

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie-Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

UMR1061 INRA/Université de Limoges

Génétique Moléculaire Animale

Thèse N° 26-2011

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline: Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par

Renaud MARTIN

le 12 septembre 2011

**Glycogénome et maladies à prions :
Etude de la corrélation entre l'expression du gène
Chst8 et l'apparition de PrPres**

Thèse co-dirigée par Jean-Michel Petit et Paul-François Gallet

JURY :

Rapporteurs

M Hubert LAUDE, Directeur de Recherche – INRA de Jouy-En-Josas

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

Examineurs

M Marc Blondel, Professeur – Université de Brest

M Abderrahman MAFTAH, Professeur – Université de Limoges

M Jean-Michel PETIT, Directeur de thèse Maître de Conférences (HDR) - Université de Limoges

M Paul-François GALLET, co-directeur de thèse Maître de Conférences - Université de Limoges

*La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de
notre imagination et que les illusions de notre ignorance.*

Claude Bernard

A Audrey et Sacha

Rermerciements

Cette thèse a été préparée entre 2007 et 2011 au sein du laboratoire de Biotechnologie de l'UMR 1061 de Génétique Moléculaire Animale INRA-Université de Limoges sur le site de la Faculté des Sciences et Techniques.

Je remercie dans ce contexte Monsieur Abderhamann Maftah de m'avoir accueilli dans ce laboratoire de recherche ainsi que de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Monsieur François Gallet, Maître de Conférences à l'Université de Limoges m'a proposé un sujet de thèse ouvert et passionnant. Qu'il accepte tous mes remerciements et ma reconnaissance. Je le remercie également de m'avoir donné de précieux conseils pour mener à bien cette thèse et pour sa disponibilité pendant ces quatres années.

J'exprime également mes remerciements à Monsieur Jean-Michel Petit, Maître de Conférences à l'Université de Limoges pour avoir co-dirigé ces travaux de thèse.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à Madame Dulce Papy-Garcia, Professeur à l'Université de Paris-Créteil et Monsieur Hubert Laude, Directeur de Recherche à INRA de Jouy-en-Josas qui ont accepté la responsabilité de juger ce travail en qualité de rapporteurs ainsi que pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs durant la thèse.

Je témoigne toute ma reconnaissance à Monsieur Marc Blondel, Professeur à l'Université de Brest, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire et de participer à ce jury.

Je tiens également à faire part de toute ma gratitude à Madeleine et Déborah, secrétaires successives pour leur disponibilité et leur gentillesse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Véronique et Daniel, pour leurs conseils, aides et soutien aussi bien pour la thèse que pour mes enseignements en tant que moniteur au sein de la FST ainsi qu'à tous les permanents de l'équipe.

Mes pensées vont tout particulièrement à mon collègue de la première heure, Aurélien Le Duc dit « DD » pour les intimes et plus encore. Biologiste un peu, beaucoup, photographe passionnément, à la folie. N'oublie pas, « *L'indiscipline aveugle et de tous les instants fait la force principale des hommes libres* » Alfred Jarry.

Après le début de thèse, la fin de thèse et tu deviens la première heure de quelqu'un d'autre...
Et oui Amel : Réalise une thèse comme tu cuisines si bien les samoussas et ce sera divin !

Autour d'un frigo et d'un micro-onde les midis, mes remerciements vont à tout un tas de personnes que j'énumérerais pas ici par peur d'un oubli.

Un merci particulier à « Sylvia de la Huerta » pour toutes nos discussions entre légumes et prions, ainsi qu'à caroline pour les bons moments de détente, de rigolade et de persiflage autour d'un café.

Enfin, je souhaite remercier mes familles pour leur indéfectible soutien.

Mes derniers mots vont aux deux personnes qui me sont le plus cher :

Pour toi Audrey, un immense merci pour avoir cru en moi durant toutes ces années, pour m'avoir aidé, soutenu, supporté. Je pense que sans toi, je n'y serai pas arrivé. Il n'existe pas de mots assez forts pour exprimer l'insondable amour que j'ai pour toi...

Pour toi Sacha, qui est apparu au cours de cette thèse comme une bouffée d'oxygène à un moment difficile, je te dédie cette thèse.

Compay Segundo a dit : « *Pour réussir sa vie, un homme doit faire un enfant, écrire un livre et planter un arbre* », alors je pense que comme on dit souvent « *Ça, c'est fait !* ».

Résumé

La conversion de la protéine prion cellulaire en une isoforme mal repliée résistante à la dégradation par la protéinase K est la caractéristique principale des encephalopathies spongiformes transmissibles (EST). Ce phénomène se produit lorsqu'une protéine prion exogène mal repliée rentre en contact avec la protéine PrP cellulaire. Parmi les partenaires moléculaires potentiellement impliqués dans le processus de transconformation, les glycosaminoglycannes sont de bons candidats et leurs implications dans les pathologies sont documentées. Dans ce travail, nous avons examiné la conversion de la PrP^C-PrP^{Sc} en relation avec le taux de transcrite du gène *Chst8* dont l'un des produits est impliqués dans la sulfatation des chondroïtines. Pour cela, nous avons transfecté des cellules MOv avec une séquence codant un ARNsh dirigé contre les transcrits *Chst8*. Les clones obtenus ont été caractérisés pour leur niveau de transcrite *Chst8*, leur nature et sulfatation des glycosaminoglycannes (plus particulièrement des chondroïtines) et l'expression des gènes impliqués dans les processus de glycosylation. De façon surprenante, la diminution de la quantité de transcrite *Chst8* induit une élévation de la quantité de chondroïtines sulfates ainsi que le ratio de ces derniers au sein des glycosaminoglycannes totaux. Nous observons également une augmentation de quantité de résidus GalNAc sulfatés sur le carbone en position 4. La diminution de la quantité de transcrite *Chst8* est également associée à la diminution du signal de la protéine prion par western-blot. Lors d'un contact avec la souche infectieuse PrP^{Sc} 127S des cellules MOv transformées, aucun signal PrP^{Sc} n'est observé. Ensemble, ces résultats dans le modèle cellulaire MOv révèlent que la quantité de transcrite *Chst8* affecte les glycosaminoglycannes, et de ce fait l'environnement de la protéine prion, avec comme conséquence une variation dans la susceptibilité à la transconformation en PrP^{Sc}.

Abstract

The conversion of the endogenous prion protein to a PK-resistant isoform is a hallmark of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). It occurs when an exogenous and misfolded prion protein contacts the endogenous cellular PrP. Among the molecular partners suggested to be involved in the misfolding process, the glycosaminoglycans are good candidates, and their implication in prion disease is now documented. In the present study, we examined the PrP conversion according to the transcript level of the *Chst8* gene, one of whose products are involved in the chondroitins sulfation. For the analysis, MOv cells were transfected with shRNA directed against *Chst8* transcripts. All the clones were characterized for their *Chst8* transcript level, for their sulfated glycosaminoglycans content and more particularly for their sulfated chondroitins and for the expression of genes involved in glycosylation process. Surprisingly, the decreased amount of *Chst8* transcript induces an elevation of the chondroitin sulfate ratio of total GAGs with an increased amount of 4-*O*-sulfatation of GalNAc residues. This decrease of *Chst8* transcript is associated to a decreased signal of the prion protein by western-blotting. Upon contact with PrP^{Sc} prion strain 127S, total PrP is observed with a slight amount of PrPres that rapidly disappeared. Together, in MOv cellular model, these findings reveal that the *Chst8* transcript amount affect the glycosaminoglycan environment of the prion protein and, as a consequence its ability to PrPres transconformation.

Abréviations

- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AH : Acide Hyaluronique
- 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
- NLS: «Nuclear Localization Signal»
- OR : Octa-Repeat
- PAPS : 3'-PhosphoAdénosine 5'-PhosphoSulfate
- PK : Protéinase K
- PMCA : « Protein Misfolding Cyclic Amplification »
- 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
- PrPres : Protéine Prion résistante à la digestion PK
- PrP^{Sc} : Protéine Prion Scrapie
- ^{Ctm}PrP : Protéine prion avec un domaine C-terminal réticulaire et un domaine N-terminal cytoplasmique
- ^{Ntm}PrP : 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

Tables des matières

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 13 |
| I. PRESENTATION DES MALADIES A PRIONS | 15 |
| I.1. Historique et évolution du concept de protéine infectieuse..... | 15 |
| I.2. Les différentes ESSTs (Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles)..... | 15 |
| I.3. Caractéristiques des maladies à prion..... | 17 |
| II. LA PROTEINE PRION CELLULAIRE..... | 18 |
| II.1. Génétique de la protéine prion..... | 18 |
| II.2. Structures et modifications post-traductionnelles..... | 22 |
| II.3. Métabolisme de la protéine prion..... | 26 |
| II.4. Expression tissulaire du gène <i>Prnp</i> | 30 |
| II.5. Fonction de la PrP | 32 |
| II.5.a. Régulation du métabolisme du cuivre et protection contre le stress oxydatif | 33 |
| II.5.b. Neuroprotection et signal de survie | 34 |
| II.5.c. Implication de la PrP dans la synapse | 36 |
| II.5.d. Adhésion et croissance neuronale..... | 37 |
| II.5.e. Rôle dans les cellules immunitaires | 37 |
| III. LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE..... | 40 |
| III.1. PrP ^C -PrP ^{Sc} , une seule séquence mais deux structures tridimensionnelles..... | 40 |
| III.2. Les différents mécanismes de conversion..... | 43 |
| III.2.a. Modèle de nucléation-polymérisation | 43 |
| III.2.b. Modèle autocatalytique..... | 44 |
| III.2.c. Modèle de nucléation assistée | 45 |
| III.3. Sites de conversion..... | 45 |
| III.4. Propagation de l'agent infectieux | 48 |
| III.4.a. Franchissement de la barrière intestinale | 49 |
| III.4.b. Invasion des tissus lymphoïdes | 50 |
| III.4.c. Neuro-invasion | 52 |
| III.4.d. Propagation et accumulation dans le système nerveux central..... | 52 |
| III.5. Les différents modèles d'étude des maladies à prion | 54 |
| IV. LA PROTEINE PRION ET SON ENVIRONNEMENT..... | 59 |
| IV.1. Partenaires non protéiques..... | 59 |
| IV.1.a. Les ions métalliques | 59 |
| IV.1.b. Les acides nucléiques | 60 |
| IV.1.c. Les glycosaminoglycannes..... | 61 |
| IV.1.d. Les glycolipides..... | 61 |
| IV.2. Partenaires protéiques..... | 62 |
| V. LES GLYCOSAMINOGLYCANNES..... | 65 |
| V.1. Généralités | 65 |
| V.2. Structures des glycosaminoglycannes..... | 65 |
| V.2.a. L'acide hyaluronique | 65 |
| V.2.b. Les héparanes sulfates et l'héparine..... | 66 |
| V.2.c. Les chondroïtines sulfates et les dermatanes sulfates..... | 67 |
| V.2.d. Les kératanes sulfates | 68 |
| V.3. Biosynthèse des glycosaminoglycannes..... | 68 |
| V.3.a. Biosynthèse de l'acide hyaluronique | 69 |
| V.3.b. Biosynthèse des GAGs liés à un corps protéique | 69 |
| i. Synthèse du tétrasaccharide de liaison | 69 |
| ii. Déterminisme de la nature de la chaîne oligosaccharidique | 71 |
| iii. Elongation de la chaîne d'héparine et d'héparanes sulfates | 72 |
| iv. Elongation de la chaîne de chondroïtines sulfates et de dermatanes sulfates | 73 |
| v. Elongation de la chaîne de Kératanes sulfates | 74 |
| V.3.c. Biosynthèse des GAGs liés à un corps protéique | 74 |
| i. Modification post-synthétique de l'héparine et des héparanes sulfates..... | 74 |
| ii. Modification post-synthétique des chondroïtines sulfates et dermatanes sulfates..... | 76 |
| iii. Modification post-synthétique des kératanes sulfates | 77 |
| V.4. Dégradation des glycosaminoglycannes | 77 |
| V.4.a. Remodelage fonctionnel..... | 77 |
| V.4.b. Le recyclage | 79 |
| V.5. Rôle des glycosaminoglycannes dans le système nerveux..... | 81 |

| | | |
|---------|--|-----|
| V.6. | Implication des glycosaminoglycannes dans les maladies neurodégénératives conformationnelles | 84 |
| V.6.a. | Maladie d'Alzheimer | 85 |
| V.6.b. | Maladie de Parkinson | 85 |
| V.6.c. | Maladies à prions..... | 86 |
| VI. | CHST8 : UNE SULFOTRANSFERASE D'INTERET | 88 |
| | OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE..... | 87 |
| | MATERIELS ET METHODES..... | 93 |
| I. | MODELES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURES | 101 |
| I.1. | Types cellulaires (MOvS6, HEK 293 T) et conditions de cultures..... | 101 |
| I.1.a. | Les cellules MOv | 101 |
| I.1.b. | Les cellules HEK 293 T..... | 101 |
| II. | CREATION DES LIGNEES MOV SOUS EXPRIMANT LE GENE <i>CHST8</i> PAR INFECTION RETROVIRALE | 102 |
| II.1. | Production du rétrovirus de la famille des lentivirus pour éteindre l'expression de <i>Chst8</i> | 102 |
| II.1.a. | Choix de la séquence de l'ARNsh | 102 |
| II.1.b. | Construction du vecteur transformant et production de lentivirus..... | 104 |
| II.2. | Transformation de la lignés MOv par infection rétrovirale | 105 |
| II.3. | Méthodes d'analyses des clones MOv. <i>Chst8</i> | 105 |
| II.3.a. | Quantification de la sous expression de <i>Chst8</i> | 105 |
| II.3.b. | Détermination du nombre d'insertion | 106 |
| II.3.c. | Microscopie confocale..... | 106 |
| II.3.d. | Cytométrie en flux | 107 |
| II.3.e. | Western blotting..... | 107 |
| II.3.f. | Analyse des composants glucidiques portés par la MEC..... | 108 |
| III. | ANALYSE DU GLYCOTRANSCRIPTOME DES CLONES SOUS EXPRIMANT CHST8 | 110 |
| III.1. | Extraction des ARN totaux à partir de cellules et synthèse d'ADN complémentaire | 110 |
| III.2. | Analyse de l'expression des transcrits..... | 111 |
| IV. | INFECTION DES CELLULES ET DETECTION DE LA PROTEINE PRION PRP ^{SC} | 112 |
| IV.1. | Infection des lignées MOv par l'agent de la tremblante | 112 |
| IV.2. | Détection de la protéine prion résistante par western blotting..... | 112 |
| | RESULTATS ET DISCUSSION | 107 |
| | CHAPITRE I : Analyse de l'impact de la sous expression du gène <i>Chst8</i> sur la transconformation de la protéine prion cellulaire | 109 |
| I. | CARACTERISATION DE CLONES MOV SOUS EXPRIMANT LE GENE <i>CHST8</i> | 117 |
| I.1. | Création et sélection des clones MOv. <i>Chst8</i> | 117 |
| I.2. | Détermination du nombre d'insertions de la séquence codant l'ARNsh dans les différents clones | 124 |
| I.3. | Impact de la sous expression de <i>Chst8</i> sur la protéine prion | 127 |
| I.4. | Impact de la sous expression de <i>Chst8</i> sur l'expression des autres gènes du « glyco-génome »..... | 130 |
| I.5. | Impact de la modification de l'expression de <i>Chst8</i> sur la nature et la sulfatation des glycosaminoglycannes... .. | 134 |
| I.5.a. | Analyse de la nature des GAGs et de leur sulfatation | 135 |
| I.5.b. | Analyse semi-quantitative du taux de chondroïtines présentant un résidu GalNAc 4-O-sulfaté | 143 |
| I.6. | Impact de la sous expression de <i>Chst8</i> sur la morphologie des cellules MOv..... | 146 |
| II. | ANALYSE DE L'INFLUENCE DE LA SOUS EXPRESSION DE <i>CHST8</i> SUR LA TRANSCONFORMATION DE LA PRP ^C ET LA REPLICATION DE LA PRP ^{SC} | 149 |
| | CHAPITRE II : Analyse phylogénique de la protéine prion | 151 |
| | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 157 |
| | ANNEXE..... | 165 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 179 |

Introduction

I. Présentation des maladies à prions

I.1. Historique et évolution du concept de protéine infectieuse

Bien que les premières observations et description de tremblante de mouton et de chèvre aient été faites au milieu du 18^{ème} siècle (Leopoldt, 1759), il a fallu attendre les années 1930, pour que deux vétérinaires français J. Cuillé et P-L. Chelle montrent que la pathologie est transmissible et que sa durée d'incubation est très longue (Barrairon, 1990). Ce sont ces caractéristiques qui ont abouti à l'évocation de "maladie virale à évolution lente". Les deux vétérinaires ont démontré que la barrière des espèces (Notion reflétant la capacité limitée qu'ont les agents des ESSTs à induire la maladie chez un animal d'une autre espèce) peut être franchie. En effet, ils ont induit la maladie chez des chèvres suites à leur inoculation d'un lysat de moelle épinière de mouton malade (Cuillé et Chelle, 1939).

Chez l'Homme, c'est en 1920 et 1921 que les docteurs Hans-Gerhard Creutzfeldt et Jakob décrivent une pathologie du système nerveux central présentant des signes cliniques particuliers (Johnson, 2005, Collins *et al.*, 2006, Wadsworth et Collinge, 2007). Quelques années plus tard, Carleton Gajdusek étudie la maladie de Kuru présente au sein d'une tribu de Papouasie Nouvelle-Guinée pratiquant l'endocannibalisme funéraire. Grâce à la similitude des signes cliniques entre la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et la maladie de Kuru, l'hypothèse d'un agent infectieux commun aux deux pathologies a été émise (Gajdusek et Zigas, 1957).

I.2. Les différentes ESSTs (Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles)

Il existe différentes ESSTs touchant aussi bien l'homme (ESST humaines, Tableau 1) que certains animaux domestiques et sauvages (ESST animales, Tableau 2).

Tableau 1 : les principales ESST humaines, d'après Deslys et Picot, 2001 et Aguzzi et Sigurdson, 2004.

| Les ESSTs humaines | | |
|--|---|---------------------------------|
| Maladies | Voie de transmission, étiologie | Date de la première observation |
| Kuru | Consommation rituelle de cerveaux de cadavres | 1957 |
| | <u>latrogène</u> : Infection par l'hormone de croissance | 1920 |
| Maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ) | <u>Sporadique</u> : Mutations non hérissables du gène <i>Prnp</i> <u>Familiale</u> : Mutations hérissables du gène <i>Prnp</i> <u>Nouvelle variante</u> : Infection par le prion de l'ESB | 1996 |
| Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) | Mutations hérissables du gène <i>Prnp</i> | 1926 |
| Insomnie Familiale Fatale (IFF) | Mutations hérissables du gène <i>Prnp</i> | 1986 |
| Insomnie Fatale Sporadique (IFS) | Mutations non hérissables du gène <i>Prnp</i> , ou conversion spontanée de la PrP ^C en PrP ^{Sc} | 1986 |

Tableau 2 : les principales ESST animales, d'après Deslys et Picot, 2001 et Aguzzi et Sigurdson, 2004.

| Les ESSTs animales | | | |
|--|------------------------------------|---|--|
| Maladies | Hôte naturel | Voie de transmission, étiologie | Date de la première observation |
| Tremblante | Ovins, Caprins | Horizontale et peut être verticale | Première moitié du XVIII ^{ème} siècle |
| Encéphalopathie Transmissible du Vison (ETV) | Vison | Ingestion, origine de l'épidémie indéterminée | 1947 |
| Syndrome de dégénérescence chronique | Wapiti et Cerf-mulet des rocheuses | Horizontale et peut être verticale | 1967 |
| Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) | Bovins, ruminants de zoo | Ingestion d'aliment contaminé par l'ESB | 1985 |
| Encéphalopathie Spongiforme des animaux de zoo | Bovidés et primates de zoo | Ingestion d'aliment contaminé par l'ESB | 1988 |
| Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF) | Félidés domestiques, ou zoo | Ingestion d'aliment contaminé par l'ESB | 1990 |

La tremblante du mouton comporte deux phases : une première phase d'atteintes neurologiques entraînant une hyperexcitabilité et des tremblements, et une seconde d'atteinte physique caractérisée par un prurit invasif qui a pour conséquence la perte progressive de la toison et des lésions cutanées étendues (Figure 1) (Deslys et Picot, 2001).

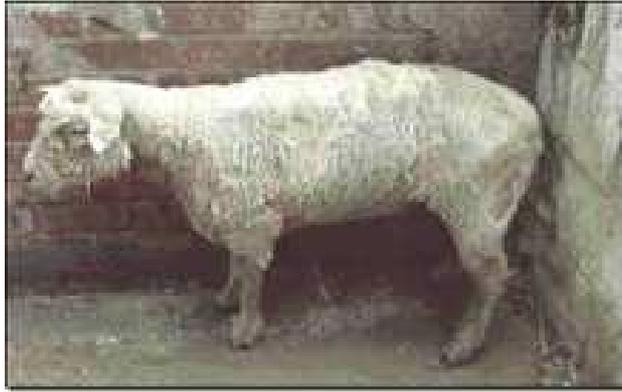


Figure 1 : Phénotype d'un mouton atteint de tremblante.

La localisation géographique des foyers de tremblante soulève des questions. En effet, des pays semblent épargnés malgré l'importation d'animaux contaminés (Nouvelle Zélande, Australie) et d'autres sont fortement touchés bien que des campagnes d'éradication aient été menées (Islande).

L'ESB a été décrite pour la première fois en 1986. Elle est consécutive à l'ingestion par les bovins, de farines animales produites à partir de carcasses d'animaux infectés par l'agent de la tremblante. Le pays le plus atteint est le Royaume Uni avec 184 606 cas avérés, recensés depuis 1987, tandis que le nombre de cas avérés pour le reste du monde serait de 5949 (sources de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale de 2010).

I.3. Caractéristiques des maladies à prion

Les maladies à prion sont causées par un agent transmissible non conventionnel (ATNC), dont les différents variants moléculaires sont responsables de la diversité des pathologies.

Une des particularités des pathologies à prion est la longue période d'incubation asymptomatique pouvant durer jusqu'à 30 ans chez l'humain suivie de l'apparition de signes cliniques aboutissant au décès. Les lésions tissulaires observées *post-mortem* sont de différentes natures : le système nerveux central présente tout d'abord une spongiose plus ou moins importante due à la vacuolisation des corps neuronaux ainsi qu'une multiplication et une hypertrophie des astrocytes responsables d'une astrogliose (DeArmond *et al.*, 1992, Kourie et Henry, 2001, Marella et Chabry, 2004). De plus l'accumulation et l'agrégation de protéine prion pathologique sous forme de plaques amyloïdes est observée (Figure 2).

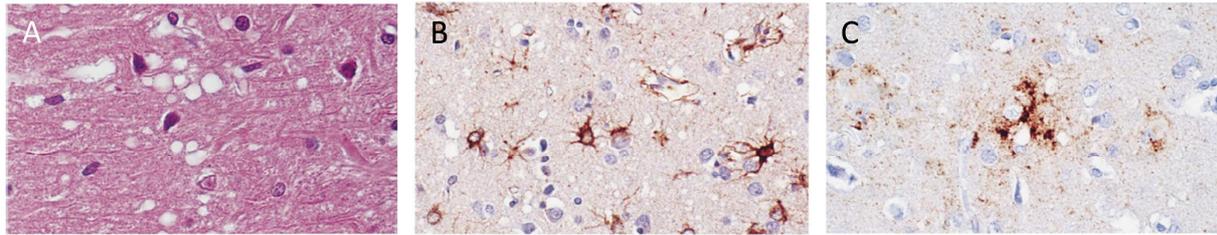


Figure 2 : Caractéristiques neuropathologiques et biochimiques des ESTs. (A) Coupe de matière grise de cerveau d'un patient atteint de MCJ colorée à l'hématoxyline-éosine révélant les caractéristiques de spongiose. **(B)** Astrogliose mise en évidence par des d'anticorps anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein). **(C)** Marquage immuno-histochimique de la protéine prion mettant en évidence des plaques amyloïdes. D'après Glatzel et Aguzzi, 2001.

II. La protéine prion cellulaire

II.1. Génétique de la protéine prion

Chez l'homme, la protéine prion est codée par le gène *PRNP* situé sur le bras court du chromosome 20 (Robakis *et al.*, 1986). Chez la souris, le gène est sur le chromosome 2 (Carlson *et al.*, 1993) et chez le bovin et l'ovin, sur le chromosome 13 (Lee, I. Y. *et al.*, 1998). Chez l'homme et le hamster, le gène est constitué de 2 exons et 1 intron. Il est structuré en 3 exons et 2 introns chez la souris, le bovin et l'ovin (Figure 3). Il existe chez l'homme une séquence nommée exon 2-like correspondant à une séquence très proche des exons 2 des autres espèces mais non transcrite suite à une substitution dans le site donneur d'épissage (Lee, I. Y. *et al.*, 1998, Heaton *et al.*, 2003).

