris, R. (2003). "The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein." *Embo J* **22**(14): 3591-3601
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. et Prusiner, S.B. (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): 121-132
- Tateishi, J., Kitamoto, T., Kretzschmar, H. et Mehraein, P. (1996). "Immunohistological evaluation of Creutzfeldt-Jakob disease with reference to the type PrPres deposition." *Clin Neuropathol* **15**(6): 358-360

- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. et Prusiner, S.B. (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." *Cell* **83**(1): 79-90
- Triantaphyllidou, I.E., Sklaviadis, T. et Vynios, D.H. (2006). "Detection, quantification, and glycotyping of prion protein in specifically activated enzyme-linked immunosorbent assay plates." *Anal Biochem* **359**(2): 176-182
- Tritsch, D., Chesnoys-Marchais, D. et Feltz, A. (1998). "Physiologie du neurone". Doin. 2704008728
- Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M. et Sugahara, K. (2001). "Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence." *J Biol Chem* **276**(31): 29134-29140
- Uversky, V.N. et Fink, A.L. (2004). "Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded." *Biochim Biophys Acta* **1698**(2): 131-153
- van Horssen, J., Kleinnijenhuis, J., Maass, C.N., Rensink, A.A., Otte-Holler, I., David, G., van den Heuvel, L.P., Wesseling, P., de Waal, R.M. et Verbeek, M.M. (2002). "Accumulation of heparan sulfate proteoglycans in cerebellar senile plaques." *Neurobiol Aging* **23**(4): 537-545
- van Horssen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L.P., de Waal, R.M. et Verbeek, M.M. (2003). "Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders." *Lancet Neurol* **2**(8): 482-492
- Van Vactor, D., Wall, D.P. et Johnson, K.G. (2006). "Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity." *Curr Opin Neurobiol* **16**(1): 40-51
- Vana, K., Zuber, C., Nikles, D. et Weiss, S. (2007). "Novel aspects of prions, their receptor molecules, and innovative approaches for TSE therapy." *Cell Mol Neurobiol* **27**(1): 107-128
- Verbeek, M.M., Otte-Holler, I., van den Born, J., van den Heuvel, L.P., David, G., Wesseling, P. et de Waal, R.M. (1999). "Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain." *Am J Pathol* **155**(6): 2115-2125
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. et Dyson, H.J. (1999). "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2042-2047
- Viles, J.H., Klewpatinond, M. et Nadal, R.C. (2008). "Copper and the structural biology of the prion protein." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6): 1288-1292

- Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M.F., Vilotte, J.L., Lehmann, S. et Laude, H. (2001). "Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 4055-4059
- Vilette, D. (2008). "Cell models of prion infection." *Vet Res* **39**(4): 10
- Vilotte, J.L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M.G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M.F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D. et Laude, H. (2001). "Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp." *J Virol* **75**(13): 5977-5984
- Vincent, B., Cisse, M.A., Sunyach, C., Guillot-Sestier, M.V. et Checler, F. (2008). "Regulation of betaAPP and PrPc cleavage by alpha-secretase: mechanistic and therapeutic perspectives." *Curr Alzheimer Res* **5**(2): 202-211
- Wadsworth, J.D. et Collinge, J. (2007). "Update on human prion disease." *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 598-609
- Watson, D.J., Lander, A.D. et Selkoe, D.J. (1997). "Heparin-binding properties of the amyloidogenic peptides Abeta and amylin. Dependence on aggregation state and inhibition by Congo red." *J Biol Chem* **272**(50): 31617-31624
- Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bahr, M. et Zerr, I. (2004). "Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity." *Neurosci Lett* **372**(1-2): 146-150
- Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I. et Bahr, M. (2006). "Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury." *Stroke* **37**(5): 1296-1300
- Westaway, D., DeArmond, S.J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S.L., Torchia, M., Carlson, G.A. et Prusiner, S.B. (1994). "Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins." *Cell* **76**(1): 117-129
- Westaway, D., Mirenda, C.A., Foster, D., Zabarjadian, Y., Scott, M., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, H., DeArmond, S.J., Ebeling, C. et al. (1991). "Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice." *Neuron* **7**(1): 59-68
- Westaway, D. et Prusiner, S.B. (1986). "Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein." *Nucleic Acids Res* **14**(5): 2035-2044
- Westermarck, P. (2005). "Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides." *Febs J* **272**(23): 5942-5949

- Whittal, R.M., Ball, H.L., Cohen, F.E., Burlingame, A.L., Prusiner, S.B. et Baldwin, M.A. (2000). "Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry." *Protein Sci* **9**(2): 332-343
- Xia, G., Evers, M.R., Kang, H.G., Schachner, M. et Baenziger, J.U. (2000). "Molecular cloning and expression of the pituitary glycoprotein hormone N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase." *J Biol Chem* **275**(49): 38402-38409
- Yehiely, F., Bamborough, P., Da Costa, M., Perry, B.J., Thinakaran, G., Cohen, F.E., Carlson, G.A. et Prusiner, S.B. (1997). "Identification of candidate proteins binding to prion protein." *Neurobiol Dis* **3**(4): 339-355
- Yin, S., Pham, N., Yu, S., Li, C., Wong, P., Chang, B., Kang, S.C., Biasini, E., Tien, P., Harris, D.A. et Sy, M.S. (2007). "Human prion proteins with pathogenic mutations share common conformational changes resulting in enhanced binding to glycosaminoglycans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18): 7546-7551
- Young, I.D., Willmer, J.P. et Kisilevsky, R. (1989). "The ultrastructural localization of sulfated proteoglycans is identical in the amyloids of Alzheimer's disease and AA, AL, senile cardiac and medullary carcinoma-associated amyloidosis." *Acta Neuropathol* **78**(2): 202-209
- Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., de Oliveira, E., Jachieri, S.G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R. et Martins, V.R. (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." *Embo J* **21**(13): 3307-3316
- Zhang, H., Uchimura, K. et Kadomatsu, K. (2006). "Brain keratan sulfate and glial scar formation." *Ann N Y Acad Sci* **1086**(81-90)
- Zou, W.Q. et Gambetti, P. (2005). "From microbes to prions the final proof of the prion hypothesis." *Cell* **121**(2): 155-157

}