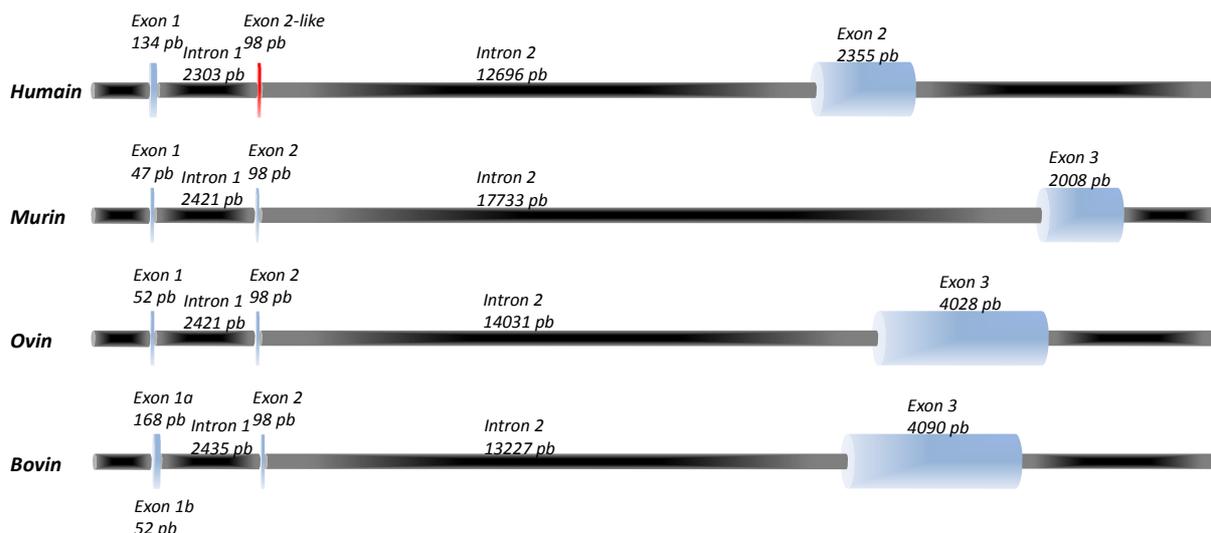


Figure 3 : Organisation génomique des gènes *Prnp* humain, murin, ovin et bovin. Les exons sont indiqués en bleu et les introns en noir. Il existe chez l'humain un pseudo exon indiqué en rouge, d'après Lee, I. Y. *et al.*, 1998, Heaton *et al.*, 2003.

La séquence du gène *PRNP* est très bien conservée au sein des mammifères avec plus de 80 % d'homologie (Oesch *et al.*, 1991). Des gènes présentant environ 30 % d'homologie avec le gène *PRNP* sont présents chez d'autres espèces comme le poulet (Harris *et al.*, 1991, Gabriel *et al.*, 1992), les reptiles (Simonic *et al.*, 2000), les amphibiens (Strumbo *et al.*, 2001) ou encore les poissons (Oidtmann *et al.*, 2003, Cotto *et al.*, 2005, Miesbauer *et al.*, 2006). La capacité à reconstruire un arbre phylogénétique respectant l'évolution reconnu avec la seule protéine prion, montre bien sa conservation entre les espèces et donc son importance (Martin *et al.*, 2009).

PRNP, *PRND* et *SPRN* constituent les gènes « de la famille » de la PrP. Le gène *PRND* se situe en 3' du gène *PRNP* formant le locus *Prn* et code la protéine Doppel qui possède environ 25 % d'homologie avec la protéine prion (Moore *et al.*, 1999). Elle joue un rôle au niveau de la spermatogénèse (Behrens, 2003) et sa surexpression dans le SNC de souris *Prnp^{0/0}* provoque une ataxie (Moore *et al.*, 1999). Le gène *Sprn* se situe sur les chromosomes 7 murin et 22 ovin et code la protéine Shadoo qui présente une certaine similitude avec la PrP au niveau de ses domaines fonctionnels (Figure 4) (Watts and Westaway, 2007). Son action en synergie avec la PrP chez la souris semblerait importante dans le développement embryonnaire précoce (Young, R. *et al.*, 2009). En revanche, sa surexpression dans le cerveau de souris n'influe pas le processus pathologique (Wang *et al.*, 2011).

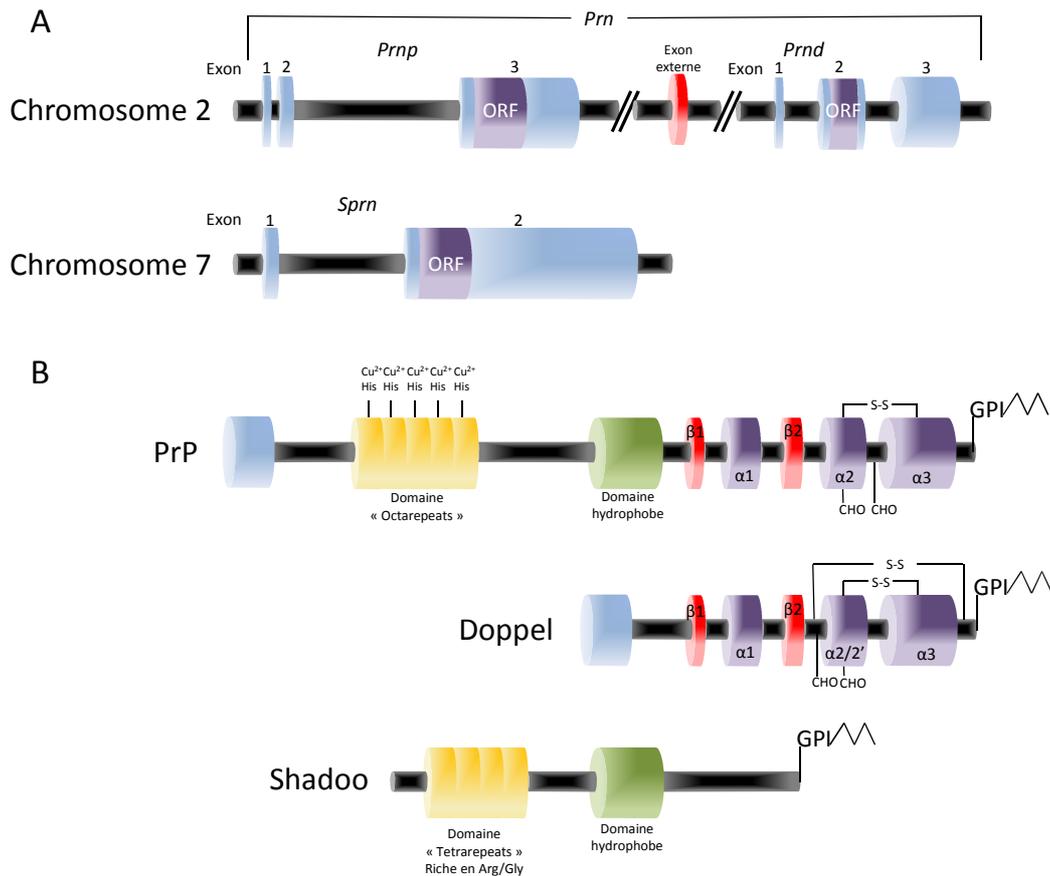


Figure 4 : Représentation des gènes murins codant les protéines PrP, Doppel et Shadoo (A) ainsi que les domaines architecturaux de ces protéines (B). Le locus *Prn* situé sur le chromosome 2 contient les gènes *Prnp* et *Prnd* codant respectivement les protéines PrP et Doppel. Le gène *Sprn* est situé sur le chromosome 7 et code la protéine Shadoo. Alors que la protéine Doppel est fortement similaire à la partie C-terminale de la protéine prion avec ses structures en hélice α et feuillet β , la protéine Shadoo est similaire à la partie N-terminale de la protéine prion. D'après Watts et Westaway, 2007.

Malgré la présence de plusieurs exons, le cadre ouvert de lecture de la protéine prion est totalement contenu dans le dernier exon (Lee, I. Y. *et al.*, 1998). Le seul cas d'épissage alternatif observé touche la région 5' non traduite chez le bovin, avec la présence de deux transcrits : l'un dit « long » qui possède l'intégralité de l'exon 1 alors que le second, dit « court » ne possède qu'une partie de 1 (exon 1b). Les deux transcrits sont ubiquitaires et de même niveau d'expression, sauf au niveau de la rate qui n'exprime que le transcrit court (Horiuchi *et al.*, 1997).

Chez l'homme il existe une quarantaine d'anomalies génétiques (Figure 5) susceptible d'être à l'origine des différentes pathologies à prion (Capellari *et al.*, 2005, Glatzel *et al.*, 2005).

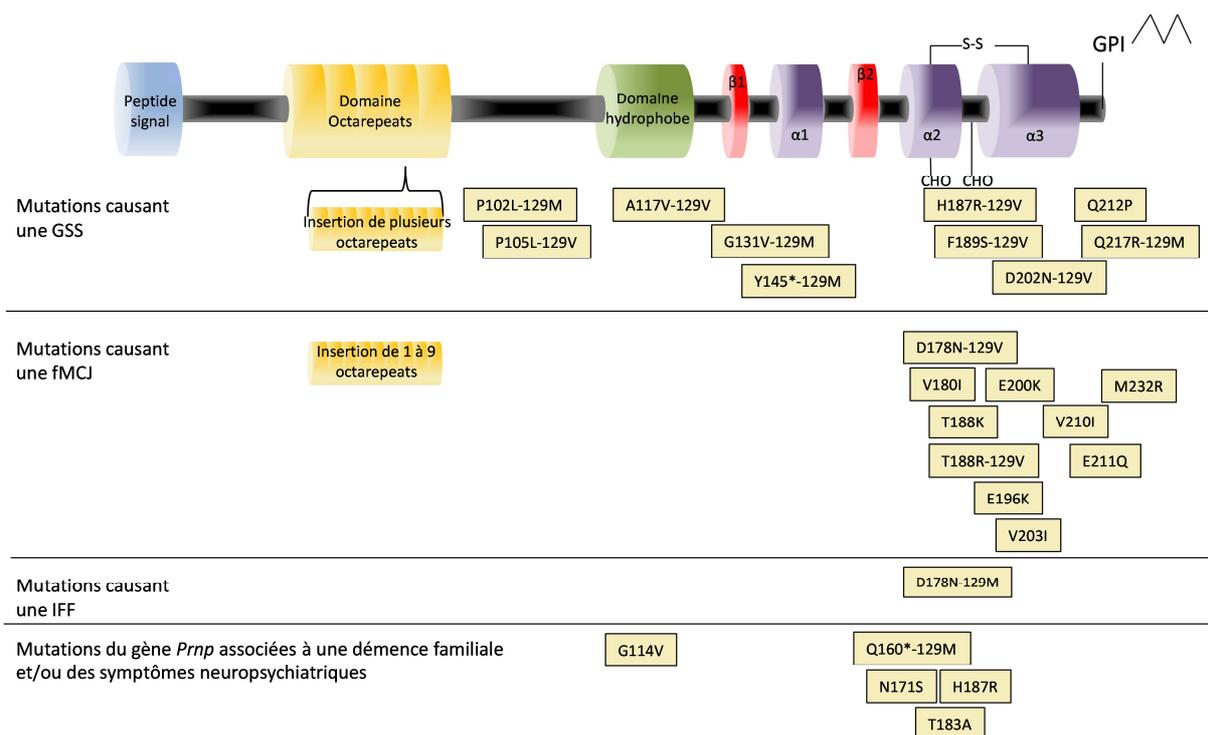


Figure 5 : Principales mutations du gène PRNP humain associées aux polymorphismes MV129 à l'origine des formes héréditaires des maladies à prions. D'après Aguzzi *et al.*, 2008.

L'expression du gène *Prnp* (Carlson *et al.*, 1986) varie entre le stade embryonnaire et le stade adulte (Manson, J. *et al.*, 1992) mais également en fonction des tissus (Oesch *et al.*, 1985). La région promotrice du gène ne possède pas de boîte TATA. Par contre, plusieurs sites de fixation aux facteurs de transcription Sp-1, AP1 et AP2 ont été mis en évidence, ce qui a longtemps laissé penser qu'il s'agissait d'un gène de « ménage » (Saeki *et al.*, 1996, Inoue *et al.*, 1997, Baybutt et Manson, 1997, Mahal *et al.*, 2001, O'Neill *et al.*, 2005). Par ailleurs, cette séquence promotrice est riche en îlots CpG, ce qui est une caractéristique des gènes à expression ubiquitaire et constante (Linden *et al.*, 2008).

Chez le bovin, l'exon 1 et l'intron 1 ont été mis en évidence comme régions clés pour la régulation de l'expression du gène *Prnp* (Inoue *et al.*, 1997, Haigh *et al.*, 2007), l'exon 1 possédant une région inhibitrice sur la transcription de l'intron 1. Chez la souris, deux promoteurs forts ainsi qu'une région inhibitrice ont été décrits respectivement en amont de l'exon 1 et 2 et dans l'intron 1 (Baybutt et Manson, 1997). De plus l'expression du gène *Prnp* semble être également régulée par la structure de la chromatine. En effet, il existe un site de fixation au facteur SP-1 responsable à la fois de l'activation et de l'inhibition de l'expression du gène par le biais d'un mécanisme de compétition entre l'histone déacétylase HDAC1 et le transactivateur E2F1 qui possède une activité d'acétylation des histones (Cabral *et al.*, 2002).

Chez l'ovine et le caprin, il n'existe pas de transcrit alternatif éliminant l'exon 1, mais deux sites de polyadénylation alternatifs ont été mis en évidence. Selon le site utilisé, deux transcrits de 2,1 et 4,6 kb codant le même cadre ouvert de lecture pour la PrP sont synthétisés avec pour le transcrit le plus long, une stabilité ou une initiation de traduction accrue (Daude, 2004, Goldmann *et al.*, 1999).

Alors que les régions codantes sont fortement homologues entre les mammifères, les régions promotrices présentent une homologie variable : 89 % d'homologie entre les séquences 5' du bovin et de l'ovine mais seulement 46 à 62 % d'homologie entre le bovin et les rongeurs ou l'homme (Inoue *et al.*, 1997).

II.2. Structures et modifications post-traductionnelles

La protéine prion est une glycoprotéine membranaire de 253 acides aminés chez l'homme, 255 chez la souris, 264 chez le bovin et 256 chez le mouton. Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous référerons à la numérotation ovine.

Des analyses de résonance magnétique nucléaire à l'aide de protéines recombinantes murine (Riek *et al.*, 1996), humaine (Zahn *et al.*, 2000), bovine (Hornemann *et al.*, 2004) ou ovine (Lysek *et al.*, 2005) ont montré une conservation marquée de la structure tridimensionnelle, avec des proportions relativement constantes d'hélices α (42 %) et de feuillets β (3 %) (Pan, K. M. *et al.*, 1993).

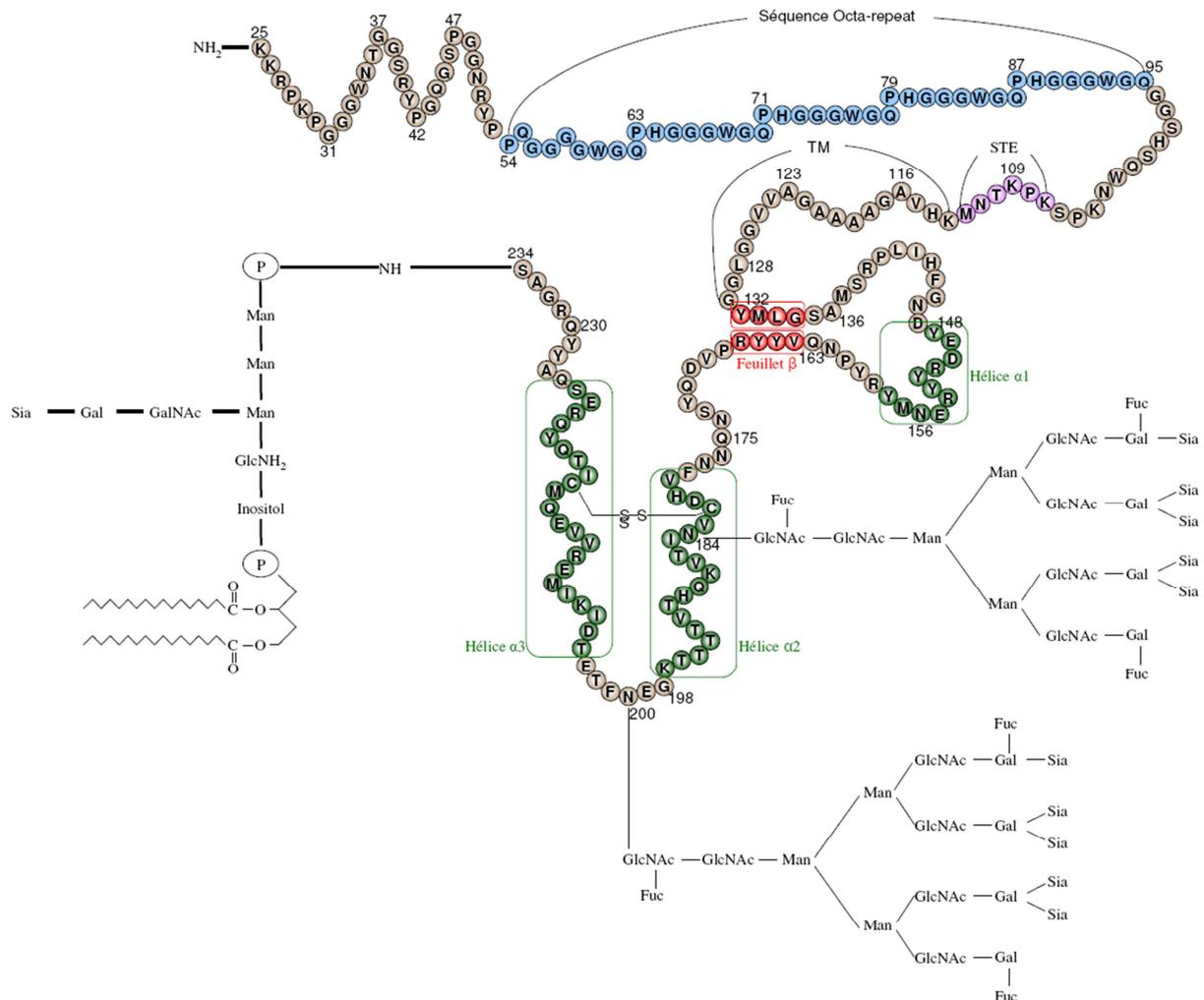


Figure 6 : Structure secondaire de la protéine prion ovine mature. Les acides aminés entrant dans la composition des structures secondaires sont encadrés en vert (hélices α) et en rouge (feuillet β). La numérotation se réfère à la protéine prion native avant les différents clivages, d'après Martin *et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

La protéine prion possède en partie *N*-terminale une séquence de 24 acides aminés servant de signal d'adressage au réticulum endoplasmique (RE) et en *C*-terminal, une séquence de 22 acides aminés servant de signal de glypiation. Après maturation, la protéine n'est plus formée que de 210 acides aminés (résidus 25 à 234) qui forment deux domaines bien distincts (Figure 6) :

- Un domaine *N*-terminal (résidus 25 à 129) flexible dont la conformation exacte dépend des conditions environnementales (pH, concentration en cuivre). Au sein de cette région, on retrouve des séquences particulières répétées que l'on nomme « octarepeats » (OR), PHGGGWGQ. Le nombre de répétitions varie entre et au sein d'une même espèce. Ainsi, chez l'homme, le nombre de répétitions est majoritairement de quatre, mais peut varier de 1 à 9 avec une incidence sur la maladie (Mead, 2006). Chez les autres espèces, le nombre de répétitions varie de 5 à 6 chez le mouton, de 4 à 7 chez

le bovin ou encore de 3 à 5 chez la chèvre (Goldmann, 2008). Ces OR sont encadrés par deux nonapeptides (PQ/HGGGWGQ).

En aval des séquences répétées se trouve une région hydrophile nommée STE (Stop Transfert Effector) qui provoque l'arrêt de la translocation de la protéine dans le RE (Yost *et al.*, 1990, Nakahara *et al.*, 1994) afin de permettre l'insertion dans la membrane de sa région hydrophobe (résidus 117 à 130).

- Un domaine C-terminal (résidus 130 à 234) globulaire (Lysek *et al.*, 2005). Il comporte trois hélices α nommées α_1 , α_2 et α_3 respectivement aux positions 148-158, 179-197 et 204-223, ainsi qu'un feuillet β constitué de deux brins antiparallèles β_1 et β_2 aux positions 131-134 et 165-168. Les hélices α_2 et α_3 sont reliées par un pont disulfure reliant les cystéines 182 et 217. Ce pont disulfure crée une boucle de type V3 très importante pour l'interaction de la protéine avec des sphingolipides (Mahfoud *et al.*, 2002).

La protéine prion possède au moins 52 sites potentiels de glycosylation dont 2 de N-glycosylation (Rudd *et al.*, 2001, Chen, P. Y. *et al.*, 2002, Tuzi *et al.*, 2008), les autres étant potentiellement associés à de la O-glycosylation.

Les deux sites de N-glycosylation sont aux positions N184 et N200 et ne sont pas obligatoirement occupés, d'où la présence simultanée de trois glycoformes (Lawson *et al.*, 2005) correspondant à la forme non-glycosylée (24 kDa), monoglycosylée (26 à 30 kDa) et bi-glycosylée (30 à 35 kDa). Une isoforme supplémentaire de 38 kDa a été mise en évidence dans des cultures cellulaires (GT1-7 et PC-12) et pourrait être liée à une hyper-glycosylation avec une prédominance de glycane tri- et tétra-antennés (Monnet *et al.*, 2003). Cette glycoforme serait la forme prépondérante impliquée dans le transport axonal antérograde rapide (Rodolfo *et al.*, 1999). La structure des glycannes arborés par la protéine varie en fonction de différents paramètres tels que la différenciation, la croissance, la densité cellulaire ou bien le type cellulaire (Moya *et al.*, 2005). La N-glycosylation joue un rôle important dans la maturation de la protéine PrP en permettant le contrôle qualité du repliement, notamment par leur interaction avec le système de chaperonne du RE Calnexine-Calréticuline, ERp57 et BIP (Capellari *et al.*, 1999, Jin *et al.*, 2000, Hetz *et al.*, 2005). Les glycannes permettent également la rétention et l'orientation vers la machinerie de dégradation des protéines mal repliées dans le RE grâce à des lectines. La glycosylation de la protéine prion détermine également sa localisation cellulaire en permettant son expression à la surface cellulaire (Salamat *et al.*, 2011).

Il existe une deuxième sorte de glycosylation, la *O*-glycosylation, qui pourrait être portée par la protéine prion mais rien n'a été décrit jusqu'à aujourd'hui. La PrP possède de nombreux sites potentiels de *O*-glycosylation. Il existe différents types de sucres dans la *O*-glycosylation tels que la *O*-GlcNAc (N-acétylglucosamine) ou la *O*-GalNAc (N-acétylgalactosamine). Ce type de glycosylation est très fréquent au niveau des terminaisons nerveuses sur les protéines responsables de la transduction des signaux (Cole et Hart, 2001). De nombreuses protéines neuronales sont modifiées par ajout d'*O*-GlcNAc, notamment des protéines responsable de maladies neurodégénératives comme Tau et l'APP (Protéine précurseur β amyloïde) (Lefebvre *et al.*, 2005, Ullrich *et al.*, 2010). Une *O*-glycosylation de la PrP n'est donc pas improbable. La présence d'un *O*-GlcNAc sur des protéines cytosoliques et nucléaires est un élément de régulation, notamment par sa capacité à empêcher la phosphorylation et pourrait également être un signal de résidence nucléaire (Guinez *et al.*, 2005). La localisation principale de la protéine prion demeure la membrane plasmique, mais on la retrouve également au niveau du noyau dans les cellules endocriniennes pancréatiques (Strom *et al.*, 2011b). Cela va dans le sens des résultats de Rybner et coll qui colocalisent la PrP avec deux lectines nucléaires (CBP70 et galectine 3) spécifiques des GlcNAc et du galactose (Rybner *et al.*, 2002) malgré le fait que la capacité de ces deux lectines à reconnaître des *O*-glycannes ne soit pas démontrée. Toutefois, la présence de *N*-glycannes sur la protéine prion empêche sa translocation au noyau (Gu, Y. *et al.*, 2003), aussi la localisation nucléaire ne pourrait être due qu'à la présence de *O*-glycannes sur la protéine. Des expériences de synthèse de fibrilles à partir de peptides représentant la protéine prion (aa 108-144) ont été réalisées en intégrant aux positions Ser 132 et Ser 135 des *O*-GalNAc. Il en résulte que la présence du *O*-glycane sur la Ser 132 favorise la formation de structure β et l'inverse pour la Ser 135 (Chen, P. Y. *et al.*, 2002). En se basant sur ces résultats, les auteurs émettent l'hypothèse que la *O*-glycosylation pourrait participer à la stabilité de la protéine prion. Il est à noter que cet effet est spécifique du *O*-GalNAc et n'a pas été observé avec le *O*-GlcNAc. Tout récemment, des structures *O*-glycosylées de type mucine (Gal β 1-3GalNAc α 1-*O* Ser/thr ou GalNAc α 1-*O* Ser/thr) ont été localisées dans des dépôts de protéine prion de patient atteint de syndrome de GSS (Zomosa-Signoret *et al.*, 2011).

II.3. Métabolisme de la protéine prion

L'ancre GPI de la PrP permet son ancrage au niveau de la surface externe de la membrane plasmique (Stahl *et al.*, 1987). Dans le cas de la protéine prion, l'ancre GPI est constituée d'une partie glucidique présentant des résidus d'acide sialique (Rudd *et al.*, 2001) et d'une partie lipidique. La partie lipidique (acide stéarique) de l'ancre induit la localisation de la protéine prion à la périphérie des "rafts" lipidiques (également appelés DRM pour Detergent Resistant Microdomains). Ces domaines membranaires (Figure 7) riches en cholestérol et glycosphingolipides (Naslavsky *et al.*, 1997, Madore *et al.*, 1999) sont impliqués dans divers processus tels que le trafic des protéines et des lipides ou encore la signalisation cellulaire (Brown, D. A. et London, 1998, Simons et Toomre, 2000).

A

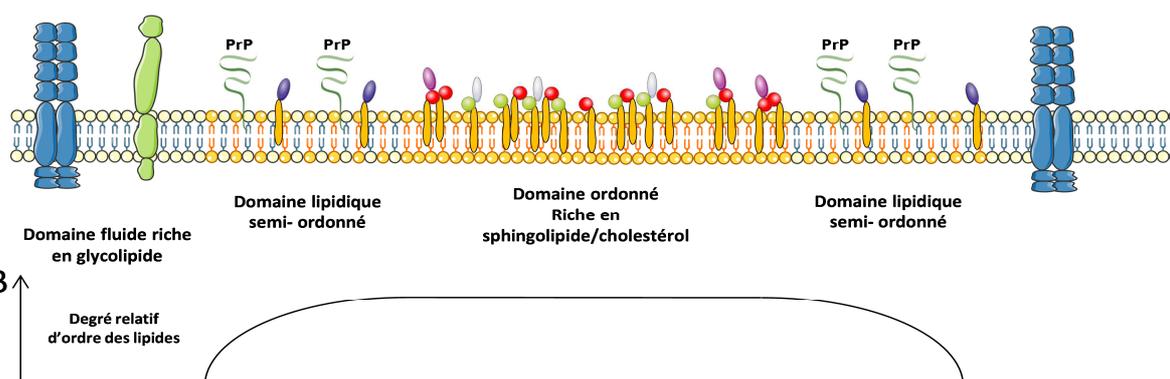


Figure 7 : Localisation de protéine PrP^C dans les « rafts » de la membrane plasmique. Les bâtonnets gras représentent les sphingolipides (chaines d'acides gras saturés) formant un domaine très ordonné (les sphères représentent les glycosylations). La PrP est localisée dans un domaine périphérique semi-ordonné entre le domaine ordonné et le domaine fluide glycérolipidique (acides gras non saturés) où sont enchâssées les protéines transmembranaires, d'après Madore *et al.*, 1999.

La glypiation n'est pas le seul type de liaison de la protéine prion à la membrane plasmique (Chakrabarti *et al.*, 2009). En effet, une petite quantité de protéine prion glypiée se retrouve enchâssée dans la membrane plasmique par la région hydrophobe du domaine C-terminal, ^{Ctm}PrP (Figure 8) (Stewart *et al.*, 2001). En quantité trop importante, due à des mutations dans la région hydrophobe, cette forme est responsable de neuro-dégénérescence (Hegde *et al.*, 1998, Hegde *et al.*, 1999, Ma *et al.*, 2002, Stewart et Harris, 2003, Rane *et al.*, 2008). Environ 20 % des protéines PrP^C sont non glypiées et peuvent être transmembranaires, cytosoliques (^{Cy}PrP) ou sécrétées. Cette forme non glypiée transmembranaire présente une orientation particulière avec un domaine N-terminal réticulaire, et un domaine C-terminal cytosolique ^{Ntm}PrP (Figure 8). La forme sécrétée est tronquée au niveau de la glycine 288 (Stahl et Prusiner, 1991).

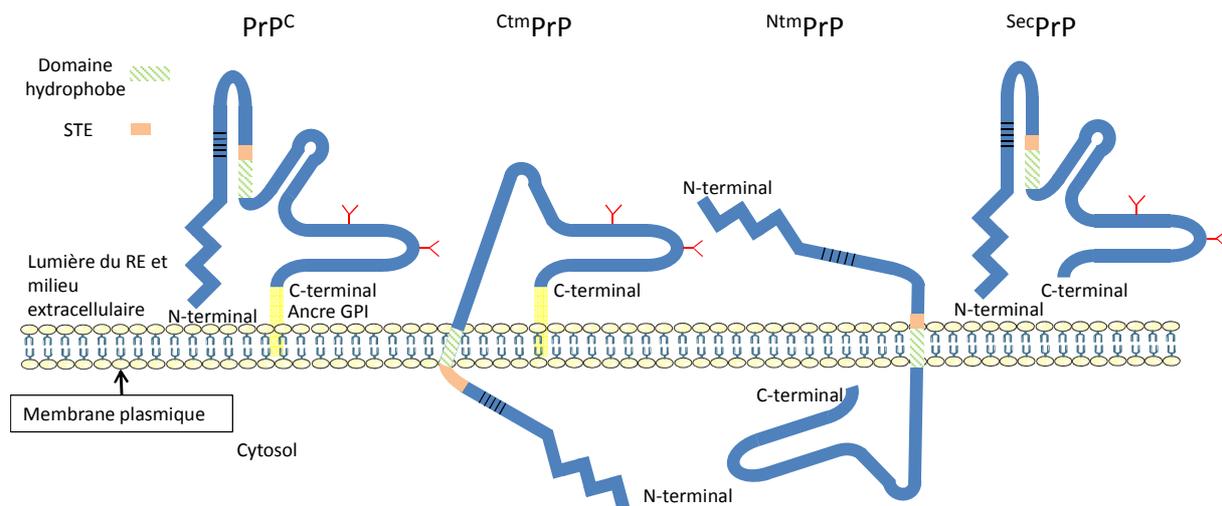


Figure 8 : Représentation des différentes formes de la protéine prion. Il existe deux formes glypiées transmembranaires : La forme PrP^C majoritaire et CtmPrP minoritaire. La protéine NtmPrP est une forme non glypiée transmembranaire ; la SecPrP la forme non glypiée et non transmembranaire, d'après Hegde *et al.*, 1998.

La protéine prion présente à la surface de la cellule peut être clivée ou internalisée. Dans le cas du clivage, mis en évidence chez l'humain (Chen, S. G. *et al.*, 1995, Laffont-Proust *et al.*, 2005) et le bovin (Zhao *et al.*, 2006), il existe plusieurs possibilités faisant intervenir différentes protéases (Figure 9). Le clivage le plus fréquent, clivage α , se situe entre les acides aminés 111 et 112 (numérotation humaine) conduisant à la libération d'un fragment amino-terminal N1 et à un fragment tronqué carboxy-terminal C1 lié à la membrane (Chen, S. G. *et al.*, 1995, Jimenez-Huete *et al.*, 1998). Ce clivage serait catalysé par deux métalloprotéases membranaires ADAM 10 et ADAM 17 (A Disintegrin And Metalloprotease). Un second clivage (clivage β) intervient entre les acides aminés 90 et 91 juste en aval des octapeptides. Le peptide amino-terminal libéré est nommé « octarepeat » N2, alors que le peptide carboxy-terminal lié à la membrane correspond au fragment C2 (Mange *et al.*, 2004). Les protéases responsables de ce clivage n'ont pas encore été identifiées. Il serait dépendant des ROS (Reactive Oxygen Species, espèces réactives à l'oxygène), du cuivre et de la calpaïne (Yadavalli *et al.*, 2004, Watt *et al.*, 2005). Ces quatre formes sont retrouvées dans le cerveau de sujets sains mais aussi de sujets malades. En outre, on observe une variation des proportions entre ces différentes formes selon les régions neuro-anatomiques (Beringue *et al.*, 2003). Le rôle fonctionnel de ces clivages ainsi que celui des produits obtenus n'est pas encore établi.

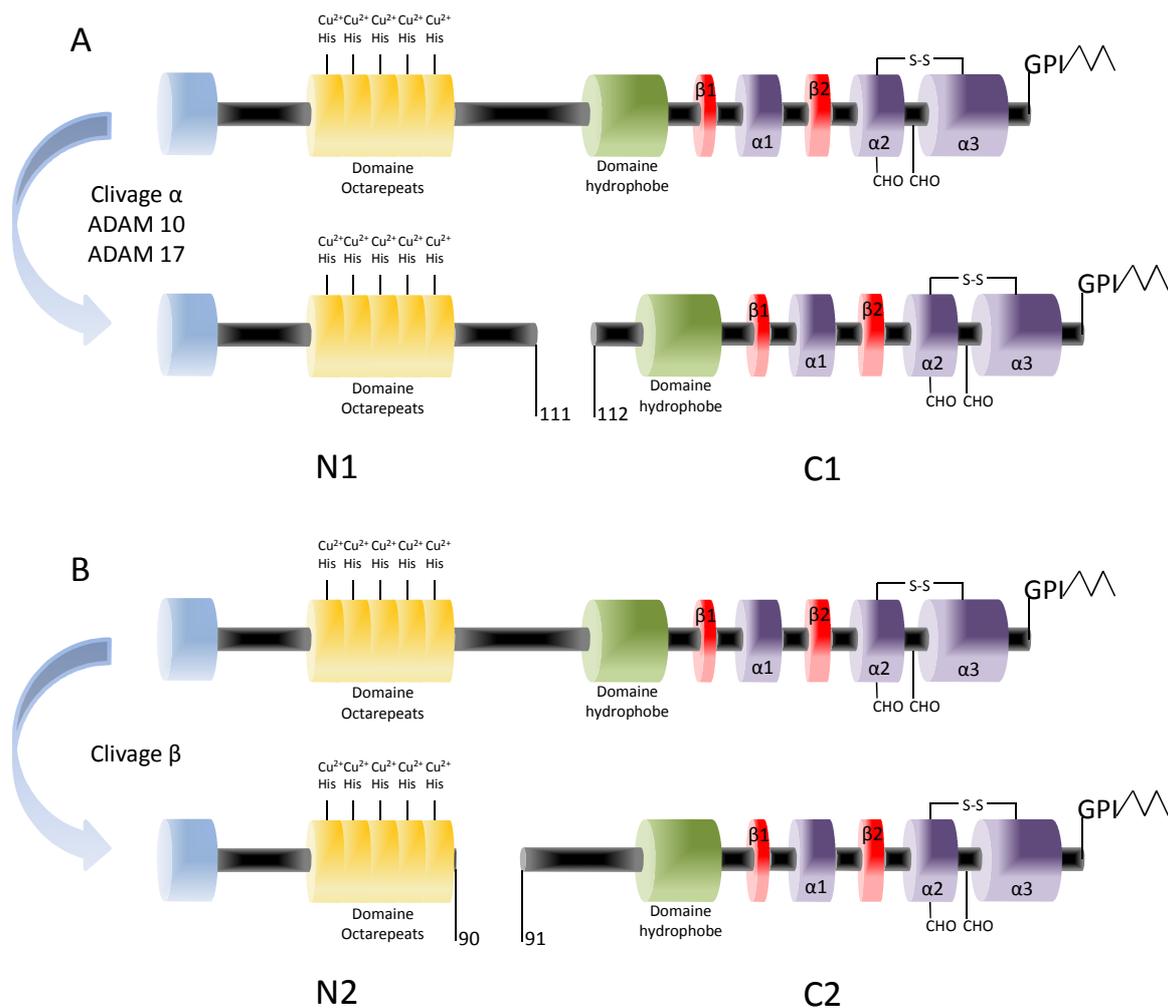


Figure 9 : Schéma représentant les différents clivages physiologiques de la PrP. (A) Clivage α réalisé par les désintégrines ADAM 10 et 17 produisant un fragment N1 sécrété et un fragment membranaire C1. (B) Le clivage β est réalisé par une protéase inconnue donnant alors un fragment N2 sécrété et un fragment membranaire C2.

Des expériences de « pulse-chase » ont montré que le temps de demi-vie de la PrP^C pouvait varier de 3 à 6 h (Caughey *et al.*, 1989). Dans certains cas, comme des cultures primaires d'origine neuronale ou lymphoïde, ce temps est seulement de l'ordre de 1 h (Parizek *et al.*, 2001).

La protéine prion est internalisée par deux voies. L'une est dépendante des cavéoles (Peters *et al.*, 2003), l'autre des puits recouverts de clathrine (Shyng *et al.*, 1994, Vey *et al.*, 1996). Il semblerait que l'une ou l'autre des voies soit privilégiée en fonction du type cellulaire, et parfois les deux voies sont actives (Fivaz *et al.*, 2002). La majorité (90 %) des protéines PrP internalisées sont recyclées et réintègrent la membrane plasmique (Shyng *et al.*, 1993). Les 10 % restant sont dégradés par la voie lysosomiale à chaque cycle (Lehmann *et al.*, 1999) (Figure 10).

La voie d'internalisation par les puits tapissés de clathrine a été observée sur des cellules CHO (Shyng *et al.*, 1994) et des cellules N2a de neuroblastomes (Magalhaes *et al.*, 2002). Cette voie

suppose une interaction entre les protéines glypiées et des protéines transmembranaires servant de relais avec les puits recouverts de clathrine. Dans le cas de la protéine prion, il est suggéré que le récepteur LRP1 (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 1) assurent ce relais (Taylor et Hooper, 2007, Parkyn *et al.*, 2008). Pour pouvoir être internalisée de cette manière, la protéine prion doit migrer hors des « rafts » vers les puits de clathrine, comme observé dans les cultures primaires de neurones (Sunyach *et al.*, 2003).

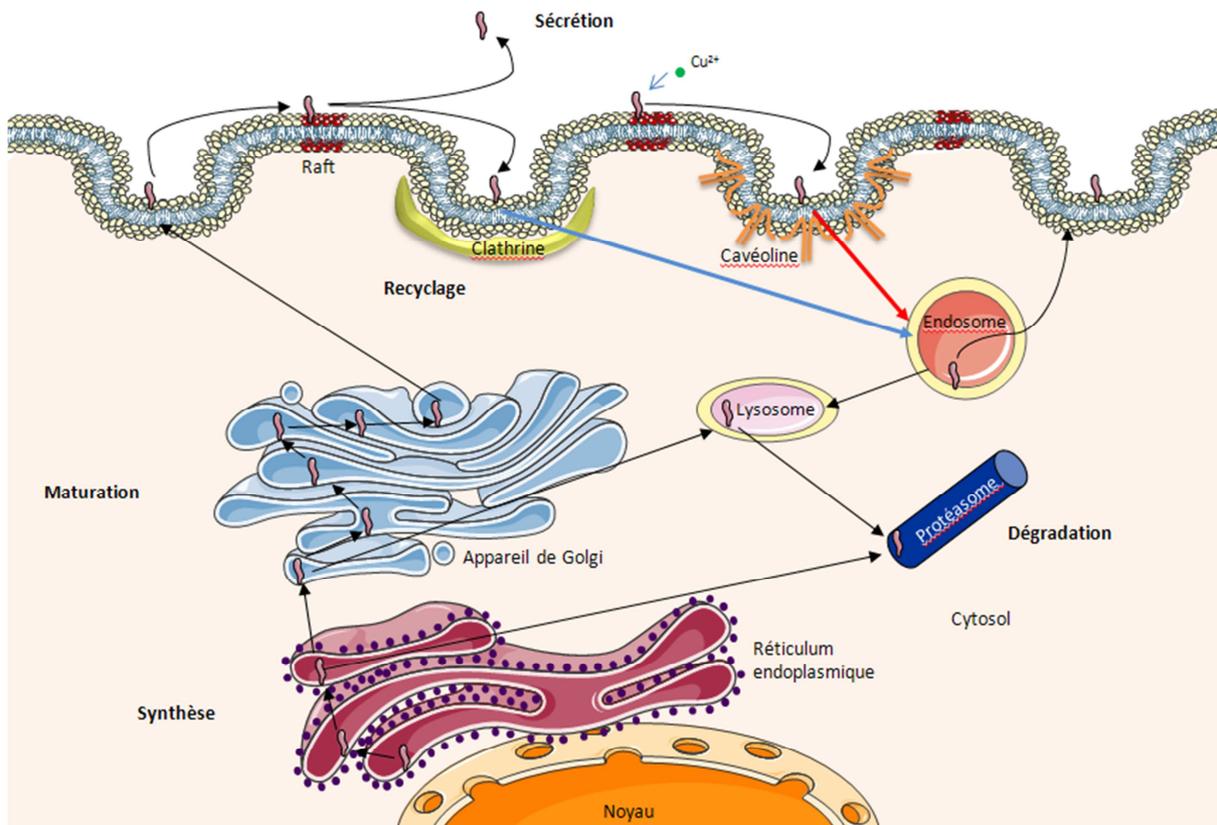


Figure 10 : Illustration du trafic de la PrP^C et des différentes voies d'endocytose empruntées. La protéine prion représentée en rose est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) puis maturée dans l'appareil de Golgi et excrétée à la surface de la membrane plasmique au niveau des rafts. Elle subit par la suite des cycles d'endocytose en suivant plusieurs voies (Clathrine en bleu ou Cavéoline en rouge).

La démonstration d'une localisation nucléaire de la protéine prion, ainsi que son interaction avec la chromatine est très récente (Strom *et al.*, 2011a). La localisation nucléaire de la protéine prion à plusieurs fois été avancée, notamment par des études de liaison de la protéine prion avec des acides nucléiques (Lima *et al.*, 2006, Bera *et al.*, 2007, Marques *et al.*, 2009). Cette localisation était suspectée suite à la mise en évidence de deux signaux de localisation nucléaire (NLS) cryptiques pouvant agir de concert ou individuellement pour diriger le fragment N-terminal de la PrP vers le noyau (Gu, Y. *et al.*, 2003). Le premier signal est formé des acides aminés (KKRPK) localisés aux positions 1 à 5 et le second est formé des acides aminés (KPSKP) localisés aux positions 79 à 84. De plus, Ogleka et coll ont montré qu'une séquence hydrophobe, nécessaire à la perturbation de

l'équilibre membranaire, était requise en complément de la première séquence NLS pour permettre la translocation de la protéine PrP dans le noyau (Oglecka *et al.*, 2008).

II.4. Expression tissulaire du gène *Prnp*

A l'état embryonnaire la PrP est exprimée au niveau de la crête neurale ainsi que dans les cellules neurales post-mitotiques différenciées, contrairement aux cellules progénitrices de la zone ventriculaire. La PrP est également exprimée hors du SNC (Figure 11) dans différents organes comme le cœur, les glandes surrénales, la thyroïde... (Lemaire-Vieille *et al.*, 2000, Tremblay *et al.*, 2007).

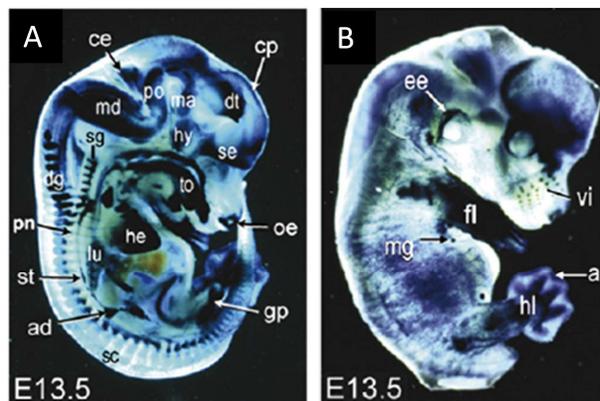


Figure 11 : Expression de la β -galactosidase sous contrôle du promoteur du gène *Prnp* dans le système nerveux, les membres et la peau chez l'embryon de souris au 13^{ème} jour embryonnaire. L'expression de la PrP^C est détectée dans le SNC, dans le système nerveux périphérique et dans différents organes en développement (A). ad, surrénales ; ce, cervelet ; cp, plaque corticale ; dg, ganglion de la racine dorsale ; dt, thalamus dorsal ; gp, protubérance génitale ; he, cœur ; hy, hypothalamus ; lu, poumons ; ma, aire mamillaire ; md, medulla ; nt, notochorde ; oe, épithélium olfactif ; po, pons ; pn, nerfs périphériques ; sc, moelle épinière ; se, septum ; sg, ganglion sympathique ; st, tronc sympathique ; to, langue. L'expression de la PrP^C est également détectée au niveau de certaines zones de la peau (B). Les abréviations sont : ar, crête ectodermique apicale ; ee, oreille externe ; fl, membres antérieurs ; hl, membres postérieurs ; mg, élévation des glandes mammaires ; vi, vibrisses, d'après Tremblay *et al.*, 2007.

A l'état adulte, la protéine PrP a une expression ubiquitaire, avec toutefois une forte expression dans la substance grise du système nerveux central (Robakis *et al.*, 1986, Bendheim *et al.*, 1992). Par contre, elle n'est pas exprimée dans la substance blanche. Au sein du cerveau, son expression est variable en fonction de la zone concernée. Ainsi, elle est fortement exprimée dans le cortex, le striatum et l'hippocampe, et plus modérément dans le thalamus, le cervelet et le bulbe olfactif.

Dans le cortex cérébelleux, seule la couche moléculaire (couche cellulaire la plus externe du cortex contenant des axones et des dendrites de neurones plus internes) présente une forte expression de PrP (Barmada *et al.*, 2004).

Des disparités sont également notées au sein des cellules de type neuronal avec une forte expression dans les neurones GABAergiques comparativement aux neurones cholinergiques et dopaminergiques. Concernant les autres types cellulaires (cellules de Schwann, astrocytes et cellules microgliales), la protéine prion a été mise en évidence, mais en quantité moindre (Ford *et al.*, 2002a, Follet *et al.*, 2002).

Bien souvent, dans le SNC, la quantité de protéines détectées est discordante de la quantité d'ARN messagers (Figure 12) (Ford *et al.*, 2002a). Les auteurs l'expliquent par un turn-over très rapide de la PrP dans les cellules granulaires du cervelet. Un autre exemple typique est observé, dans les neurones cholinergiques et dopaminergiques où seuls les transcrits ont été mis en évidence (Figure 12)(Ford *et al.*, 2002a). Par contre, au niveau des neurones du système nerveux périphérique (SNP), une très bonne corrélation entre la quantité de transcrite du gène *Prnp* et celle de la protéine PrP a été mise en évidence (Ford *et al.*, 2002b).

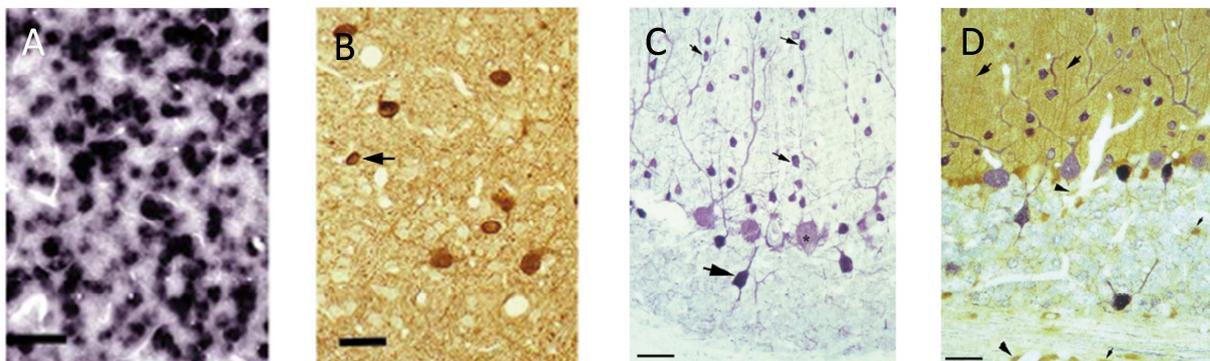


Figure 12 : Coupes sagittales du collicule inférieur de cerveau de souris (A et B) et analyses immunohistochimiques de l'expression de la protéine prion cellulaire dans des régions représentatives du cortex cérébelleux (C et D): (A) Hybridation *in situ* révélant la présence d'ARN messenger de *Prnp* répartis de façon homogène. (B) Immunohistochimie montrant la localisation ponctuelle de la protéine prion cellulaire. (C) Marquage au niveau du corps cellulaire et des dendrites des interneurones golgiens de types II de la couche granuleuses (flèche épaisse), des cellules étoilées de la couche moléculaire (flèches fines) et des cellules de Purkinje (astérisque). (D) Le double marquage anti-PrP (violet) et anti S-100 (brun), marqueur des cellules neuronales, met en évidence l'absence de PrP dans les cellules gliales de Bergmann de la couche moléculaire (flèches fines), des corps cellulaires des astrocytes dans la couche granuleuse (pointes de flèches) et la présence de PrP au niveau des axones dans la couche fibreuse myélinisée et des boutons synaptiques des astrocytes, d'après Ford *et al.*, 2002a.

Grâce à l'utilisation de souris transgéniques exprimant la protéine de fusion PrP-EGFP ou encore des souris exprimant la β -galactosidase sous la dépendance du promoteur du gène *Prnp*, une distribution précise de la PrP^C dans le cerveau est observée (Figure 13) (Bailly *et al.*, 2004, Barmada *et al.*, 2004).

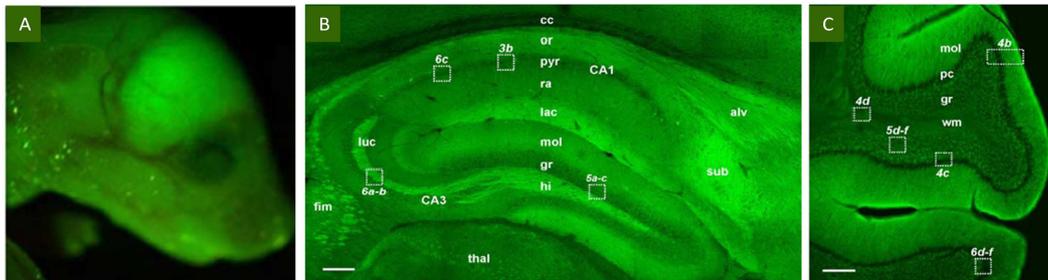


Figure 13 : Distribution de la PrP^C dans différentes parties du cerveau de la souris transgénique PrP-EGFP : (A) Tête d'une souris transgénique PrP-EGFP âgée d'un jour *postpartum* visualisée à l'aide d'un microscope de dissection utilisant une lampe à fluorescence et un filtre FITC. (B) Microscopie confocale de l'hippocampe en formation ainsi que du gyrus denté. **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) Coupe de cervelet visualisée en microscopie confocale. **mol**, couche moléculaire ; **pc**, couche cellulaire de Purkinje ; **gr**, couche cellulaire granulaire ; **wm**, substance blanche. Les barres d'échelle symbolisent 200 μ m, d'après Barmada *et al.*, 2004.

II.5. Fonction de la PrP

De par son expression ubiquitaire et sa très bonne conservation entre les espèces, la protéine prion pourrait jouer un rôle important au sein de la cellule, voire des organismes (Martin *et al.*, 2009). Cependant, après des années de recherche et notamment la création de souris transgéniques affectées sur le gène *Prnp*, le mystère peine à s'éclaircir. Les souris knock-out pour le gène *Prnp* sont viables et ne présentent pas d'altérations phénotypiques majeures, hormis dans le cas des lignées Nagasaki, Rcm0 et Zurich II où une expression ectopique du gène *Prnd* ce produit et provoque la perte des cellules de Purkinje (Moore *et al.*, 1999). Les souris Zurich I présentent également des symptômes dépressifs (Gadotti *et al.*, 2011).

La localisation de la protéine prion au niveau de « rafts » lipidiques lui confère une place stratégique dans la signalisation cellulaire car il s'agit d'une structure regroupant bon nombre de protéines transmembranaires responsables de transduction de signal. La protéine prion ne possédant pas, dans la majorité des cas, de domaine intracellulaire, son interaction avec un ou plusieurs acteurs possédant des domaines cytoplasmiques semble donc indispensable à son activité. Différentes molécules ont été mises en évidence (héparanes sulfates (Gabizon *et al.*, 1993, Caughey *et al.*, 1994, Chen, S. G. *et al.*, 1995, Brimacombe *et al.*, 1999, Ben-Zaken *et al.*, 2003), Bcl-2 (Kurschner et Morgan, 1995), la protéine chaperonne Hsp60 (Edenhofer *et al.*, 1996), la laminine et son récepteur (Gauczynski *et al.*, 2001) ou encore la protéine STI 1 (Stress-inductible protein 1) (Zanata *et al.*, 2002) comme interagissant avec la protéine prion.

Bien que sa fonction biologique exacte reste encore à établir, l'implication de la PrP dans différents processus biologiques a été mise en évidence aussi bien au cours du développement (Benvegnu *et al.*, 2011) qu'au stade adulte.

II.5.a. Régulation du métabolisme du cuivre et protection contre le stress oxydatif.

Plusieurs études tendent à montrer un rôle de protection contre le stress oxydatif par la PrP notamment en contrôlant le métabolisme du cuivre (Pauly et Harris, 1998, Sakudo *et al.*, 2004) ou en participant à l'activité antioxydante de la superoxyde dismutase (SOD1) (Zocche Soprana *et al.*, 2011). La région des « octarepeat » de la protéine prion est flexible et impliquée dans la liaison de cations divalents notamment les ions cuivre (Brown, D. R. *et al.*, 1997a). Cette liaison implique les résidus histidine dont six d'entre eux ont une forte affinité pour le cuivre (Jackson *et al.*, 2001).

Des souris invalidées pour le gène *Prnp* présentent une diminution de 50 % de la concentration de cuivre au niveau des synaptosomes accréditant la thèse du rôle de la PrP dans l'homéostasie du cuivre (Kretzschmar, 2000) et une diminution de l'activité antioxydante de la superoxyde dismutase 1 (SOD1) dépendante du cuivre et du zinc (Brown, D. R. *et al.*, 1997b). A l'inverse, une surexpression de la PrP s'accompagne de l'augmentation de l'activité de la SOD1 (Brown, D. R. et Besinger, 1998).

Ces résultats sont également confortés par les travaux de Milhavet et coll qui mettent en évidence des cultures de cellules neuronales chroniquement infectées présentant une sensibilité accrue au stress oxydatif (Milhavet *et al.*, 2000). Au cours des ESSTs, un stress oxydant est également présent (Milhavet et Lehmann, 2002). De façon concordante, une étude réalisée sur des tissus cérébraux de souris *Prnp*^{-/-} met en évidence la présence de protéines carbonylées et de produits de peroxydation lipidique en fortes concentrations, marqueurs d'un état de stress oxydatif (Wong *et al.*, 2001). Selon une étude, le clivage β (Figure 9) serait également protecteur contre le stress oxydatif (Lewis et Collins, 2008).

Tous ces résultats sur l'implication de la protéine prion dans l'homéostasie du cuivre sont néanmoins à prendre avec un certain recul car tout ceci n'est possible que dans le cas d'une affinité de l'ordre du femtomolaire (Jackson *et al.*, 2001) et non dans le cas d'une affinité de l'ordre du micro ou nanomolaire (Viles *et al.*, 1999). De plus, différentes études relatives à l'effet du cuivre sur la stabilité de conformation et l'agrégation de la protéine prion sont contradictoires (Miura *et al.*, 1996, Qin *et al.*, 2000).

II.5.b. Neuroprotection et signal de survie

Dans des neurones foetaux humains, la protéine prion est capable de protéger les cellules de l'apoptose dépendante de Bax (Bounhar *et al.*, 2001). Par contre, la PrP ne protège pas de l'apoptose induite par Bak, t-Bid, la staurosporine ou la thapsigargine (Roucou *et al.*, 2005). Son interaction avec la protéine STI-1 (Stress-inducible protein 1) aurait également pour conséquence une protection contre la mort cellulaire induite par l'anisomycine dans des implants rétiniens (Lopes *et al.*, 2005, Zanata *et al.*, 2002). Cet effet serait dépendant de l'activation de la voie AMPc/PKA (Chiarini *et al.*, 2002). De même, dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de souris *prnp*^{-/-}, la susceptibilité à l'apoptose est augmentée lors d'une privation en sérum (Kuwahara *et al.*, 1999). La privation entraîne la diminution de la quantité de cytochrome c mitochondrial, indiquant par la même que la protection par la PrP contre l'apoptose passe par le blocage de la voie mitochondriale. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Diarra-Mehrpour et coll sur des cellules MCF-7. En effet, une résistance à l'apoptose apparaît dans un clone de cette lignée qui surexprime le gène *Prnp* d'un facteur 17 (Diarra-Mehrpour *et al.*, 2004). Dans la lignée de neuroblastome N2a, la PrP protège de l'apoptose induite par l'expression de Dpl. La protection serait liée à l'interaction directe, au niveau de la membrane plasmique, de PrP avec Dpl (Driscaldi *et al.*, 2004). Par ailleurs, une étude récente montre que la protection contre la mort cellulaire dans des cellules cancéreuses du colon serait dépendante de la N-glycosylation de la PrP. Les cellules cancéreuses dépourvues de PrP glycosylée par l'utilisation de tunicamycine présentent un taux de mort cellulaire plus important que les mêmes cellules arborant la PrP correctement glycosylée (Yap et Say, 2011).

La PrP montre également un rôle neuro-protecteur dans le cas d'un stress ischémique. Dans le cerveau de rat, l'ischémie provoque l'augmentation de la quantité de PrP, et sa surexpression diminue la taille des lésions observées (Shyu *et al.*, 2005). A l'inverse, les souris *Prnp*^{-/-} présentent après hypoxie ou ischémie, des lésions plus étendues dans le cerveau (McLennan *et al.*, 2004, Sakurai-Yamashita *et al.*, 2005, Spudich *et al.*, 2005, Weise *et al.*, 2006). La région « octarepeat » de la PrP semblerait responsable de cette protection (Mitteregger *et al.*, 2007). L'effet neuroprotecteur de la PrP passerait également par un lien fonctionnel avec le récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate) par l'intermédiaire de la régulation de son activité. Ces récepteurs sont responsables notamment de la phase lente des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE). La présence de protéine prion mal conformée coïncide avec la dérégulation du récepteur favorisant alors une « cytodégénérescence » d'éléments de la substance grise et blanche du SNC (Zamponi et Stys, 2009).

Un rôle dans la signalisation impliquée dans la survie neuronale est également attribué à la protéine prion. Mouillet-Richard et coll ont montré par pontage chimique, avec un anticorps spécifique de la PrP, que dans la lignée neuronale 1C11, la protéine prion active la kinase p59Fyn *via* le recrutement de la cavéoline. Ceci déclenche la stimulation de la NADPH oxydase (augmentation des radicaux libres ROS) ainsi que l'activation des kinases ERK 1/2 de la voie des MAP kinases (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). L'activation des kinases ERK 1/2 peut être indépendante de la stimulation de NADPH oxydase, mais uniquement dans les cellules 1C11 différenciées (Figure 14).

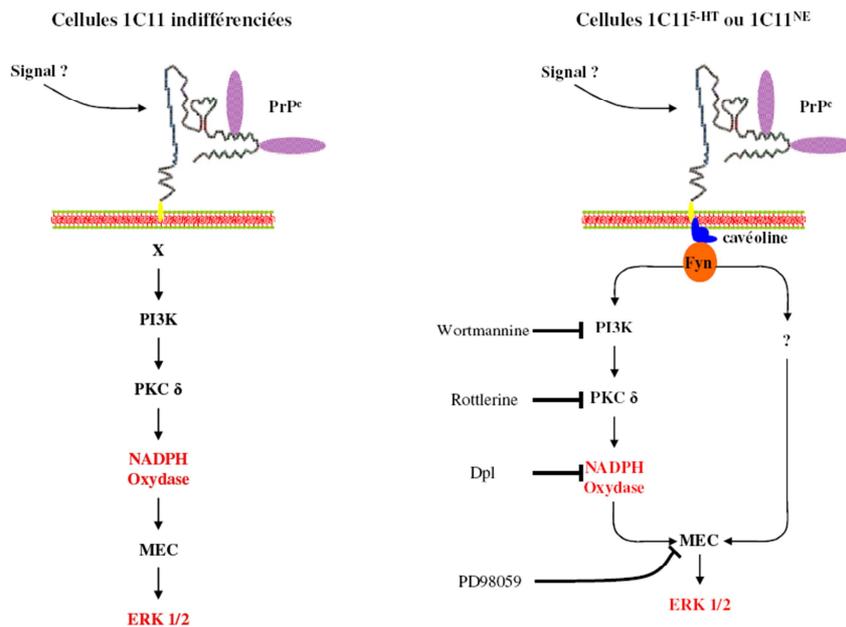


Figure 14 : Voie de signalisation impliquant la PrP dans la lignée 1C11. Cette représentation schématique a été réalisée en utilisant des inhibiteurs connus des intermédiaires de la voie de signalisation. Les cellules 1C11 peuvent se différencier en cellules 1C11 bioaminergiques distinctes, sérotoninergiques (HT) ou noradrénergiques (NE), d'après Schneider *et al.*, 2003.

La stimulation de la NADPH oxydase s'observe également dans la lignée hypothalamique neuroendocrine GT1 et la lignée lymphocytaire T BW5147 (Schneider *et al.*, 2003). Dans la lignée 1C11, la PrP provoque également l'altération des activités de certains récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines G (Mouillet-Richard *et al.*, 2005). Cette hiérarchie dans la cascade moléculaire ne semble pas toujours respectée car une étude montre que dans une lignée neuronale hypothalamique, l'internalisation de la PrP dans les cavéoles aurait pour conséquence l'activation de Fyn et la déphosphorylation de ERK 1/2, donc son inactivation (Tomasi, 2010).

La neuroprotection apportée par la protéine prion implique différentes voies métabolique qui sont reprises dans la Figure 15 (Roucou *et al.*, 2004).

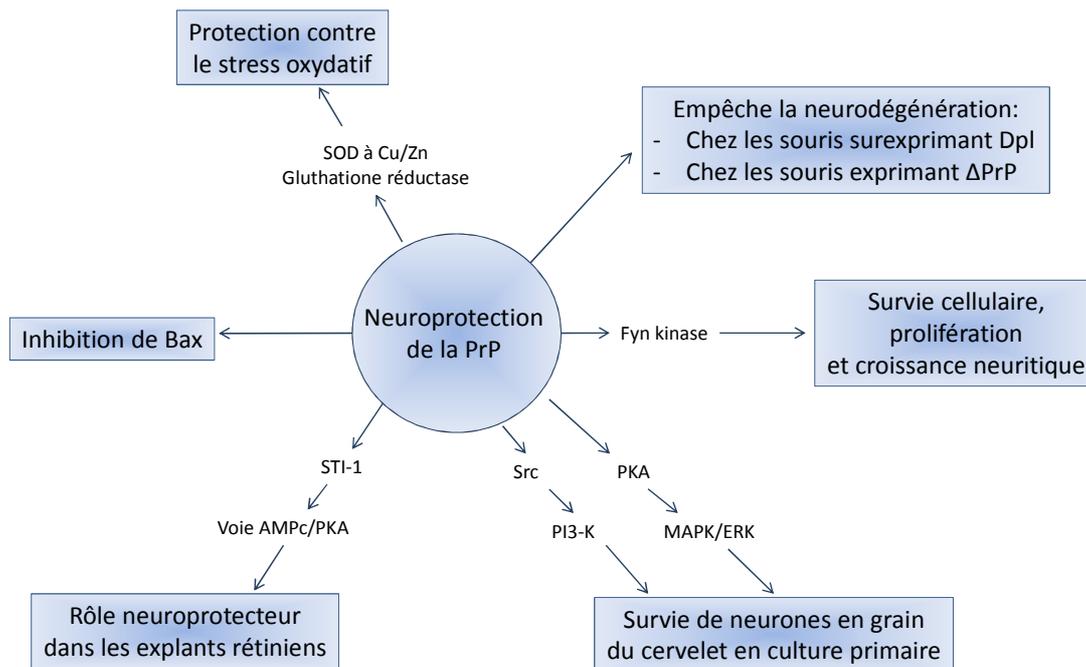


Figure 15 : Schéma récapitulant les fonctions neuroprotectrice de PrP, d'après Roucou *et al.*, 2004.

II.5.c. Implication de la PrP dans la synapse

La protéine prion est retrouvée localisée à la membrane le long des axones et majoritairement en position pré-synaptique (Fournier *et al.*, 1995, Tateishi, 1996, Sales *et al.*, 1998, Herms, J. *et al.*, 1999, Moya *et al.*, 2000, Barmada *et al.*, 2004). Différentes études lui attribuent un rôle dans la structure, la fonction et le maintien des synapses. Dans les souris transgéniques *Prnp*^{0/0}, la potentialisation à long terme (LTP) ainsi que l'inhibition rapide impliquant les récepteurs GABA A sont altérés (Collinge *et al.*, 1994, Manson, J. C. *et al.*, 1995). Une étude montre la corrélation entre l'expression de la PrP^C et la transmission glutamatergique dans l'hippocampe (Carleton *et al.*, 2001).

Ces souris *Prnp*^{0/0} ont également d'autres déficiences synaptiques avec la présence d'un défaut dans la post-hyperpolarisation dans les neurones CA1 et les neurones pyramidaux (Colling *et al.*, 1996, Mallucci *et al.*, 2002) et la réduction des courants potassiques dépendant du calcium dans les cellules de Purkinje (Herms, J. W. *et al.*, 2001). Des troubles du rythme circadien (Tobler *et al.*, 1996), des modifications de l'organisation des fibres nerveuses (Colling *et al.*, 1997), ainsi que des déficiences dans les processus d'apprentissage spatial (Criado *et al.*, 2005) ont été observés chez ces souris déficientes en protéine prion. Enfin, l'interaction entre la protéine prion et la protéine STI-1 au niveau des synapses pourrait avoir une influence sur la consolidation de la mémoire à court et long terme (Coitinho *et al.*, 2007). Des travaux récents décrivent la PrP comme un récepteur du peptide β -amyloïde au niveau de la synapse. Cette interaction favorise l'inhibition de la plasticité synaptique. La PrP serait alors un médiateur du dysfonctionnement synaptique lié à la maladie d'Alzheimer (Lauren *et al.*, 2009).

II.5.d. Adhésion et croissance neuronale

Au sein des rafts, la PrP recrute les NCAM et interagit directement avec elles. Cette interaction permet à la protéine prion dépourvue de domaine cytoplasmique d'activer la kinase p59^{fyn} par l'intermédiaire des NCAM afin de promouvoir la neuritogénèse (Beggs *et al.*, 1994, Santuccione *et al.*, 2005). La neuritogénèse peut également être stimulée par la PrP en utilisant la voie des MAP kinases lorsqu'elle interagit avec la laminine, une molécule d'adhésion importante (Graner *et al.*, 2000, Chen, S. *et al.*, 2003). La vitronectine, autre molécule de la matrice extracellulaire interagit avec la protéine prion favorisant la croissance axonale (Hajj *et al.*, 2007). Enfin, l'interaction de la PrP avec la molécule STI-1 qui active la voie des MAP Kinases est connue pour engendrer une croissance neuritique (Figure 16) (Lopes *et al.*, 2005, Americo *et al.*, 2007).

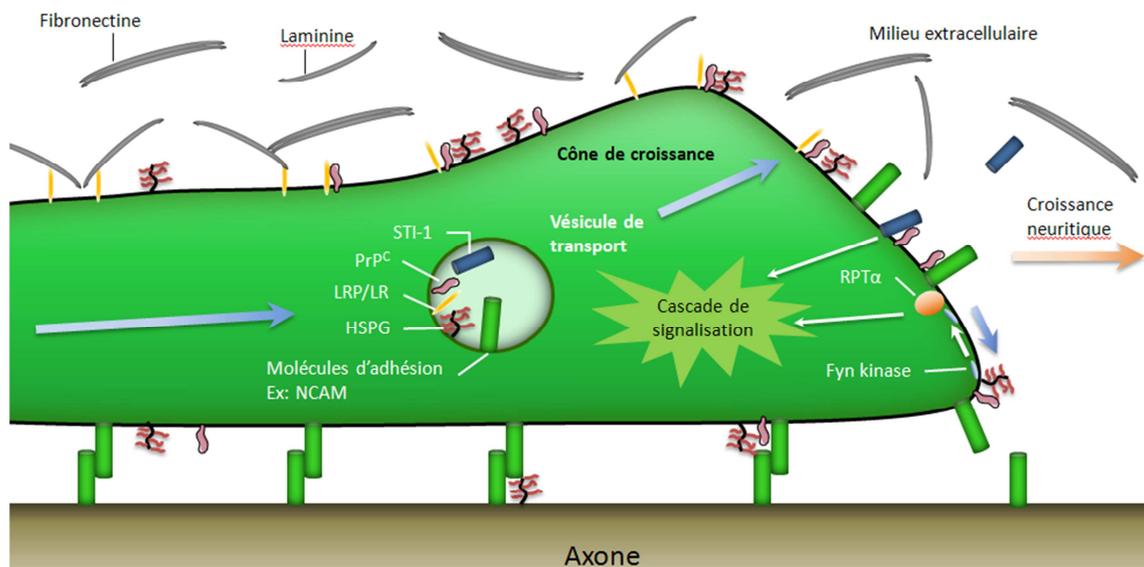


Figure 16 : Schéma représentant les interactions potentielles de la PrP^C associées à la croissance axonale. La PrP^C semble jouer un rôle important dans la pousse neuritique et la formation des synapses. La croissance neuritique est modulée par les interactions de la PrP^C avec les protéines NCAM et STI-1 lesquelles peuvent activer des voies de signalisation intracellulaire. Dans le cas de NCAM, cette voie de signalisation passe par l'activation de Fyn kinase. La PrP se lie aux protéoglycannes de type héparane sulfate, à la laminine et au récepteur de la laminine LRP/LR, connus pour leurs implications dans le contact inter-neurones et avec d'autres types cellulaires ainsi qu'avec la matrice extracellulaire. Ces molécules sont probablement transportées vers les cônes de croissance dans des vésicules, d'après Caughey et Baron, 2006

II.5.e. Rôle dans les cellules immunitaires

L'activation des lymphocytes T entrainerait un regroupement de la PrP avec des acteurs de l'activation comme CD3. Dans les lymphocytes, la PrP serait constitutivement sécrétée dans le milieu extracellulaire par clivage et ainsi transférée d'une cellule à une autre (Parizek *et al.*, 2001, Liu, T. *et al.*, 2002). D'autres types cellulaires libèrent de la protéine prion, comme les plaquettes grâce à des exosomes et des microvésicules (Perini *et al.*, 1996, Robertson *et al.*, 2006).

Bien que l'on connaisse l'existence de PrP extracellulaire, son rôle reste encore vague. Des souris transgéniques surexprimant la protéine prion présentent un thymus atrophié avec une diminution du nombre des cellules $T\alpha\beta$ et une augmentation des cellules $T\gamma\delta$ (Jouvin-Marche *et al.*, 2006). Ceci serait dû à un changement oxydatif de l'environnement engendré par la chélation trop importante de cuivre par la PrP^C.

La quantité importante de molécule intervenant dans l'adhésion cellulaire, la neuroprotection et la protection contre le stress oxydatif qui interagissent avec la PrP rendent peu lisibles et compréhensibles les fonctions de cette dernière (Tableau 3). Cependant l'expression ubiquitaire de la protéine prion tend à évoquer une diversité de fonction selon le tissu ou même le type cellulaire. Son expression temporelle augmente encore le champ des possibilités entre l'implication potentielle au cours du développement et au stade adulte avec la disparition et la création de nouvelles structures tissulaires.

Tableau 3 : Récapitulatif des différentes fonctions putatives ou connues qui ont été décrites de la protéine prion, d'après Caughey et Baron, 2006.

| Type cellulaire | Processus biologiques | Fonctions | Mécanismes, ligands et voies métaboliques |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Neurones | Neuritogénèse | Adhésion Signalisation | Recrutement des NCAM dans les rafts et activation de p59fyn (Santuccione <i>et al.</i> , 2005) Liaison à STI-1 activant les MAP kinases (Lopes <i>et al.</i> , 2005) Liaison au récepteur de la Laminine LRP/LR et aux protéoglycannes de type héparane sulfate (Hundt <i>et al.</i> , 2001) Liaison à la Laminine (Graner <i>et al.</i> , 2000) |
| | Synaptogénèse Polarisation Survie Effets trophiques | Signalisation Effet anti-apoptotique Effet pro-apoptotique | Activation, comme un facteur de croissance, de différentes voies (Kanaani <i>et al.</i> , 2005) Interaction avec BAX, STI-1 et NCAM (Roucou <i>et al.</i> , 2005, Lopes <i>et al.</i> , 2005, Chen <i>et al.</i> , 2003) Liaison avec Bcl-2 (Roucou <i>et al.</i> , 2005) |
| | Liaison au cuivre | Endocytose du cuivre Homéostasie du cuivre Activité SOD* | Pontage chimique avec des anticorps anti PrP (Solforosi <i>et al.</i> , 2003) Augmentation de l'expression de p53 (Roucou <i>et al.</i> , 2005) Induction de l'aggrégation de PrP ^C , entraîne l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine (Taylor <i>et al.</i> , 2005) Maintien de la concentration en cuivre au niveau des membranes pré-synaptiques et en condition de stress oxydatif (Vassalo <i>et al.</i> , 2003) Fixation du cuivre comme activité SOD (Vassalo <i>et al.</i> , 2003) |
| | Homéostasie redox | Signalisation | Induction de l'activité NADPH oxydase dépendante des ROS via p59fyn (Schneider <i>et al.</i> , 2003) |
| Cellules souches neuronales | Neurogénèse | Inconnue | Augmentation de la prolifération cellulaire dans les régions de champs neuroniques (Steele <i>et al.</i> , 2006) |
| | Différenciation | Inconnue | Différenciation positivement régulée par le niveau d'expression de la PrP ^C (Steele <i>et al.</i> , 2006) |
| Cellules souches hématopoïétiques | Renouvellement à long terme | Effet anti-apoptotique ? Ciblage | Mécanismes potentiels : Transduction du signal de survie, adhésion cellulaire, co-récepteur pour les hormones agissant sur l'activité HSC (Zhang <i>et al.</i> , 2006) |
| Cellules T | Activation | Signalisation ? | Surexpression de la PrP suite à l'activation mitogénique (Cashman <i>et al.</i> , 1990) |
| | Développement | Effet Antioxydant | Fixation du cuivre dans le thymus (Jouvin-Marche <i>et al.</i> , 2006) |
| Leucocytes | Différenciation | Inconnue | Expression de la PrP ^C (Dodelet et Cashman, 1998) |
| | Phagocytose | Inconnue | Modulation de la phagocytose (De almeida <i>et al.</i> , 2005) |
| Cellules pancréatiques | Réponse inflammatoire | Ciblage | Altération du recrutement sur les sites d'inflammations (De almeida <i>et al.</i> , 2005) |
| | Régulation transcriptomique | | Interaction avec la protéine histone H3 (Storm <i>et al.</i> , 2010) |

III. La protéine prion pathologique

III.1. PrP^C-PrP^{Sc}, une seule séquence mais deux structures tridimensionnelles

La PrP^{Sc} (Sc pour scrapie) est le conformère pathologique de la protéine PrP cellulaire non pathologique ou PrP^C. La PrP^C et la PrP^{Sc} sont codées par le même gène et possèdent une structure primaire identique. La présence d'un seul transcrit permet d'exclure un épissage alternatif comme responsable de la présence de PrP^{Sc} (Basler *et al.*, 1986). Les deux protéines subissent des modifications post-traductionnelles consistant en l'addition de *N*-glycannes, d'une ancre GPI, et formation d'un pont disulfure entre les cystéines 182 et 217. La différence entre les deux protéines se fait sur leur structure tridimensionnelle avec une proportion d'hélices alpha et de feuillets bêta remarquablement changée. En effet, la PrP^C est constituée de 3 hélices α et 2 feuillets β antiparallèles alors que la PrP^{Sc} comporte 2 hélices α et un nombre de feuillets β supérieur (Figure 17).

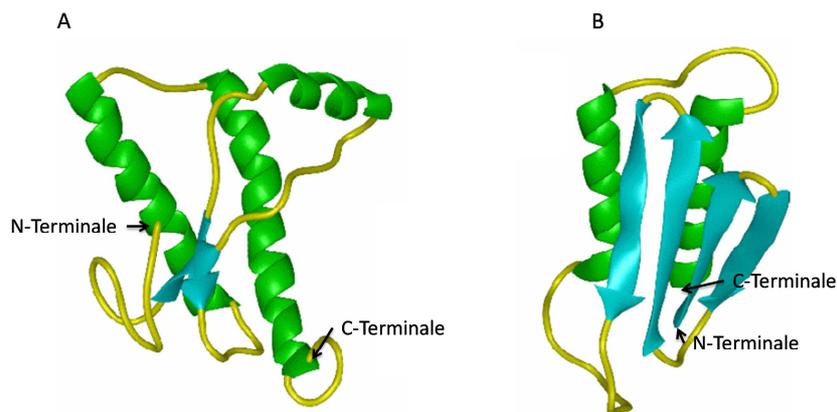


Figure 17 : Représentation tridimensionnelle des protéines PrP^C (A) et modèle de PrP^{Sc} (B). Les N-Glycannes et l'ancre GPI ne sont pas représentés. <http://www.uvm.edu/~wschaeff/101PrionsMadCow.html>.

Les proportions relatives en hélices α et feuillets β sont déterminées par dichroïsme circulaire (Tableau 4). Cependant, la structure précise de la PrP^{Sc} n'a pu être établie car elle est insoluble dans les détergents non ioniques du fait des changements de caractéristique biochimique induit par la transconformation. La résolution de la structure d'un prion de champignon (HET-s) a montré l'établissement d'une hélice β (Wasmer *et al.*, 2008) suggérant l'existence de cette structure chez la PrP^{Sc} de mammifères. Ces résultats vont dans le sens d'études précédentes réalisées par cristallographie et modélisation théorique évoquant cette possibilité (Wille *et al.*, 2002, Govaerts *et al.*, 2004). L'hélice α_2 de la PrP^C posséderait un potentiel supérieur aux hélices α_1 α_3 dans la participation à la formation de cette hélice β (Ji et Zhang, 2010) (Figure 18).

Tableau 4 : Comparaison des propriétés physico-chimique de la PrP^C et PrP^{Sc}, d'après Stahl *et al.*, 1987, Caughey et Raymond, 1991, Pan, K. M. *et al.*, 1993, Safar *et al.*, 1993.

| | PrP ^C | PrP ^{Sc} |
|---|------------------|-------------------|
| % hélice α | 42 | 30 |
| % feuillet β | 3 | 42 |
| Résistance à la PK | - | + |
| Solubilité dans les détergents non ioniques | + | - |
| Hydrophobicité | - | + |
| Agrégation | - | + |
| Clivage PI-PLC | + | - |
| Demi-vie | 3 à 6 h | + de 24 h |

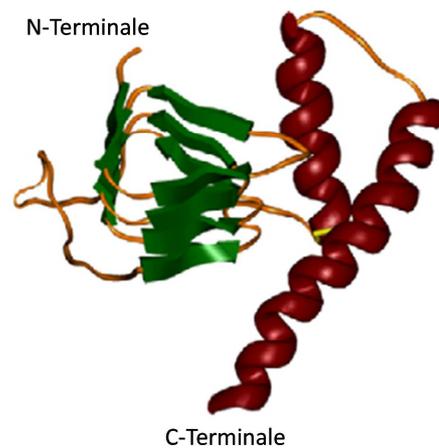


Figure 18 : Modèle proposé de la PrP^{Sc} structuré avec une hélice β . Les N-glycannes et l'ancre GPI ne sont pas représentés, d'après Cervia *et al.*, 2006.

Toute la structure de la PrP^C ne semble pas avoir la même importance dans le processus de formation des feuillets β de la PrP^{Sc}. Des études de microscopie électronique (EM), de dichroïsme circulaire (DC), de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de simulation de dynamique moléculaire (DM) ont montré que les résidus 106-126 étaient capables de former une structure stable formée de deux feuillets β parallèles de quatre brins (Kuwata *et al.*, 2003). De même, les résidus 89-143 montrent une instabilité au sein de la protéine native (Nguyen et Hall, 2005, Barducci *et al.*, 2005) et une analyse par RMN à l'état solide révèle qu'ils peuvent former des agrégats riches en structures β , que ce soit à partir de la séquence sauvage ou de mutants (Tagliavini *et al.*, 1994, Laws *et al.*, 2001). Au sein de cette région, ce sont plus particulièrement de courtes séquences correspondant aux acides aminés 102 à 116 et 120 à 128 qui présentent une résistance à la digestion par la protéinase K. Il a également été montré, qu'en plus de ces courtes séquences, la séquence d'acides aminés 143 à 150 présente les mêmes caractéristiques (Sajani *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que ces courtes séquences seraient organisées en brins β . Tout ceci tend à montrer l'importance de la partie N-terminale de la protéine prion dans la formation des structures β de la

PrP^{Sc}. La partie C-terminale n'est pas exempte de toute implication, car on observe une diminution de la proportion d'hélices α entre la PrP^C et la PrP^{Sc}. Dans cette partie, il a été montré que la région correspondant à l'hélice α_2 pouvait se modifier en structure β (Yamaguchi *et al.*, 2008, Ji et Zhang, 2010). Il résulte de ces différentes études, qu'en fonction des techniques utilisées pour déterminer la structure tridimensionnelle de la PrP^{Sc} les résultats varient sensiblement (Requena, 2009).

Les modifications structurales de la PrP^{Sc} lui confèrent diverses propriétés importantes :

- La PrP^{Sc} présente une résistance partielle à la digestion par la protéinase K qui clive la partie N-terminale de la protéine, générant un fragment de 27 à 30 kDa nommé PrP²⁷⁻³⁰ ou PrP^{res} (Figure 19).

- L'insolubilité de la protéine PrP^{Sc} entraîne son agrégation sous forme de fibrilles amyloïdes extrêmement infectieuses (Prusiner, 1998, Silveira *et al.*, 2005). La digestion d'un homogénat de cerveau infectieux par la protéinase K en condition non dénaturante permet de mettre en évidence ces fibrilles insolubles (Figure 20) nommées SAF (Scrapie Associated Fibrils) ou Prion rods (Prusiner, 1998).

Bien que les deux formes de prion possèdent une ancre GPI, seule la PrP^C est sensible à un traitement par la phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC), libérant la protéine prion dans le milieu extracellulaire (Stahl *et al.*, 1987).

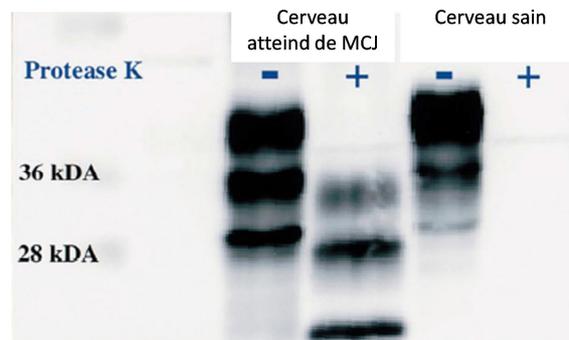


Figure 19 : Résistance partielle de la PrP^{Sc} à la digestion par la protéinase K. Une protéolyse partielle de la PrP^{Sc} (extrait de cerveau d'un patient atteint de MCJ par la protéinase K) génère des fragments de plus faible poids moléculaire. Le décalage est détectable par migration sur gel SDS-PAGE, d'après Glatzel et Aguzzi, 2001.

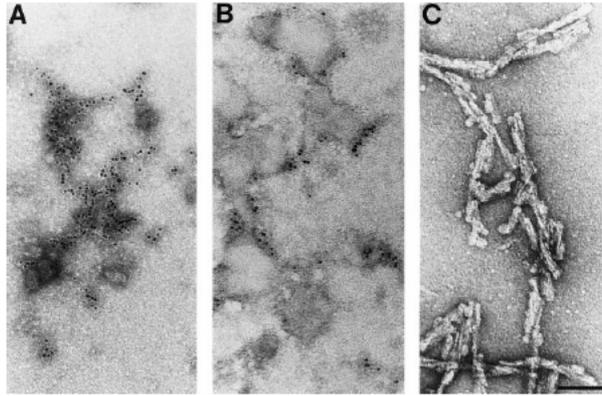


Figure 20 : Visualisation par micrographie électronique de la PrP. Microscopie électronique d'une contre coloration négative après immunodétection par un anticorps anti-prion couplé à des billes d'or. **(A)** PrP^C, **(B)** PrP^{Sc}. Aucune des deux formes ne produit de structures ordonnées. **(C)** SAF ou rods de PrP 27-30 après contre coloration négative (Barre = 100 nm), d'après Prusiner, 1998.

III.2. Les différents mécanismes de conversion

Il existe actuellement plusieurs modèles décrivant le processus de transconformation de la protéine prion. Un premier modèle dit de nucléation polymérisation, un second dit auto-catalytique et un troisième dit de nucléation assistée. Un point commun à tous ces modèles est la présence obligatoire de PrP^C pour permettre l'apparition de la pathologie. Les souris déficientes pour le gène *Prnp* sont résistantes à l'infection (Bueller *et al.*, 1993).

III.2.a. Modèle de nucléation-polymérisation

Dans ce modèle, à l'état initial, la PrP^C et la PrP^{Sc} sont présentes dans un équilibre thermodynamiquement favorable à la PrP^C (Jarrett et Lansbury, 1993, Kocisko *et al.*, 1994) (Figure 21). La PrP^{Sc} seule ne serait pas infectieuse du fait de son expression ubiquitaire et ne serait qu'une forme mineure et transitoire nécessitant une agrégation pour être stabilisée. L'infectiosité serait due à l'agrégation de PrP^{Sc} formant un ensemble très ordonné (plaque amyloïde). La première étape, très lente, consisterait en l'établissement d'un centre de nucléation qui serait alors à même de recruter des molécules de PrP^{Sc} de façon beaucoup plus rapide jusqu'à former des plaques amyloïdes qui, fragmentées, seraient extrêmement infectieuses. Cette hypothèse est confortée par des travaux montrant que des oligomères de moins de six molécules de PrP^{Sc} ne présentent pas d'infectiosité chez le hamster syrien et que l'infectiosité maximum correspond à des oligomères comprenant entre 14 et 18 unités de PrP^{Sc} (Silveira *et al.*, 2005).

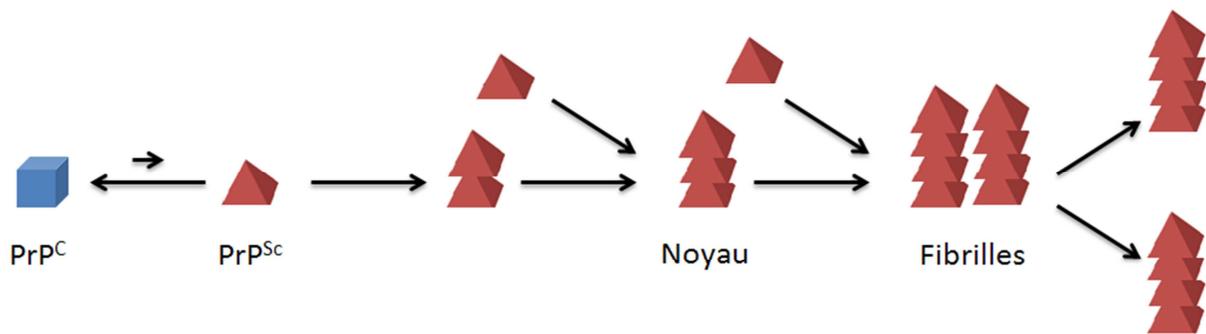


Figure 21 : Modèle de nucléation-polymérisation. La PrP^C et la PrP^{Sc} sont dans un état d'équilibre thermodynamique réversible très favorable à la PrP^C. Le recrutement de nouvelles molécules de PrP^{Sc} n'est possible que s'il y a eu au préalable formation d'un noyau de nucléation très ordonné. La formation du noyau est un processus très lent comparativement au recrutement de molécules de PrP^{Sc} qui permet la formation d'un noyau infectieux. Par la suite, se forme des fibrilles qui se fragmentent en de nombreux noyaux infectieux, d'après Aguzzi et Polymenidou, 2004, Zou et Gambetti, 2005).

III.2.b. Modèle autocatalytique

Contrairement au modèle précédent, dans ce modèle la protéine prion cellulaire ne pourrait pas naturellement se transconformer en PrP^{Sc} du fait d'une barrière énergétique trop importante (Figure 22). La modification de conformation ne serait possible qu'en cas de contact entre la PrP^C endogène et de la PrP^{Sc} exogène. Cette dernière contiendrait les informations nécessaires pour que la PrP^C se modifie structuralement. La première étape conduirait à la formation d'un hétérodimère PrP^C-PrP^{Sc} entraînant la transconformation de la PrP^C. Il en résulterait un homodimère PrP^{Sc}-PrP^{Sc} infectieux capable de s'agréger avec d'autres homodimères pour former des structures d'ordre supérieur (Griffith, 1967, Prusiner, 1991, Aguzzi et Polymenidou, 2004, Zou et Gambetti, 2005). Ces derniers auteurs suggèrent la participation d'une protéine X pour faciliter la conversion.

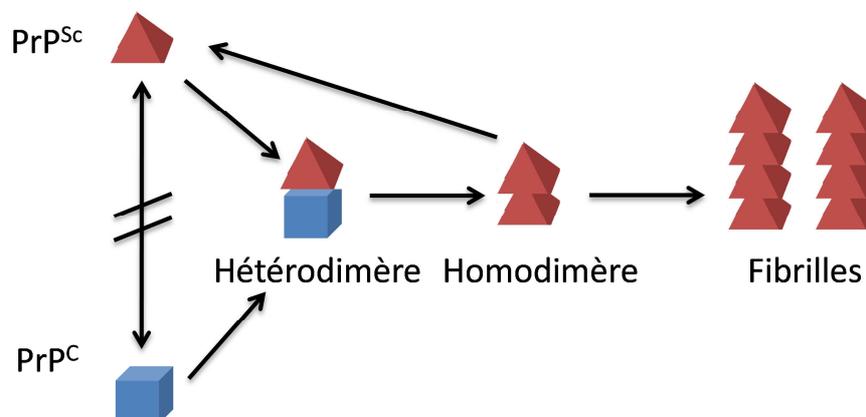


Figure 22 : Modèle autocatalytique. Selon le modèle, la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} n'est possible que par l'établissement d'un hétérodimère PrP^C-PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} imposerait sa conformation à la PrP^C formant alors un homodimère capable de s'agréger pour former des fibrilles, d'après Aguzzi et Polymenidou, 2004

III.2.c. Modèle de nucléation assistée

Ce dernier modèle, plus récemment proposé, ferait intervenir un état structural intermédiaire (PrP^*) entre la forme cellulaire et la forme « scrapie » de la protéine prion (Soto, 2003). Cet état intermédiaire serait obtenu suite à l'interaction de la PrP^C avec un facteur de conversion X (Figure 23). Dans ce modèle, la PrP^{Sc} n'existerait qu'à l'état oligomérique et serait le résultat de contact entre plusieurs PrP^* . Par ailleurs, l'oligomère de PrP^{Sc} serait capable d'incorporer des molécules de PrP^* et de les transformer en PrP^{Sc} .

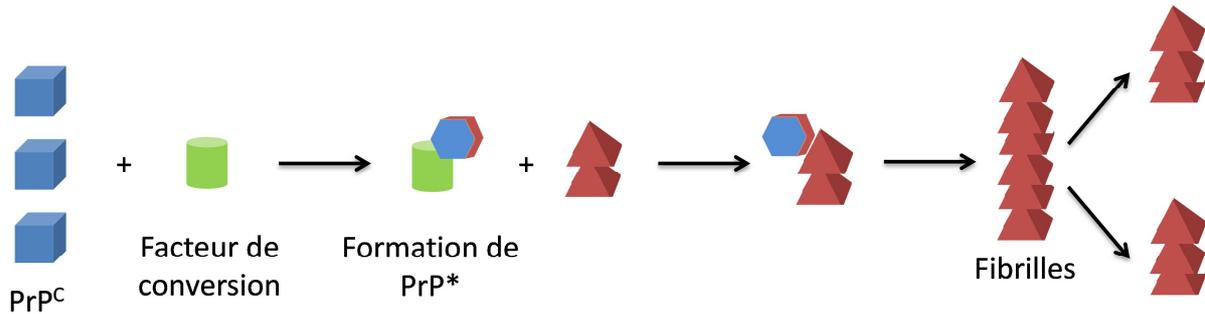


Figure 23 : Modèle de nucléation assistée. Ce modèle repose sur le fait que la PrP^{Sc} n'existe pas sous forme monomérique. La néosynthèse de PrP^{Sc} nécessite la formation d'un intermédiaire PrP^* obtenu à l'aide d'un facteur de conversion endogène, d'après Aguzzi et Polymenidou, 2004.

III.3. Sites de conversion

La non apparition d'ESST dans les souris KO pour le gène *Prnp* indique clairement que la présence de la protéine prion cellulaire est indispensable au développement de la pathologie. Cela implique aussi que les sites potentiels de conversion ne peuvent être que des sites de localisation de la PrP^C (Moudjou *et al.*, 2001). En effet, une forte proximité de la PrP^{Sc} exogène avec la PrP^C impose un changement de conformation à cette dernière. Tout au long de son métabolisme, la protéine prion cellulaire passe par différents compartiments cellulaires qui sont autant de lieux potentiels de rencontre avec la PrP^{Sc} (Figure 24). Le principal site de formation de PrP^{Sc} est la membrane plasmique et plus précisément les rafts lipidiques. En effet, les protéines PrP^C et PrP^{Sc} y sont présentes simultanément (Naslavsky *et al.*, 1997) et les travaux de Baron et coll., montrent que la transconformation ne peut se faire que si la PrP^{Sc} est également enchâssée dans la membrane (Baron *et al.*, 2002).

La déplétion en cholestérol des rafts lipidiques aboutit à l'inhibition de la formation de PrP^{Sc} sans modifier la localisation de la PrP^C (Taraboulos *et al.*, 1995, Sarnataro *et al.*, 2002). La composition des rafts lipidiques est donc importante à la fois pour la transconformation de la protéine PrP^C et également, pour leur capacité à concentrer un nombre important de protéines prion

cellulaire, ce qui augmenterait la probabilité de contact entre la PrP^C et la PrP^{Sc} (Baron *et al.*, 2002, Sarnataro *et al.*, 2002). Campana et coll. ont même émis l'hypothèse selon laquelle les rafts pourraient modifier la conformation de la PrP^C en une forme plus facilement convertible en PrP^{Sc} (Campana *et al.*, 2005).

Les PrP^C et PrP^{Sc} cohabitent dans d'autres compartiments subcellulaires qui de ce fait sont des lieux potentiels de conversion (Borchelt *et al.*, 1992). C'est le cas des endosomes qui participent au recyclage de la protéine prion (Magalhaes et al, 2002, Sunyach et al, 2003, Pimpinelli et al, 2005, Godsave et al, 2008) et du réticulum endoplasmique (Campana *et al.*, 2005) ou suite au transport rétrograde dépendant de la protéine Rab6, la PrP^{Sc}, serait alors en capacité de transconformer la PrP^C en cours de synthèse (Beranger *et al.*, 2002).

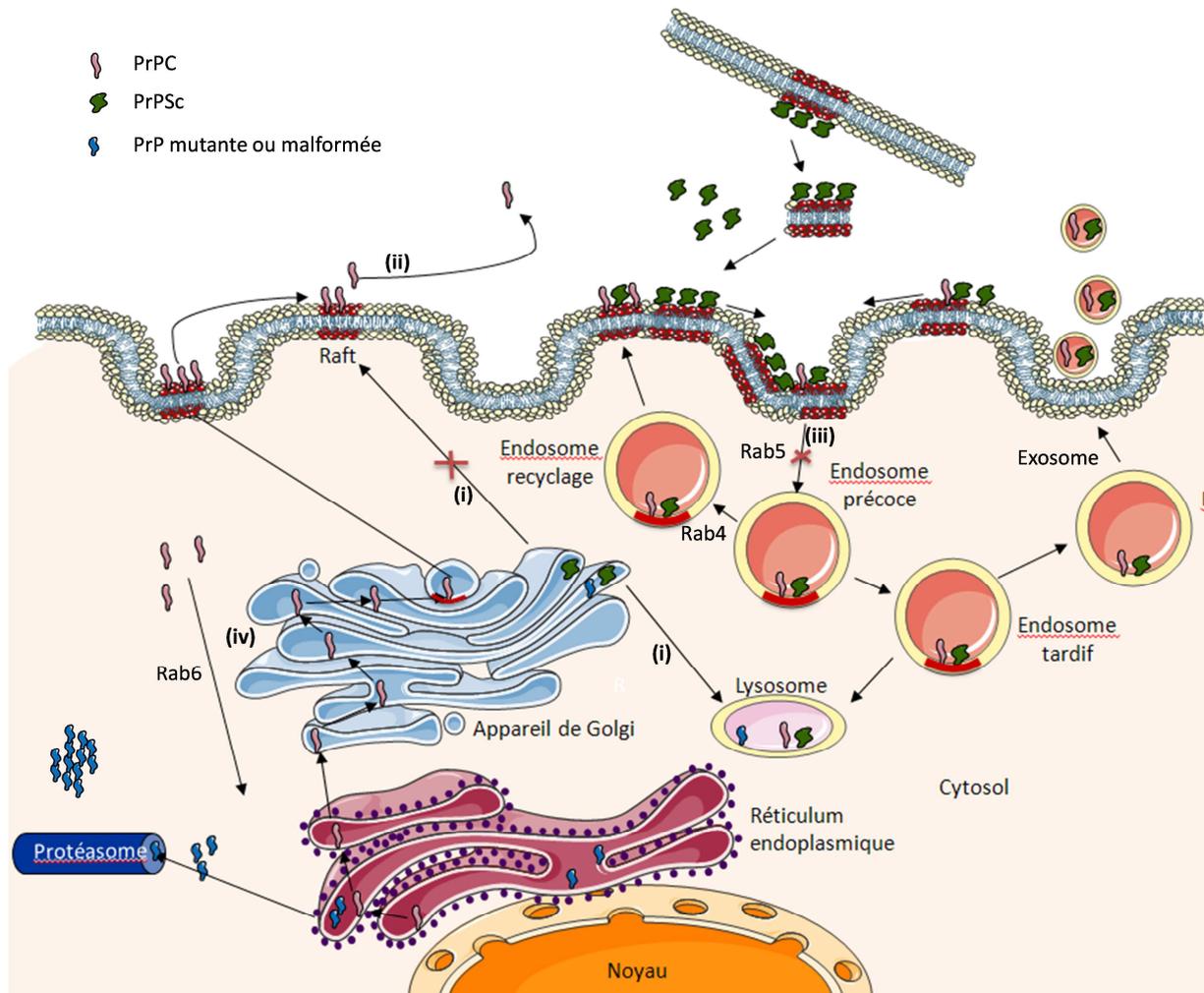


Figure 24 Les différents lieux potentiels de transconformation. La PrP^C est synthétisée dans le RE. Des formes anormalement repliées ou issues de mutation (PrP mutante) sont partiellement dégradées par le protéasome. De la PrP^C a été retrouvée dans le cytosol de neurones et des agrégats de PrP mal repliée ont également été mis en évidence. Les protéines prion cellulaires bien repliées sont dirigées vers la surface cellulaire dans les rafts lipidiques après passage par l'appareil de Golgi. Le blocage du transport de la protéine vers la membrane (i) et sa redirection vers le compartiment lysosomal pour y être dégradée ainsi que sa libération dans le milieu extracellulaire (ii) empêche la formation de PrP^{Sc}. Une diminution de l'internalisation de la PrP^C (iii) réduit quant à elle la formation de PrP^{Sc}. La PrP^C et la PrP^{Sc} sont retrouvées dans les endosomes précoces Rab5-positifs, passent par des endosomes tardifs pour être dégradées totalement (PrP^C) ou partiellement (PrP^{Sc}) dans les lysosomes. Une partie de la PrP^C est recyclée à la membrane par une voie Rab4 dépendante ce qui explique la présence de PrP^C et PrP^{Sc} associées aux membranes issues des exosomes dans le milieu extracellulaire des cellules infectées. Enfin, le RE est pressenti pour jouer un rôle dans la conversion en tant que lieu d'amplification de la formation de PrP^{Sc} suite au transport rétrograde Rab6 dépendant (iv). D'après Campana *et al.*, 2005.

III.4. Propagation de l'agent infectieux

Les ESST sont transmissibles par injections intraveineuses et intrapéritonéales (Kimberlin et Walker, 1978), par injection intraoculaire (Fraser, 1982), par instillation conjonctivale (Scott, M. *et al.*, 1993) ou par ingestion (Anderson *et al.*, 1996).

Au cours des pathologies à prion, la PrP^{Sc} s'accumule particulièrement dans le SNC, cependant, d'autres tissus hébergent également la protéine pathologique. Parmi ceux-ci, on trouve les nerfs périphériques, les muscles, la langue, la peau, le rectum, les yeux et les organes lymphoïdes tels que la rate, les amygdales et ganglions lymphoïdes (Kimberlin et Walker, 1989, Hill *et al.*, 1999, McBride *et al.*, 2001, Wadsworth *et al.*, 2001, Bosque *et al.*, 2002, Haik *et al.*, 2003, Androletti *et al.*, 2004, Hilton *et al.*, 2004, Mulcahy *et al.*, 2004, Thomzig *et al.*, 2007).

Les ESSTs ont en commun une très longue période d'incubation asymptomatique, durant laquelle aucune réaction du système immunitaire n'est mise en place. Cette passivité du système immunitaire n'exclut pas la participation du système lymphoréticulaire (SLR) dans la propagation de la maladie.

L'atteinte du cerveau par l'agent pathogène se fait par deux voies : la voie nerveuse rétrograde et la voie vasculaire (Hammarstrom, 2007). La présence importante et précoce de la PrP^{Sc} dans les organes lymphoïdes secondaires oriente dans le sens d'une propagation par voie vasculaire. Cette multiplicité de sites d'amplification permettrait l'augmentation du nombre de contacts avec le système nerveux sachant que la PrP^{Sc} l'utilise pour progresser vers le cerveau dans des conditions non encore élucidées (Heikenwalder *et al.*, 2007) (Figure 25).

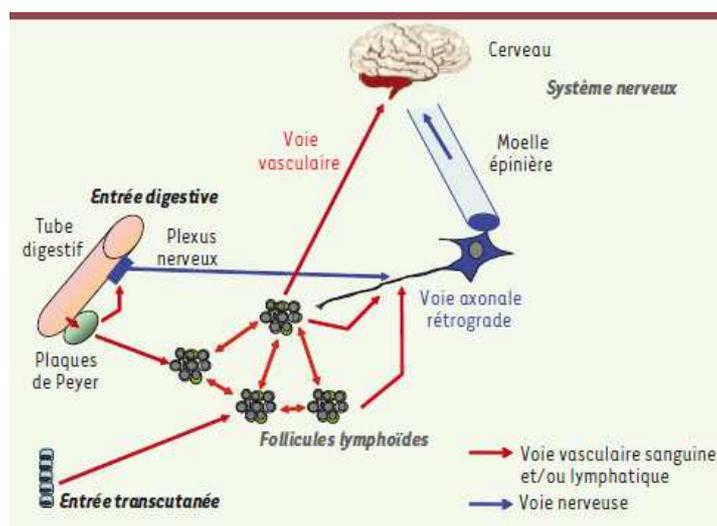


Figure 25 : Voies périphériques de la propagation des prions. La propagation progressive à l'ensemble du tissu lymphoïde par voie vasculaire (flèches rouges) multiplie les sites potentiels de neuro-invasion, d'après Bachy et Aucouturier, 2010.

III.4.a. Franchissement de la barrière intestinale

La voie orale est responsable de la dissémination de la majorité des formes épidémiques d'EST que cela soit la tremblante du mouton, ESB, la dégénérescence chronique des cervidés d'Amérique du nord ou bien le vMCJ. Dans ce type de contamination, la PrP^{Sc} doit franchir, dans une première étape, la barrière intestinale. Par la suite, l'agent infectieux gagne les plaques de Peyer et l'appendice où il s'accumule, atteint la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales et enfin le système nerveux.

Le franchissement de la barrière intestinale constitue une étape importante car il s'agit d'une des portes d'entrées vers le milieu interne. La muqueuse intestinale est recouverte de cellules épithéliales reliées par des jonctions serrées. Au sein de ces cellules épithéliales, se trouvent des cellules M qui ont pour rôle de permettre le transport trans-épithélial de molécules (Neutra et al, 1996). *In vivo* ces cellules ont la capacité de fixer la PrP^{Sc}, de l'endocyter et de la transmettre aux phagocytes et aux cellules dendritiques des plaques de Peyer. Cette capacité est accrue au niveau de l'appendice (Foster et Macpherson, 2010) (Figure 26).

D'autres modes d'entrée de la PrP^{Sc} dans la muqueuse intestinale ont été mis à jour, notamment par endocytose associée à la ferritine au niveau des cellules épithéliales (Mishra *et al.*, 2004, Sunkesula *et al.*, 2010). La ferritine semble intervenir dans la conservation de l'infectiosité. En se complexant à la PrP^{Sc}, elle augmenterait la résistance aux enzymes digestives.

La dernière voie d'entrée de la PrP^{Sc} dans la muqueuse intestinale fait intervenir les cellules dendritiques. Ces cellules ont la capacité de disjoindre les jonctions serrées des cellules épithéliales grâce à des projections cytoplasmiques qui peuvent capter la PrP^{Sc} présente dans la lumière intestinale. L'implication des cellules dendritiques dans le franchissement de la barrière intestinale par la PrP^{Sc} a été montrée par l'utilisation de modèles de tremblante expérimentale murine (souches ME7 et 139A). La déplétion des cellules dendritiques inhibe l'accumulation de protéine prion « scrapie » au niveau des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques méésentériques, avec pour conséquence l'absence de déclaration de la maladie dans la moitié des cas et un retardement dans l'autre moitié (Raymond *et al.*, 2007).

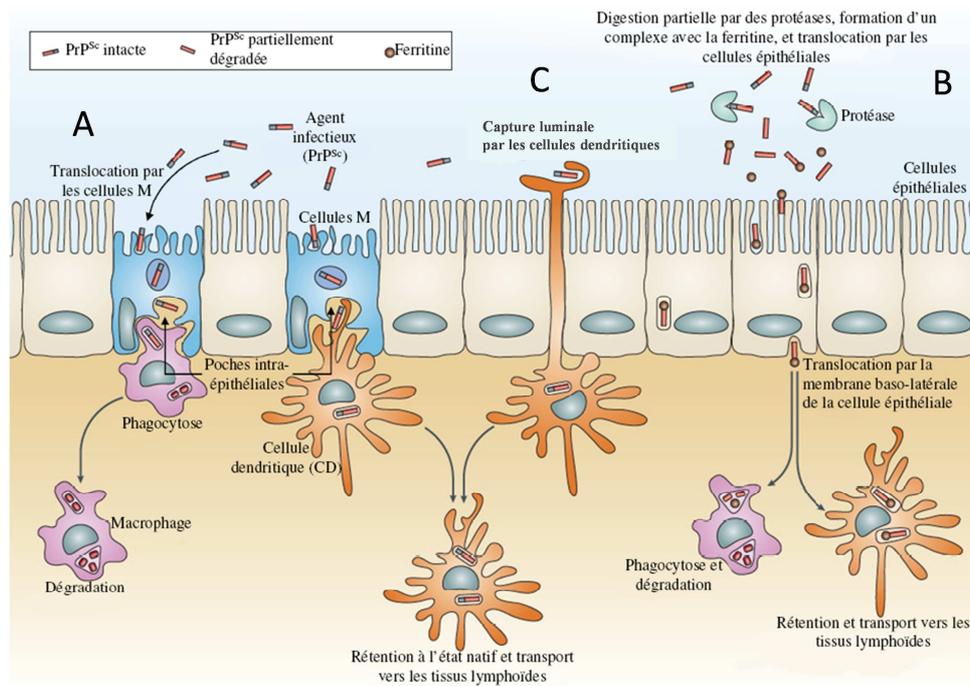


Figure 26 : Mécanismes potentiels de translocation de l'agent responsable des ESST : la PrP^{Sc}. (A) L'épithélium intestinal est protégé par une couche de cellules épithéliales liées par des jonctions serrées. Au sein de ces cellules, les cellules M sont spécialisées dans le transport de macromolécules et de particules. Elles permettraient à la PrP^{Sc} de franchir l'épithélium intestinal. (B) 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 transcyter par les cellules épithéliales elles-mêmes. (C) 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.

III.4.b. Invasion des tissus lymphoïdes

Une voie de migration de la PrP^{Sc} vers les tissus lymphoïdes a clairement été montrée et s'effectue suite à la migration des cellules dendritiques infectées vers ces tissus. Cette voie de propagation reste toutefois marginale et d'autres modes de transfert sont utilisés comme le montrent diverses études (Levavasseur *et al.*, 2007).

De par leur titre infectieux au cours de maladies à prion, les lymphocytes B et T spléniques pourraient être de bons candidats pour ce rôle de transfert de l'infectiosité. Au niveau des tissus lymphoïdes, la PrP^{Sc} s'accumule dans les centres germinatifs des cellules B, dans les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et également dans les macrophages (Kitamoto *et al.*, 1991). Les FDC sont le siège d'une accumulation importante de la protéine prion pathologique, sûrement à cause de la forte expression de PrP endogène. L'accumulation de la PrP^{Sc} s'effectue autour du plasmalemme (Figure 27) et des espaces extracellulaires des dendrites (Jeffrey *et al.*, 2000, Mabbott, 2004, Flores-Langarica *et al.*, 2009). A ce jour, aucune preuve relative à une synthèse de PrP^{Sc} dans ces cellules n'a été rapportée, la PrP^{Sc} accumulée aurait donc une origine exogène aux FDC (Bachy et Aucouturier, 2010).

Une dédifférenciation des FDC par de la lymphotoxine-b augmente la durée d'incubation d'une tremblante expérimentale murine (Mabbott *et al.*, 2000, Montrasio *et al.*, 2000), ce qui signifie que l'amplification de PrP^{Sc} au sein de ces cellules aurait pour but d'obtenir un titre infectieux local suffisant pour la neuro-invasion (Bachy et Aucouturier, 2010). Cette présence de PrP^{Sc} dans le système lymphoïde périphérique, bien que très souvent observée, n'est pas obligatoire. Dans certain cas d'ESST, aucune PrP^{Sc} n'a été détectée dans la rate, chez le bovin (Somerville *et al.*, 1997) et chez l'ovin génotypé VRQ/ARR (Beekes et McBride, 2007).

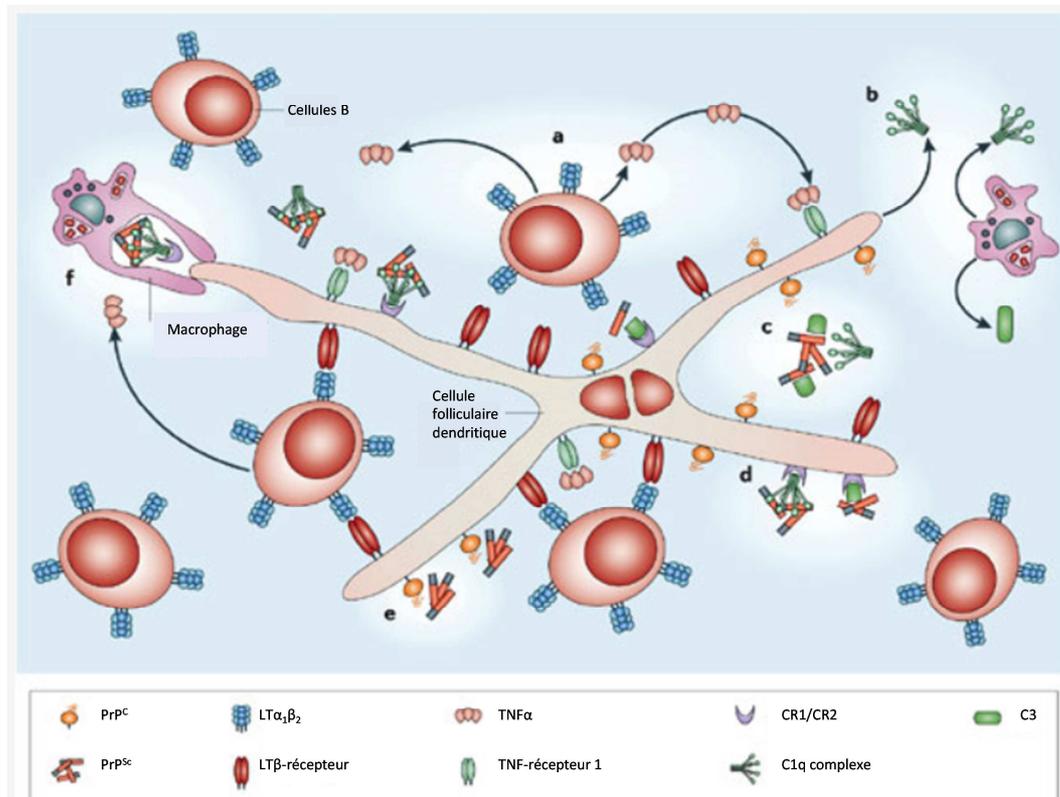


Figure 27 : Modèle de composants cellulaires et moléculaires de la pathogénèse des ESSTs au sein des tissus lymphoïdes. (a) Les cytokines produites par les cellules B produisent un stimulus important induisant la maturation et le maintien des cellules folliculaires dendritiques (FDC) dans leur état différencié. En l'absence de cellules B ou de lymphotoxine (LT), les FDCs ne peuvent pas mûrir et l'accumulation de l'agent des ESSTs dans les tissus lymphoïdes est bloquée. (b,c) La façon dont les FDC acquièrent l'agent infectieux n'est pas caractérisée. Comme une déficience en composant du complément comme C1q et C3 bloque l'accumulation de l'agent des ESSTs dans la rate, et que C1q peut fixer une protéine prion conformationnellement modifiée, des hypothèses récentes suggèrent que juste après l'exposition, l'agent infectieux est opsonisé par les composants du complément. (d) Ce complexe agent-complément pourrait potentiellement être capté par les récepteurs au complément (CR1/CR2) à la surface des FDCs. (e) Il est plausible que la PrP^C à la surface des FDCs agisse également comme récepteur pour la PrP^{Sc}. (f) Les excroissances des macrophages captent également la PrP^{Sc} au contact des cellules B. Bien que la participation des macrophages dans les pathogénies à prion ne soit pas clairement établie, ils pourraient phagocyter l'agent infectieux présenté par les FDCs et le dégrader, d'après Mabbott et MacPherson, 2006.

III.4.c. Neuro-invasion

Les cellules dendritiques, outre leur implication dans le franchissement de la barrière intestinale et le transport vers les organes lymphoïdes périphériques, interviennent également dans la "course" de la PrP^{Sc} vers le système nerveux. Elles sont capables de mettre en contact la PrP^{Sc} accumulée avec des sites de neuro-invasion (Aucouturier *et al.*, 2001) par la sécrétion d'exosomes (Fevrier *et al.*, 2005) et la production de nanotubes formant des tunnels pouvant entrer en contact avec des cellules nerveuses (Gousset et Zurzolo, 2009). De plus, la capacité des cellules dendritiques à franchir la barrière hémato-encéphalique indique qu'une infection directe du système nerveux central ne serait pas à exclure (Rosicarelli *et al.*, 2005). La multiplicité des sous-populations et la diversité des rôles que jouent les cellules dendritiques vont dans le sens que seules certaines sous populations seraient impliquées (Sethi *et al.*, 2007).

Savoir comment la PrP^{Sc} atteint le système nerveux périphérique (SNP) à partir des organes lymphoïdes et particulièrement la rate est la question principale qui se pose aujourd'hui.

Les contacts synaptiques entre les cellules FDC responsables de l'accumulation de la PrP^{Sc} et les nerfs spléniques sont rares. Outre leur rareté, la distance entre eux semble importante car une réduction de celle-ci augmente la vitesse de propagation vers le SNC (Prinz *et al.*, 2003). Différentes hypothèses sont avancées comme un transfert direct depuis les FDC aux nerfs au travers d'exosomes, ou par des contacts indirects grâce aux cellules dendritiques mobiles, sachant qu'elles ont potentiellement la capacité de transmettre l'agent infectieux directement dans le SNC (Aucouturier *et al.*, 2001, Fevrier *et al.*, 2005).

III.4.d. Propagation et accumulation dans le système nerveux central

Dans le cas de la tremblante du mouton et du vMCJ, la neuro-invasion semble liée au système nerveux entérique (Haik *et al.*, 2003, Heggebo *et al.*, 2003). La propagation de la PrP^{Sc} au sein du SNP et du SNC est dépendante de l'expression de la PrP^C (Blattler *et al.*, 1997, Glatzel et Aguzzi, 2000).

Après accumulation dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (Gut-Associated Lymphoid Tissue : GALT), la PrP^{Sc} peut emprunter, par voie rétrograde, deux voies d'invasion différentes pour atteindre le système nerveux central (McBride *et al.*, 2001) :

- Les fibres nerveuses sympathiques (Figure 28).
- Les fibres nerveuses parasympathiques (Beekes et McBride, 2000).

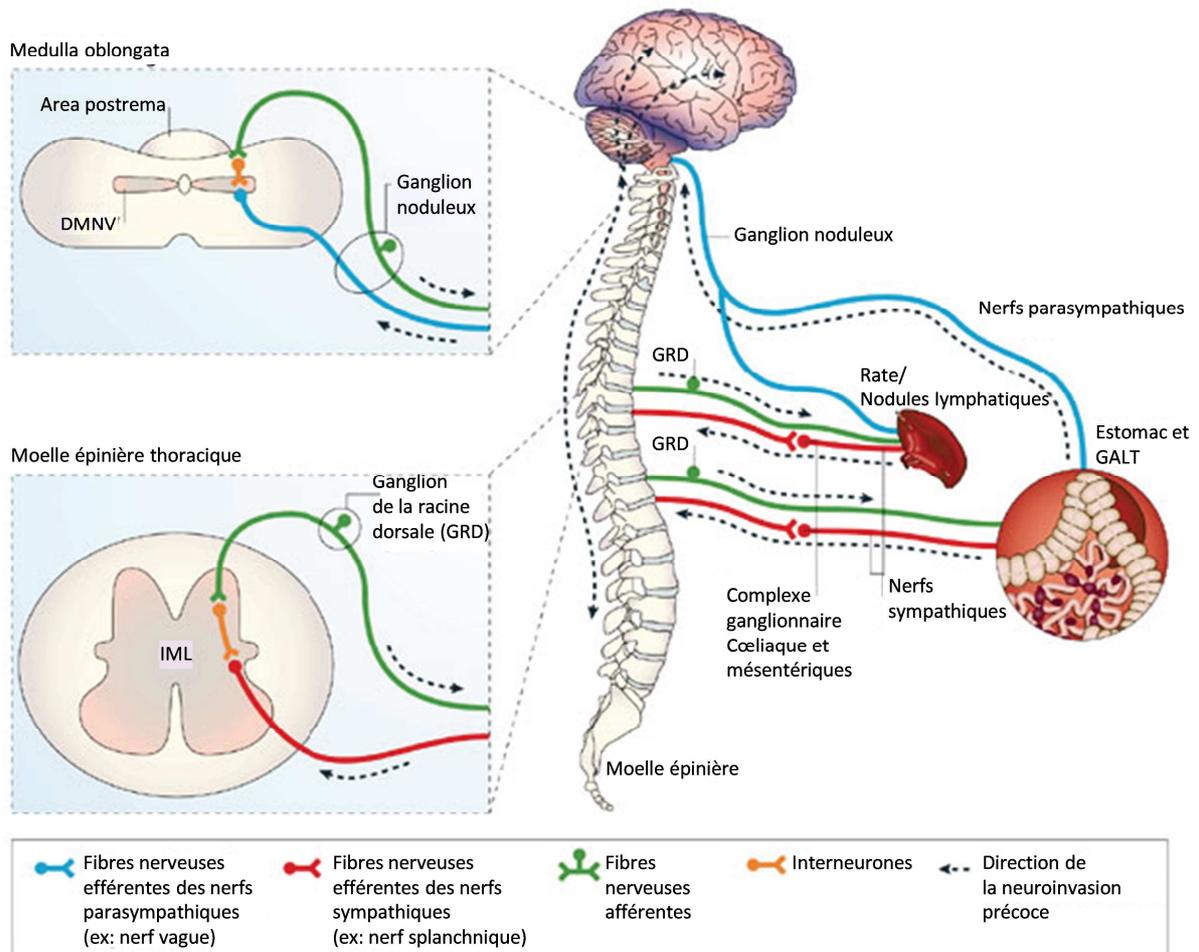


Figure 28 : Voies de neuro-invasion depuis l'estomac par l'agent des ESSTs. L'analyse de la progression de l'accumulation de PrP^{Sc} au sein du système nerveux de rongeurs inoculés expérimentalement indique que l'agent « scrapie » diffuse depuis l'estomac jusqu'au système nerveux central (SNC) à travers deux voies neuroanatomiques distinctes. Dans chaque cas, la diffusion se déroule pas à pas dans une direction rétrograde le long des voies efférentes (moteur) entre les nœuds synaptiques. L'une des routes empruntées vers le SNC suit les fibres sympathiques du nerf splanchnique jusqu'à la colonne cellulaire intermediolatérale (IML) de la moelle épinière thoracique. Par la suite, l'agent diffuse jusqu'au cerveau dans le sens caudal-crânien le long de la moelle épinière. La neuroinvasion à partir de l'intestin peut également être indépendante de la moelle épinière. Dans ce cas, l'agent diffuse le long des fibres parasympathiques vers le noyau dorsal du nerf vague (DMNV) au sein de la medulla oblongata. GALT (Gut-associated lymphoid tissues). D'après Mabbott et MacPherson, 2006.

III.5. Les différents modèles d'étude des maladies à prion

La création de modèles d'étude des maladies à prion a plusieurs finalités :

- Une nécessité de réduction de la durée d'incubation de la pathologie qui, chez certains mammifères, dépasse plusieurs dizaines d'années. En effet, cette durée d'incubation limite considérablement les avancées en matière de compréhension des mécanismes d'évolution de la maladie ou d'établissement de traitement.

- L'affranchissement de la barrière d'espèce qui correspond à la capacité limitée pour la PrP^{Sc} d'une espèce à induire la maladie chez un individu d'une autre espèce. Cette barrière est due aux différences de séquence en acides aminés de la PrP entre les espèces et également à des variations des caractères biochimiques de la protéine infectieuse qui constituent les souches de prions (Tableau 5). La transmission inter-espèce a pour conséquence la formation de souche de prion ayant des capacités de propagation ou d'infection variables en fonction de l'hôte. C'est le cas pour l'agent de l'ESB qui expérimentalement, présente une efficacité de propagation moindre dans des souris exprimant la PrP^C humaine par rapport à la même souche préalablement passée par l'ovin ou la chèvre (Padilla *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Récapitulatif des critères pris en compte pour distinguer expérimentalement les 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 | Signes cliniques Test du comportement |
| Propriétés biochimiques de la PrP ^{Sc} | Test de résistance à la PK Pourcentage des différentes glycoformes Dénaturation induite par des agents chaotropiques Résistance à la chaleur Proportion de PrP native vs. PrP dénaturée |
| Distribution de la PrP ^{Sc} dans le cerveau | Microscopie infrarouge, dichroïsme circulaire Immunohistochimie |
| Nature des dépôts de PrP ^{Sc} | Histologie, liaison au rouge Congo Epitopes spécifiques des dépôts de la PrP ^{Sc} |
| Distribution et intensité de la spongiose | Profil lésionnel étudié par histologie |
| Tropisme | Dans le système lympho-réticulaire Dans des cultures cellulaires |

Il existe deux grands types de modèles d'étude des maladies à prion, les modèles transgéniques et les modèles *in vitro*.

- Modèles transgéniques

Lorsqu'en 1939 la transmissibilité de la tremblante a été établie, les études ont consisté à utiliser des modèles animaux, notamment les rongeurs, naturellement non affectés par ce type de pathologie. La première réussite d'infection de souris par l'intermédiaire de broyat de cerveau d'animaux malades est à mettre au crédit de Chandler en 1961 (Chandler, 1961). Aujourd'hui des souris « ovinisées » (Westaway *et al.*, 1994, Crozet *et al.*, 2001, Vilotte *et al.*, 2001), « bovinisées » (Scott, M. R. *et al.*, 1999, Castilla *et al.*, 2003, Buschmann et Groschup, 2005, Beringue *et al.*, 2006) et « humanisées » (Telling *et al.*, 1995, Asante *et al.*, 2002, Kong *et al.*, 2005, Beringue *et al.*, 2008a) existent et ont été créées par transgénèse additionnelle sur fond génétique *Prnp*^{0/0}.

- Modèle *in vitro*

La complexité des événements au sein des organismes vivants a poussé les chercheurs à simplifier les modèles, et donc à créer des modèles *in vitro* cellulaires et acellulaires.

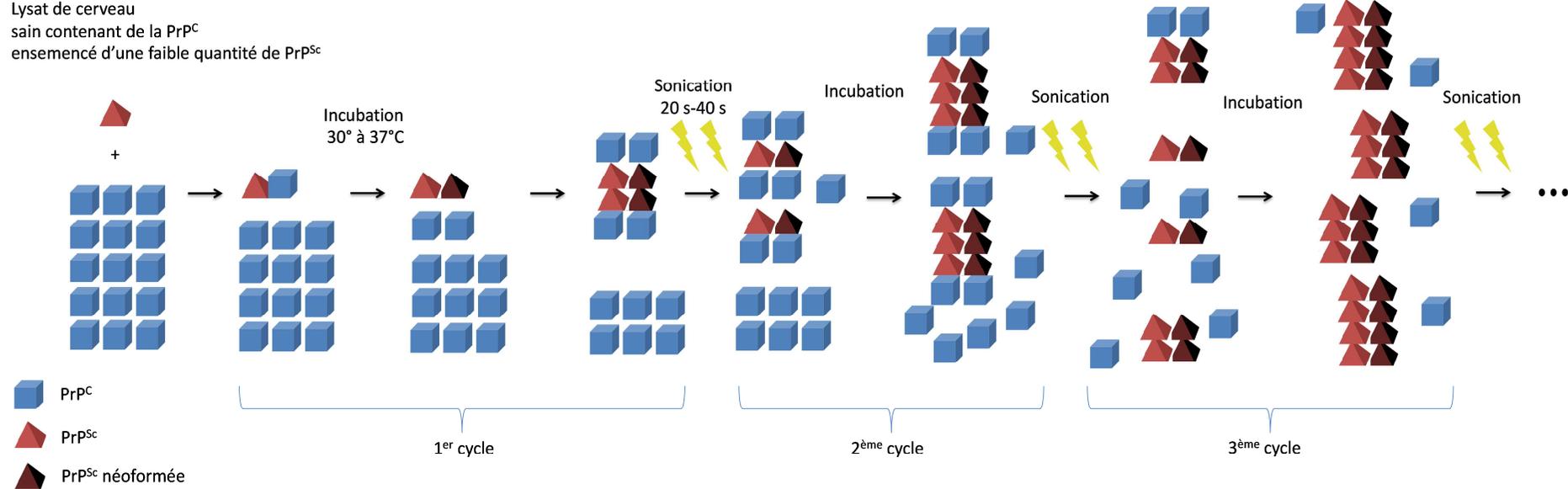
Il existe différentes lignées cellulaires utilisées dans l'étude des ESSTs. Les lignées les plus anciennes dérivent d'un neuroblastome murin N2a, ou de cellules hypothalamiques de souris GT1 (Butler *et al.*, 1988, Race, 1991, Nishida *et al.*, 2000, Arjona *et al.*, 2004). D'autres lignées cellulaires et sont également sensibles uniquement à des souches expérimentales (Tableau 6). La barrière d'espèces étant le principal frein à l'infection, des lignées cellulaires ont été créées à partir d'animaux transgéniques exprimant de la PrP ovine, comme les lignées ROv (Rabbit Ovine) (Vilette *et al.*, 2001) et MOv (Mouse Ovine) (Archer *et al.*, 2004).

Tableau 6 : Lignées cellulaires infectables par des souches de prions adaptées ou naturelles, d'après Vilette, 2008.

| Lignée cellulaire | Origine tissulaire ou Type cellulaire | Espèce | 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 la PrP ovine | Lapin | Agent naturel de la tremblante |
| MOv | Cellules de Schwann issues 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) |

Un modèle acellulaire de multiplication de la protéine prion pathologique a été développé, basé sur l'amplification cyclique (PMCA) de la PrP^{Sc} (Figure 29) en s'appuyant sur la théorie de nucléation-polymérisation (Saborio *et al.*, 2001). La source de PrP^{Sc} est un extrait de cerveau atteint de tremblante et la source de PrP^C est un extrait de cerveau sain. En proportion, il y a beaucoup plus de PrP^C que de PrP^{Sc}, qui est en quantité indétectable par western-blot. Les résultats obtenus par cette technique montrent que la PrP^{res} créée par PMCA présente les mêmes caractéristiques biochimiques que la PrP^{Sc} source utilisée et possède une infectiosité et une capacité d'accumulation et de réplication *in vivo* (Castilla *et al.*, 2005).

Figure 29 : Représentation schématique de la méthode PMCA. L'amplification est basée sur la succession de cycle d'incubation de la PrP^C en excès avec de la PrP^{Sc} et de sonication. A chaque étape d'incubation, il y a formation d'agrégat par incorporation de PrP^{Sc} néoformée. La sonication permet le fractionnement des agrégats devenant de nouveaux noyaux de conversion, d'après Moudjou et Ermonval, 2010.



IV. La protéine prion et son environnement

Pour déterminer le ou les rôles impliquant la protéine prion, de nombreuses études ont été menées dans le but de détecter des partenaires, approche complémentaire de celles consistant en l'établissement de lignées murines transgéniques invalidées pour le gène *Prnp*. Cela a abouti à l'identification d'un nombre important de partenaires de la PrP^C tels que les acides nucléiques, les glycanes, les lipides ou encore les protéines. Une majorité de ces interactions a été mise en évidence *in vitro* et non vérifiée *in vivo*.

IV.1. Partenaires non protéiques

IV.1.a. Les ions métalliques

La protéine prion a la capacité de lier les ions métalliques (cuivre, zinc et manganèse) grâce aux résidus histidine situés dans les octapeptides répétées ainsi que les histidines 96 et 111 de la région centrale de la protéine. L'ion cuivre présente la plus forte affinité de l'ordre du nanomolaire (Viles *et al.*, 1999, Jackson *et al.*, 2001, Jones, C. E. *et al.*, 2004). Cette interaction entre la protéine prion et les ions cuivre aurait comme conséquence de modifier sa conformation tridimensionnelle (Figure 30) (Jones, C. E. *et al.*, 2004, Leclerc *et al.*, 2006, Hodak et Bernholc, 2010).

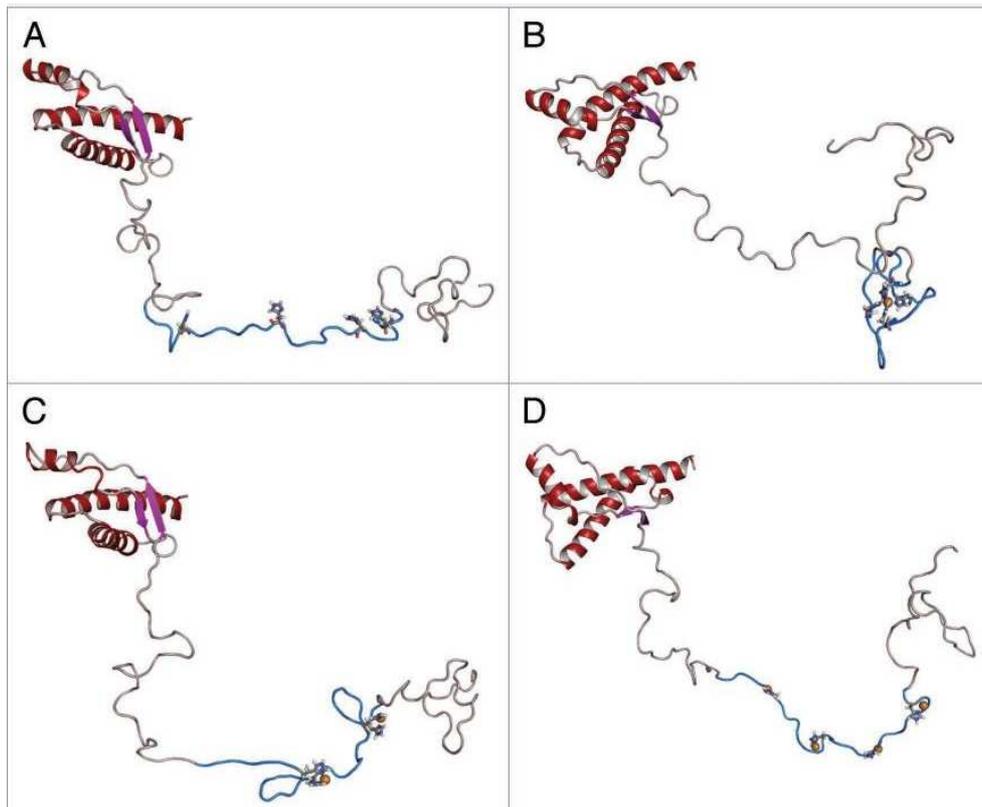


Figure 30 : Structure de la protéine prion en fonction de sa liaison au cuivre. (A) PrP^C seule, (B) Faible concentration de cuivre. Un ion cuivre encerclé par les His 61, 69, 77 et 85. (C) Concentration moyenne de cuivre. Deux ions cuivre sont liés respectivement aux His 61, 69 et His 77, 85. (D) Forte concentration de cuivre. Quatre ions cuivre sont liés aux quatre His. Les ions cuivre sont matérialisés par des sphères dorées, le domaine OR est coloré en bleu, les hélices α en rouge et les feuillets β en magenta. D'après Hodak et Bernholc, 2010.

IV.1.b. Les acides nucléiques

L'interaction *in vitro* entre la PrP^C et les acides nucléiques induit une augmentation de la polymérisation de la protéine (Nandi, 1997, Nandi et Leclerc, 1999, Nandi et Sizaret, 2001). Des études plus récentes ont montré que non seulement l'ADN, mais également les ARNs et des oligonucléotides de phosphorothioate sont également capables d'interagir avec la protéine (Adler *et al.*, 2003, Kocisko *et al.*, 2006). La région qui fixe ces acides nucléiques correspond aux acides aminés 25 à 56 (Weiss *et al.*, 1997, Lima *et al.*, 2006, Gomes *et al.*, 2008) et on y retrouve un motif composé d'alternance de proline et de résidus basiques présents chez d'autres protéines connues pour se lier aux acides nucléiques (Rajendran et Nagy, 2003).

Lorsque la protéine prion interagit avec les acides nucléiques, elle devient partiellement résistante à la digestion par la protéinase K et voit sa propension à l'agrégation et à la conversion augmenter (Adler *et al.*, 2003, Deleault *et al.*, 2003).

Ces résultats obtenus *in vitro* restent à être validés *in vivo*. La principale difficulté concerne la localisation de la PrP^C au niveau de la membrane plasmique et donc la faible probabilité qu'elle a

d'entrer en contact avec des acides nucléiques. Restent donc les formes marginales de la PrP qui sont la forme cytosolique (Mironov *et al.*, 2003), la forme PrP^{Ctm} possédant un domaine N-terminal cytosolique (Stewart *et al.*, 2001) et la protéine prion retrouvée dans le noyau (Gu, Y. *et al.*, 2003).

IV.1.c. Les glycosaminoglycannes

Les glycosaminoglycannes (GAGs) sont des polysaccharides sulfatés chargés négativement que l'on retrouve chez les tissus animaux (Iozzo, 1998). De nombreuses études font état de l'interaction des GAGs avec la PrP, particulièrement les héparanes sulfates (HS) et les chondroïtines sulfates (CS) (Caughey *et al.*, 1994, Hundt *et al.*, 2001, Pan, T. *et al.*, 2002, Warner *et al.*, 2002, Triantaphyllidou *et al.*, 2006). Un chapitre étant consacré à ces molécules, les interactions qu'elles établissent avec la PrP ne seront pas développées ici.

IV.1.d. Les glycolipides

La localisation de la protéine prion au niveau des rafts implique une interaction de la protéine avec les glycolipides présents dans ces structures. Ce sont les travaux de Mahfoud et coll qui ont démontré l'interaction de la protéine prion avec les gangliosides, notamment le GM3, par l'intermédiaire de sa boucle V3-like (Mahfoud *et al.*, 2002). Plus récemment, une étude réalisée au sein de notre laboratoire a mis en évidence une altération du métabolisme du GM3 au cours de la pathologie dans la rate de souris transgéniques « ovinisées » (Guillaume-Bosselut *et al.*, 2009). Les charges négatives des acides sialiques portées par les gangliosides créeraient un environnement particulier autour de la PrP, il serait perturbé par la modification de l'expression du gène *St3gal5* responsable de la synthèse du GM₃. La modification engendrée favoriserait une déstabilisation de la protéine prion et aiderait à la transconformation de celle-ci en PrP^{Sc}. Outre le GM3, le GM1 a aussi été montré comme interagissant avec la protéine prion (Mattei *et al.*, 2009).

IV.2. Partenaires protéiques

La protéine prion possède de nombreux partenaires protéiques, mais tous n'ont pas été vérifiés *in vivo* (Tableau 7). L'inconvénient principal des techniques utilisées pour la détection *in vitro* de partenaires de la PrP, notamment le système double hybride, est que des protéines situées dans des compartiments cellulaires peuvent interagir et provoquer ainsi de faux-positifs. La protéine prion est majoritairement membranaire et des résultats comme l'interaction avec Bcl2, Grb2 ou Hsp60 par exemple sont peu probables *in vivo*.

Une interaction entre la protéine prion et le précurseur de la laminine (LRP, 37 kDa) et sa forme mature (LR, 67 kDa) ont été décrites (Rieger *et al.*, 1997, Hundt *et al.*, 2001 ayant pour conséquence l'internalisation de la PrP (Gauczynski *et al.*, 2001). Le récepteur LR est exprimé dans tous les neurones du SNC, alors que son précurseur n'est exprimé qu'au niveau d'une sous population d'interneurones corticaux qui sont particulièrement sensibles à l'accumulation de PrP^{Sc} (Belichenko *et al.*, 1999). LRP interagit avec la PrP^C mais également avec la PrP^{Sc}, mais cette dernière peut être inhibée par des glycanes polysulfatés analogues structuraux des héparanes sulfate (HS) (Gauczynski *et al.*, 2006).

La molécule d'adhésion cellulaire NCAM est une autre protéine très étudiée pour son interaction avec la PrP (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001, Santucciono *et al.*, 2005, Watts *et al.*, 2009). Celle-ci conduit à la formation d'un complexe protéique mis en évidence dans la lignée de neuroblastome N2a. Cette interaction a été vérifiée *in vivo* dans le cerveau de souris et au niveau des rafts où elle permettrait l'activation de la kinase fyn (Schmitt-Ulms *et al.*, 2004, Santucciono *et al.*, 2005).

La protéine STI-1 est une protéine chaperonne cytoplasmique et nucléaire qui malgré l'absence de séquence d'adressage est retrouvée co-immunoprécipitée avec la protéine prion à la membrane plasmique (Zanata *et al.*, 2002).

Le plasminogène est également un partenaire potentiel de la protéine prion (Cuccioloni *et al.*, 2005) via son domaine « kringle » (Ryou *et al.*, 2003). L'interaction entre les deux molécules permet l'activation du plasminogène par le tPA (activateur tissulaire du plasminogène) et le clivage de la PrP^C (Kornblatt *et al.*, 2003, Epple *et al.*, 2004). Cette dernière observation est toutefois contestée par les travaux de Barnewitz et coll., qui montrent que dans des souris déficientes pour le plasminogène, il y a toujours endo-protéolyse de la PrP^C (Barnewitz *et al.*, 2006).

Récemment, une étude a montré qu'au niveau de la rétine, la PrP interagissait avec la neuroglobuline lors de son passage dans le cytoplasme pour atteindre le protéasome. Elle pourrait jouer le rôle de séquestreur de la PrP au cours de l'infection (Lechauve *et al.*, 2009).

Plus récemment la protéine prion a été montrée comme interagissant avec l'histone H3 dans le noyau de cellules endocriniennes pancréatiques (Strom *et al.*, 2011b).

Tableau 7 : Récapitulatif des protéines partenaire de la PrP. * Les protéines soulignées sont celles dont les interactions avec la PrP ont été confirmées dans des modèles cellulaires neuronaux ou *in vivo*. D'après Vana *et al.*, 2007.

| Protéines partenaires de la PrP | Localisation subcellulaire | Méthode de découverte | Références |
|---|--|---|--|
| <u>P75</u> | Cavéole | | Della-Bianca <i>et al.</i> , 2001 |
| <u>GAGs</u> | Milieu extracellulaire | | Hijazi <i>et al.</i> , 2005 |
| <u>HSPG / HS</u> | Milieu extracellulaire | | Gabizon <i>et al.</i> , 1993, Hundt <i>et al.</i> , 2001, Horonchik <i>et al.</i> , 2005 |
| ZAP70 | Cytoplasme | Coimmunoprécipitation | Mattei <i>et al.</i> , 2004 |
| Nitrite oxyde synthase neuronale (nNOS) | Membrane périphérique | Coimmunoprécipitation | Keshet <i>et al.</i> , 2000 |
| Dystroglycane | Membrane plasmique | Coimmunoprécipitation | Keshet <i>et al.</i> , 2000 |
| Tyrosine kinase Fyn | Membrane plasmique | Coimmunoprécipitation | Mouillet-Richard <i>et al.</i> , 2000 |
| Synaptophysine | Vésicules synaptiques | Coimmunoprécipitation | Keshet <i>et al.</i> , 2000 |
| APOe | Sécrétée | Coimmunoprécipitation / Pull down <i>in-vitro</i> avec une protéine de fusion | Gao <i>et al.</i> , 2006 |
| <u>Laminine*</u> | Matrice extracellulaire | Co-purification avec la PrP-GST | Graner <i>et al.</i> , 2000 |
| Cavéoline-1 | Membrane plasmique | Co-purification dans les cellules N2a | Harmey <i>et al.</i> , 1995 |
| Nrf2 | Cytoplasme/noyau | Criblage de banque d'ADNc issus de cerveau de souris | Yehiely <i>et al.</i> , 1997 |
| APLP1 | Membrane plasmique | Criblage de banque d'ADNc issus de cerveau de souris | Yehiely <i>et al.</i> , 1997 |
| Tubuline | Microtubules | Cross-linking chimique | Nieznanski <i>et al.</i> , 2006 |
| Caséine kinase 2 | Cytoplasme | Far Western blots | Meggio <i>et al.</i> , 2000 |
| <u>STI-1*</u> | Cytoplasme | Hydrophatie complémentaire | Martias <i>et al.</i> , 1997, Zanata <i>et al.</i> , 2002 |
| <u>Histone H1</u> | Noyau | Immunofluorescence | Strom <i>et al.</i> , 2011b |
| <u>Histone H3</u> | Noyau | Immunofluorescence | Strom <i>et al.</i> , 2011b |
| <u>Vitronectine</u> | Matrice extracellulaire | Liaison sur membrane, Co-localisation | Hajj <i>et al.</i> , 2007 |
| <u>NCAM*</u> | Membrane plasmique | Pontage au formaldéhyde | Schmitt-Ulms <i>et al.</i> , 2004 |
| Rdj-2 | Membrane plasmique | Pull down <i>in-vitro</i> avec une protéine de fusion GST | Beck <i>et al.</i> , 2006 |
| <u>HAX-1</u> | Mitochondrie | Pull down <i>in-vitro</i> avec une protéine de fusion GST / immunoprécipitation / Système double-hybride levure | Jing <i>et al.</i> , 2011 |
| Bcl-2 | Cytoplasme | Système double-hybride | Kurschner et Morgan, 1995, Rambold <i>et al.</i> , 2006 |
| Gbr2 | Cytoplasme | Système double-hybride | Spielhaupter et Schatzl, 2001 |
| $\alpha\beta$ crystalline | Cytoplasme | Système double-hybride | Sun <i>et al.</i> , 2005 |
| Pint1 | Inconnue | Système double-hybride | Spielhaupter et Schatzl, 2001 |
| NRAGE | Membrane périphérique et cytoplasmique | Système double-hybride | Bragason et Palsdottir, 2005 |
| Hsp60 | Mitochondrie | Système double-hybride | Edenhofer <i>et al.</i> , 1996 |
| Synapsine-1b | Synapse | Système double-hybride | Spielhaupter et Schatzl, 2001 |
| TREK-1 | Membrane plasmique | Système double-hybride bactérien | Azzalin <i>et al.</i> , 2006 |
| <u>Récepteur de la laminine 37/67kDa*</u> | Membrane plasmique | Système double-hybride bactérien | Rieger <i>et al.</i> , 1997, Hundt <i>et al.</i> , 2001 |
| <u>Plasminogène*</u> | Sécrété | Test de liaison avec protéines immobilisées du sérum | Fischer <i>et al.</i> , 2000, Ellis <i>et al.</i> , 2002 |

V. Les Glycosaminoglycannes

V.1. Généralités

Les glycosaminoglycannes sont de longs polymères glycaniques linéaires non ramifiés constitués d'unités disaccharidiques répétées n fois. Dans la majorité des cas, sauf pour les kératanes sulfates, les disaccharides sont constitués d'un acide hexuronique (acide glucuronique (GlcA) ou acide iduronique (IdoA)) et d'une hexosamine (glucosamine (GluN) ou galactosamine (GalN)). Cette dernière permet de différencier les glucosaminoglycannes des galactosaminoglycannes. Ces disaccharides peuvent en outre être plus ou moins sulfatés ce qui rend les glycosaminoglycannes très hydrophiles. On peut les classer en différentes familles selon la nature des disaccharides. Les variations dans la longueur des chaînes, le degré de sulfatation et l'épimérisation génèrent pour ces molécules un nombre de combinaisons très important. Les glycosaminoglycannes sont synthétisés dans l'appareil de Golgi et à l'exception de l'acide hyaluronique (AH), ils sont reliés à un corps protéique par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide de liaison pour former un protéoglycane (PG) (Funderburgh, 2002, Silbert et Sugumaran, 2002, Sugahara et Kitagawa, 2002).

V.2. Structures des glycosaminoglycannes

Il existe quatre types de glycosaminoglycannes différents, l'acide hyaluronique (AH), les héparanes sulfates / héparines (HS/Hp), les chondroïtines sulfates / Dermatanes sulfates (CS/DS) et les kératanes sulfates (KS). Ils se différencient par la nature des disaccharides qui les composent.

V.2.a. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est présent dans les tissus conjonctifs, épithéliaux. On le trouve également abondamment dans l'humeur vitrée (d'où son nom *Hyalos*), le liquide synovial et la peau. Il est l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire. Il est constitué d'unités disaccharidiques de GlcA et de GlcNAc reliés par une liaison β 1-3 (Figure 31). Les unités disaccharidiques d'acide hyaluronique sont quant à elles liées par des liaisons β (1-4) jusqu'à former un polymère pouvant comprendre 50 000 unités.

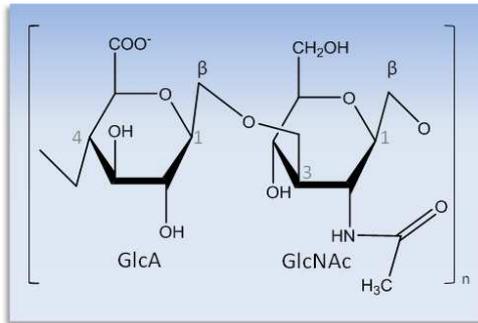


Figure 31 : Formule chimique d'une unité disaccharidique de l'acide hyaluronique.

V.2.b. Les héparanes sulfates et l'héparine

Les héparanes et l'héparine sont composés d'unités disaccharidiques constituées d'un acide hexuronique (acide glucuronique ou acide iduronique) et d'une glucosamine liés par une liaison $\beta(1-4)$ (Figure 32). L'existence de deux sortes d'acide hexuronique provient de l'épimérisation en C5 de l'acide glucuronique (GlcA) lors de la synthèse du glycosaminoglycane donnant alors de l'acide iduronique. La glucosamine peut être N-acétylée en position 2 (GlcNAc) ou bien N-sulfatée en position 6 (GlcNS(6S)), en position 3 (GlcNS(3S)) ou aux deux (GlcNS(3S,6S)). L'acide hexuronique peut également être sulfaté en position 2 (GluA(2S)) ou IdoA(2S)). Au total, 48 disaccharides différents peuvent être synthétisés engendrant une grande hétérogénéité.

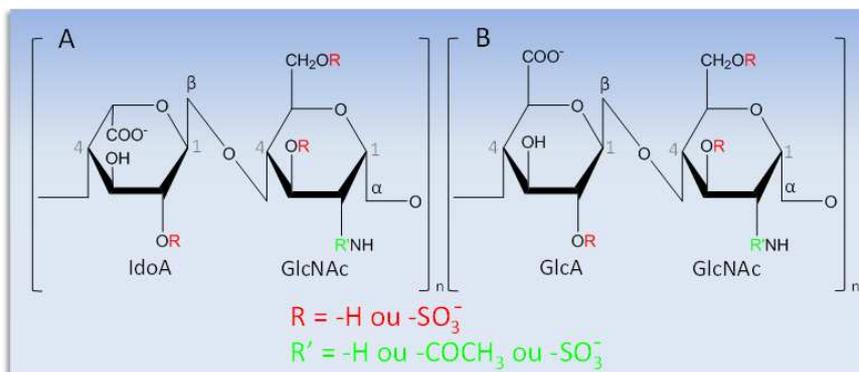


Figure 32 : Formule chimique d'une unité disaccharidique d'héparine (A) et d'héparanes sulfate (B).

V.2.c. Les chondroïtines sulfates et les dermatanes sulfates

Les chondroïtines sulfates sont les principaux glycosaminoglycannes de la matrice extracellulaire (MEC) du système nerveux central (Sugahara et Mikami, 2007). L'unité disaccharidique est composée d'un acide glucuronique (GlcA) et d'une N-acétyl-glucosamine (GalNAc) liés par une liaison $\beta(1-3)$ (Figure 33). Selon les cellules qui les synthétisent, les chondroïtines sulfates subissent des modifications comme la sulfatation ou l'épimérisation, mais contrairement aux Héparanes sulfates, la sulfatation des chondroïtine ne varie pas le long de la chaîne disaccharidique.

Les différents motifs de sulfatation permettent de classer les chondroïtines sulfates de A à E.

- Les CS-A et les CS-C sont monosulfatés respectivement en position 4 et 6 de GalNAc.
- Les CS-D sont sulfatés en position 6 de GalNAc et en position 2 du GlcA
- Les CS-E sont sulfatés en position 4 et 6 du GalNAc. Cette chondroïtine peut subir une épimérisation de GlcA en IdoA, et est alors nommée CS-iE\DSE (Dermatane sulfate E).
- Les CS-B (ou DS) présentent une variation dans leur séquence de disaccharides avec à la fois du GlcA et son épimère IdoA sur la même chaîne. On retrouve alternativement des domaines comprenant des disaccharides composés de GlcA peu sulfatés en C2 et parfois en C3, puis des domaines composés d'IdoA plus sulfatés en C2 (Vynios *et al.*, 2002). Une relation entre la sulfatation du GalNAc et celle du GlcA adjacent a été mise en évidence. Lorsque le GalNAc est sulfaté en C4, on retrouve principalement un IdoA adjacent et lorsque le GalNAc est sulfaté en C6, c'est un GlcA que l'on retrouvera le plus souvent (Karamanos *et al.*, 1994).

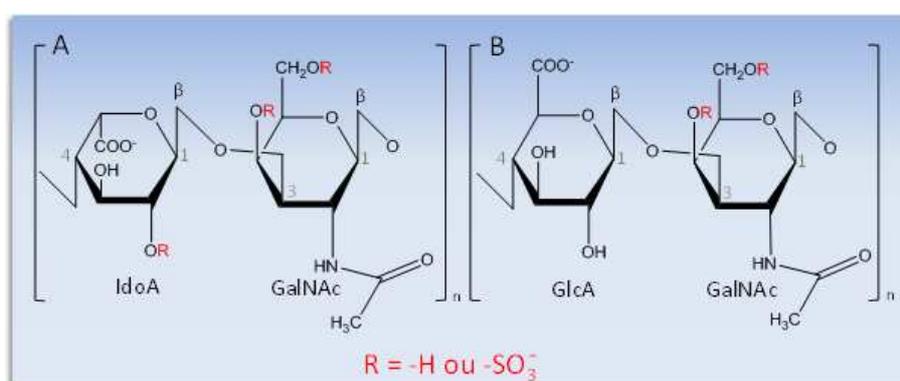


Figure 33 : Formule chimique d'une unité disaccharidique de DS (A) et de CS (B).

Alors que sur une chaîne d'héparane sulfate on peut potentiellement retrouver 48 motifs disaccharidiques différents, 23 ont été identifiés pour les dermatanes sulfates. Cette diversité de motifs chez les chondroïtines sulfates et les DS laisse à penser que chacun puisse assurer un rôle différent.

V.2.d. Les kératanes sulfates

Les kératanes sulfates ont été caractérisés par Meyer et coll en 1953 dans la cornée bovine (Meyer *et al.*, 1953). Ils présentent des caractéristiques propres qui en font une catégorie particulière parmi les glycosaminoglycannes. En effet, chaque unité disaccharidique est constituée d'un galactose (Gal) et d'une GlcNAc (Figure 34) liés par une liaison $\beta(1,4)$. Les radicaux hydroxyles portés par le carbone 6 peuvent être sulfatés et un fucose (Fuc) peut être greffé sur le carbone 3 de la glucosamine (Greiling, 1994). De plus, les KS peuvent être bi-antennés (Figure 37) et sialylés à leurs extrémité (Funderburgh, 2002).

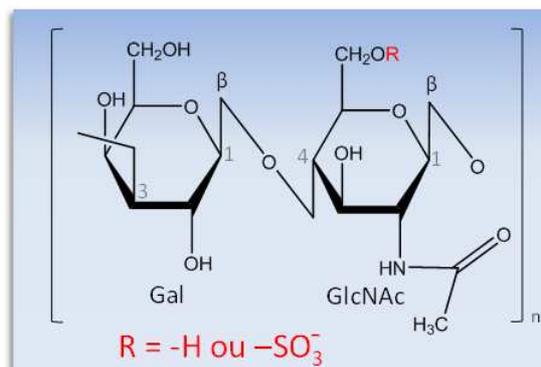


Figure 34 : Formule chimique d'une unité disaccharidique de KS. Gal : galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine.

V.3. Biosynthèse des glycosaminoglycannes

Les différentes familles de glycosaminoglycannes (HP/HS, CS/DS, KS et AH) ont chacune des caractéristiques bien particulières comme la taille, le lieu d'expression, la fonction ou encore les modifications post-synthétiques. Le processus de biosynthèse est complexe et implique un grand nombre d'enzymes régulées par l'environnement cellulaire et tissulaire (Sasisekharan *et al.*, 2006). Il est possible de définir deux groupes de glycosaminoglycannes en fonction de leur synthèse, ceux qui sont liés à un corps protéique (HP/HS, CS/DS et KS) et ceux qui ne le sont pas (AH). Parmi ceux qui sont liés à un corps protéique, on peut distinguer d'une part les héparine/héparanes sulfates et les chondroïtines/dermatanes sulfates et d'autre part les kératanes sulfates du fait de leur différence dans la liaison au corps protéique.

V.3.a. Biosynthèse de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est synthétisé directement dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules des tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux par des hyaluronanes synthases (HAS). Il s'agit de protéines à sept domaines transmembranaires. Il existe chez les mammifères trois HAS (HAS I, II et III). Ces enzymes ont la particularité de permettre l'élongation sur le GlcA et sur le GlcNAc respectivement grâce à des liaisons β 1-4 et β 1-3 (Weigel *et al.*, 1997). Leur fonctionnement est unique car elles effectuent l'élongation de la chaîne osidique par la partie réductrice du fait de l'absence de liaison à un corps protéique. A l'issue de sa synthèse, l'acide est transloqué dans le feuillet externe puis libéré dans la matrice extracellulaire (Itano et Kimata, 2002).

V.3.b. Biosynthèse des GAGs liés à un corps protéique

i. Synthèse du tétrasaccharide de liaison

Contrairement à l'AH, les autres glycosaminoglycannes ne sont pas libres et sont reliés à un corps protéique par un tétrasaccharide de liaison. Ce tétrasaccharide de liaison est identique pour les héparanes sulfates, chondroïtines sulfates et dermatanes sulfates (Figure 35) alors que pour les kératanes sulfates, trois tétrasaccharides de liaison différents ont été mis en évidence (Figure 37) (Krusius *et al.*, 1986, Oeben *et al.*, 1987, Sugahara et Kitagawa, 2000, Funderburgh, 2002). Les tétrasaccharides de liaison des héparanes sulfates, chondroïtine sulfates, dermatanes sulfates, kératanes sulfates II (cartilages) et kératanes sulfates III (cerveau) sont *O*-liés à une sérine/thréonine alors que celui des kératanes sulfates I (cornée) est *N*-lié à une asparagine.

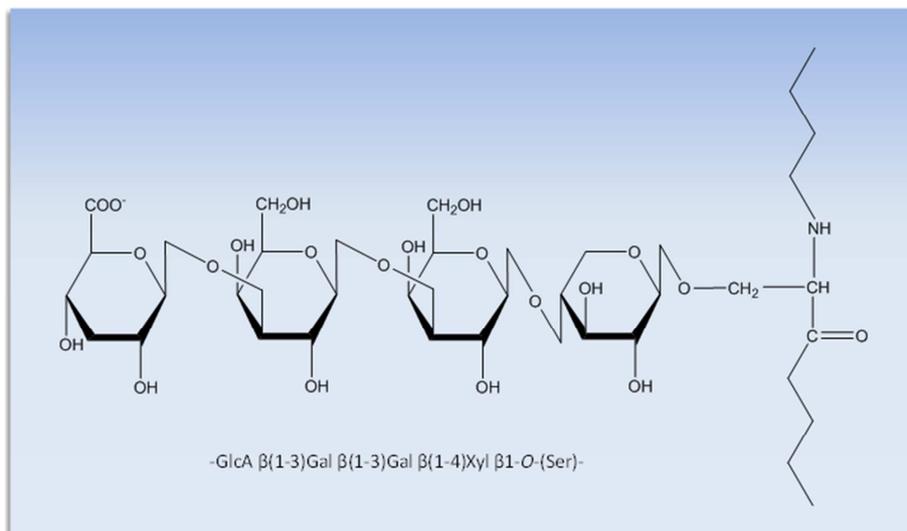


Figure 35 : Formule développée du tétrasaccharide de liaison des HP/HS et des CS/DS. Cette structure commune aux HS, CS et DS permet aux GAGs de se lier au cœur protéique pour former le protéoglycane.

La synthèse du tétrasaccharide -GlcA β (1-3)Gal β (1-3)Gal β (1-4)Xyl β 1-O-(Ser)- fait intervenir quatre enzymes différentes : La xylose transférase (XYLT-I) qui O-lie un β -xylose sur une sérine, la β 4-galactosyltransférase (GalT-1) qui transfère un galactose en β (1-4), la β 3-Galactosyltransférase (GalT-2) qui transfère un galactose en β (1-3) et la β 3-GlcAtransférase (GlcAT-1) qui transfère un acide glucuronique en β (1-3) (Sugahara et Kitagawa, 2000) (Figure 36). Cette synthèse s'effectue pour partie dans le réticulum endoplasmique (XYLT-I) et pour partie dans l'appareil de Golgi (GalT-1, GalT-2, GlcAT-1).

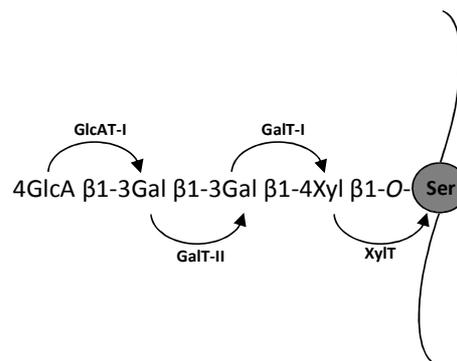


Figure 36 : Biosynthèse du tétrasaccharide de liaison des Hp/HS et CS/DS. La xylose transférase (XYLT-I), la β 4-galactosyltransférase (GalT-1), la β 3-Galactosyltransférase (GalT-2) et la β 3-GlcAtransférase 1 (GlcAT-1) sont les enzymes responsables de la synthèse du tétrasaccharide de liaison, d'après Sugahara et Kitagawa, 2002.

Pour les KS, il existe trois séquences saccharidiques de liaison entraînant trois classes différentes (KS I, II et III). Le KS I est lié à un corps protéique par une séquence saccharidique : Man-6Man-4GlcNAc-4GlcNAc-N-Asn. Cette séquence peut être modifiée par différent greffage. Le GlcNAc peut être fucosylé en position 6 par l'enzyme FUT8 et le premier mannose en plus d'être lié à un autre mannose sur le carbone 3 peut également être lié un mannose supplémentaire en C6 formant alors un « antennage » (Oeben *et al.*, 1987). Le KS II est lié au corps protéique par une séquence saccharidique moins complexe : 6GalNAc-O-Ser/Thr. Il existe un antennage avec l'ajout d'un galactose sur le carbone 3 du GalNAc. Enfin, le KS III possède comme liaison saccharidique la séquence suivante : Man-O-Ser (Figure 37).

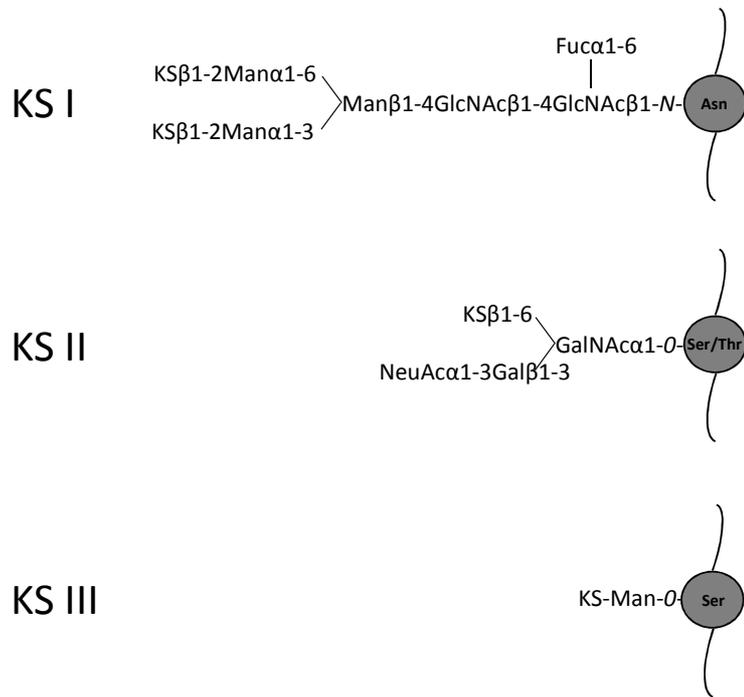
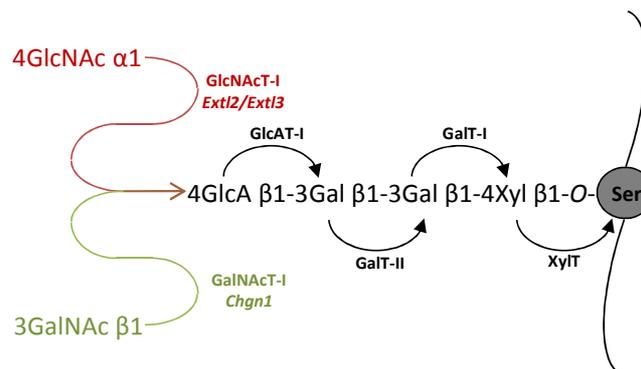


Figure 37 : Structure glycanne des différents types d'oligosaccharide de liaison rencontrés dans les PG à motif KS, d'après Funderburgh, 2002.

ii. Déterminisme de la nature de la chaîne oligosaccharidique

De la nature du premier sucre greffé dépend la nature du glycosaminoglycane (Figure 38). Ce choix semblerait dépendre de la séquence protéique autour de la sérine *O*-liée (Esko et Zhang, 1996).

Voie de biosynthèse des héparanes sulfates



Voie de biosynthèse des chondroïtines sulfates

Figure 38 : Représentation schématique de la biosynthèse du premier ose déterminant la nature du GAGs. Après la synthèse du tétrasaccharide de liaison (en noir) la synthèse est orientée soit vers la synthèse des héparanes sulfates (HS en rouge) soit vers celle des chondroïtines sulfates (CS en vert). Le corps protéique est représenté en gris. Les différentes glycosyltransférases sont également représentées, d'après Sugahara et Kitagawa, 2002.

De plus, des modifications du tétrasaccharide sembleraient également déterminer la nature de la chaîne. Pour chondroïtines/dermatanes sulfates, on retrouve les motifs suivants, -GlcA/I doA $\beta(1-3)$ Gal(4-O-S) $\beta(1-3)$ Gal(+/-6-O-S) $\beta(1-4)$ Xyl $\beta 1-O$ -(Ser), -GlcA $\beta(1-3)$ Gal(+/-6-O-S) $\beta(1-3)$ Gal(6-O-S) $\beta(1-4)$ Xyl $\beta 1-O$ -(Ser) ou -GlcA $\beta(1-3)$ Gal $\beta(1-3)$ Gal $\beta(1-4)$ Xyl(2-O-P) $\beta 1-O$ -(Ser)- également présent dans les héparanes sulfates (Sugahara *et al.*, 1988 , Sugahara, 1992 , de Waard *et al.*, 1992) (Figure 39). La polymérisation des héparine et héparanes sulfates semble inhibée par la présence d'un sulfate en position 4 d'un Gal (Kitagawa *et al.*, 1995).

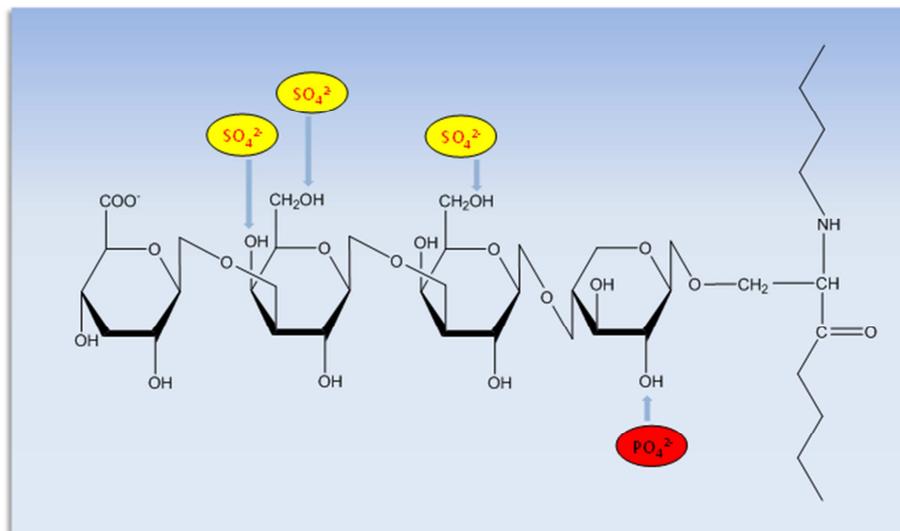


Figure 39 : Représentation schématique de la phosphorylation en C2 du Xylose et des sulfatations en C4 et C6 des deux galactoses du tétrasaccharide de liaison, d'après GlycoWord.

iii. Elongation de la chaîne d'héparine et d'héparanes sulfates

La synthèse et l'élongation des héparine et héparanes sulfates se déroulent dans l'appareil de Golgi. Les unités monosaccharidiques sont ajoutées par un complexe hétéro-oligomérique formé des enzymes EXT1 et EXT2. Les deux enzymes séparées possèdent les activités GlcAtransférase II et GlcNActransférase II, mais en complexe, l'activité GlcNAc-T II semble inhibée par EXT2 (Busse et Kusche-Gullberg, 2003). Les deux enzymes sont pourtant nécessaires car l'absence de l'une ou de l'autre entraîne l'arrêt de la synthèse des héparanes sulfates (McCormick *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 2000). Deux autres enzymes possèdent l'activité GlcNActransférase II, EXTL1 et EXTL3, mais l'action préférentielle du complexe EXT1/EXT2 ou de EXTL1/EXTL3 n'est pas encore élucidée (Kim *et al.*, 2001) (Figure 40).

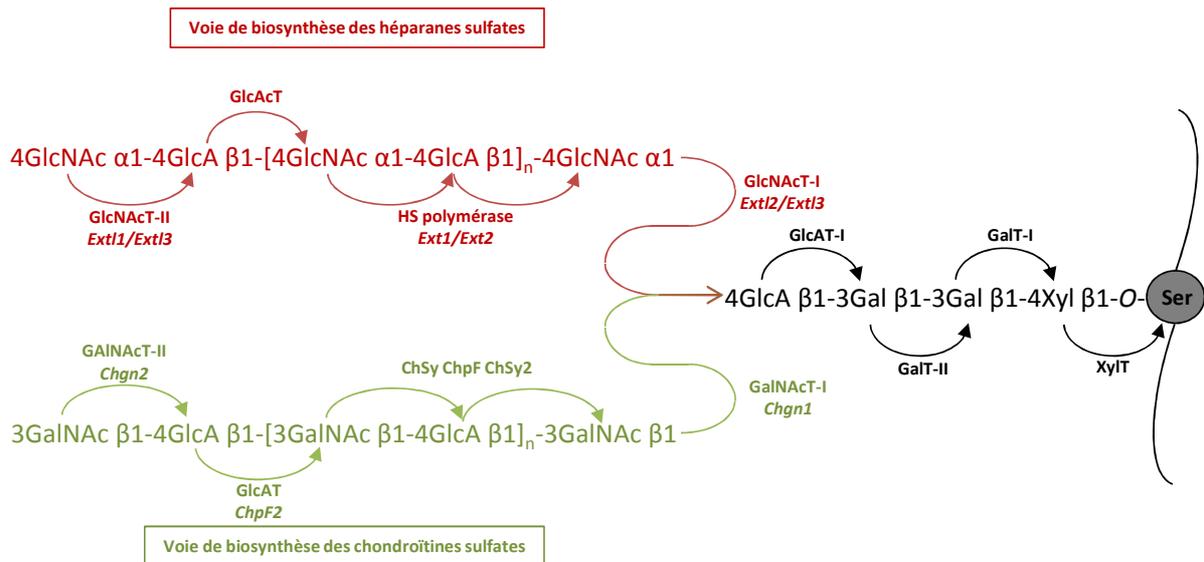


Figure 40 : Représentation schématique de la biosynthèse des GAGs de type HS et CS. Après la synthèse du tétrasaccharide de liaison (en noir) la synthèse est orientée soit vers la synthèse des héparanes sulfates (HS en rouge) soit vers la synthèse des chondroïtines sulfates (CS en vert). Le corps protéique est représenté en gris. Les différentes glycosyltransférases sont représentées également, d'après Sugahara et Kitagawa, 2002.

iv. Elongation de la chaine de chondroïtines sulfates et de dermatanes sulfates

La synthèse et l'élongation des chondroïtines fait intervenir plusieurs enzymes Golgiennes (Figure 40). La première à avoir été mise en évidence est ChSy (Chondroïtine Synthase) (Kitagawa *et al.*, 2001) qui possède les activités GalNAc transférase II et GlcA transférase II. Par la suite une seconde enzyme, la ChPF (Chondroïtin Polymerazing Factor), possédant les mêmes activités a été découverte (Yada *et al.*, 2003). ChPF semblerait augmenter l'activité de ChSy (Kitagawa *et al.*, 2003). Trois autres enzymes ont finalement été identifiées, ChSy2 possédant les mêmes activités que ChSy et ChPF, Chgn2 ne possédant que l'activité GalNAc transférase II et ChPF2 ne possédant que l'activité GlcA transférase. Une étude sur l'implication de ces enzymes dans l'élongation des chaines de chondroïtines sulfates a montré que selon le complexe enzymatique formé, la longueur finale diffère. En effet, les complexes ChSy2-ChPF ou ChSy2-ChSy1 aboutissent à des chaines plus courtes que l'élongation par le complexe ChSy1-ChPF (Izumikawa *et al.*, 2007).

v. Elongation de la chaîne de Kératanes sulfates

Tout comme les héparine/héparanes sulfates et les chondroïtines/dermatanes sulfates, la synthèse des kératanes sulfates se déroule dans l'appareil de Golgi grâce à deux catégories d'enzymes que sont les *N*-acétylglucosaminyltransférases (GlcNAc T ou Gn T) et les galactosyltransférases (Gal T) qui permettent l'addition séquentielle de GlcNAc et de Gal. Actuellement, sept gènes codant des β 4Gal-T (Amado *et al.*, 1999) sont décrits, parmi lesquels seul β 4Gal-T4 possède une activité d'élongation de la chaîne de kératanes sulfate (Kitayama *et al.*, 2007). Pour ce qui est des Gn-T, plusieurs enzymes sont connues, mais seule β 3Gn-T7 montre une activité envers les KS (Seko *et al.*, 2003).

V.3.c. Biosynthèse des GAGs liés à un corps protéique

Après la synthèse des chaînes oligosaccharidiques, des modifications supplémentaires peuvent intervenir, de type substitutions de résidus, épimérisation ou sulfatation. Ces modifications ont pour conséquences d'obtenir une grande diversité dans la composition des chaînes.

i. Modification post-synthétique de l'héparine et des héparanes sulfates

Suite à leur élongation, l'héparine et les héparanes sulfates peuvent subir les modifications suivantes :

- La substitution du résidu acétyl du GlcNAc par un résidu sulfate par une enzyme de la famille des NDST (**N**-d'acétylase/*N*-sulfotransférase) qui sont au nombre de 4 chez les mammifères (Ledin *et al.*, 2004). Cette modification permet l'établissement de domaines plus ou moins sulfatés. Parfois la sulfatation ne se fait pas et l'on retrouve un GlcN (Toida *et al.*, 1997).

- L'épimérisation en C5 des GlcA par la C5 épimérase pour donner des IdoA. Cette épimérisation facilite la 2-*O*-sulfatation de l'IdoA par la HS2ST1 que l'on retrouve alors plus souvent sulfaté que les GlcA. Ces deux enzymes sont à cet effet complexées (Esko et Selleck, 2002). La 2-*O*-sulfatation peut également être présente sur le GlcA (Rong *et al.*, 2001).

- La 6-*O*-sulfatation et la 3-*O*-sulfatation du GlcNS voir du GlcNAc par les enzymes de la famille des HS6ST et HS3ST interviennent (Kusche-Gullberg et Kjellen, 2003). Dans le cas où le GlcN est déacétylé et non sulfaté, une enzyme de la famille des HS3ST, la HS3ST3A, montrerait une activité accrue (Liu, J. *et al.*, 1999).

L'héparine et les héparanes sulfates se structurent en domaine correspondant à leur niveau de sulfatation. Au niveau de l'héparine, le plus sulfaté des glycosaminoglycannes, on y retrouve majoritairement un domaine hypersulfaté nommé NS (N-sulfate) allant de 2 à 9 disaccharides très sulfatés, avec comme motif disaccharidique : IdoA(2S)- β (1-4)-GlcNS(6S). En comparaison, les héparanes sulfates présentent une plus grande hétérogénéité de sulfatation le long des chaînes glucidiques. On peut alors déterminer trois domaines différents. Un domaine hypersulfatés NS, un domaine NA/NS moyennement sulfaté et un domaine NA (N-acétate) peu ou pas sulfaté composé de 16 à 18 unités disaccharidiques (Figure 41) (Lindahl *et al.*, 1998, Esko et Lindahl, 2001, Gallagher, 2001).

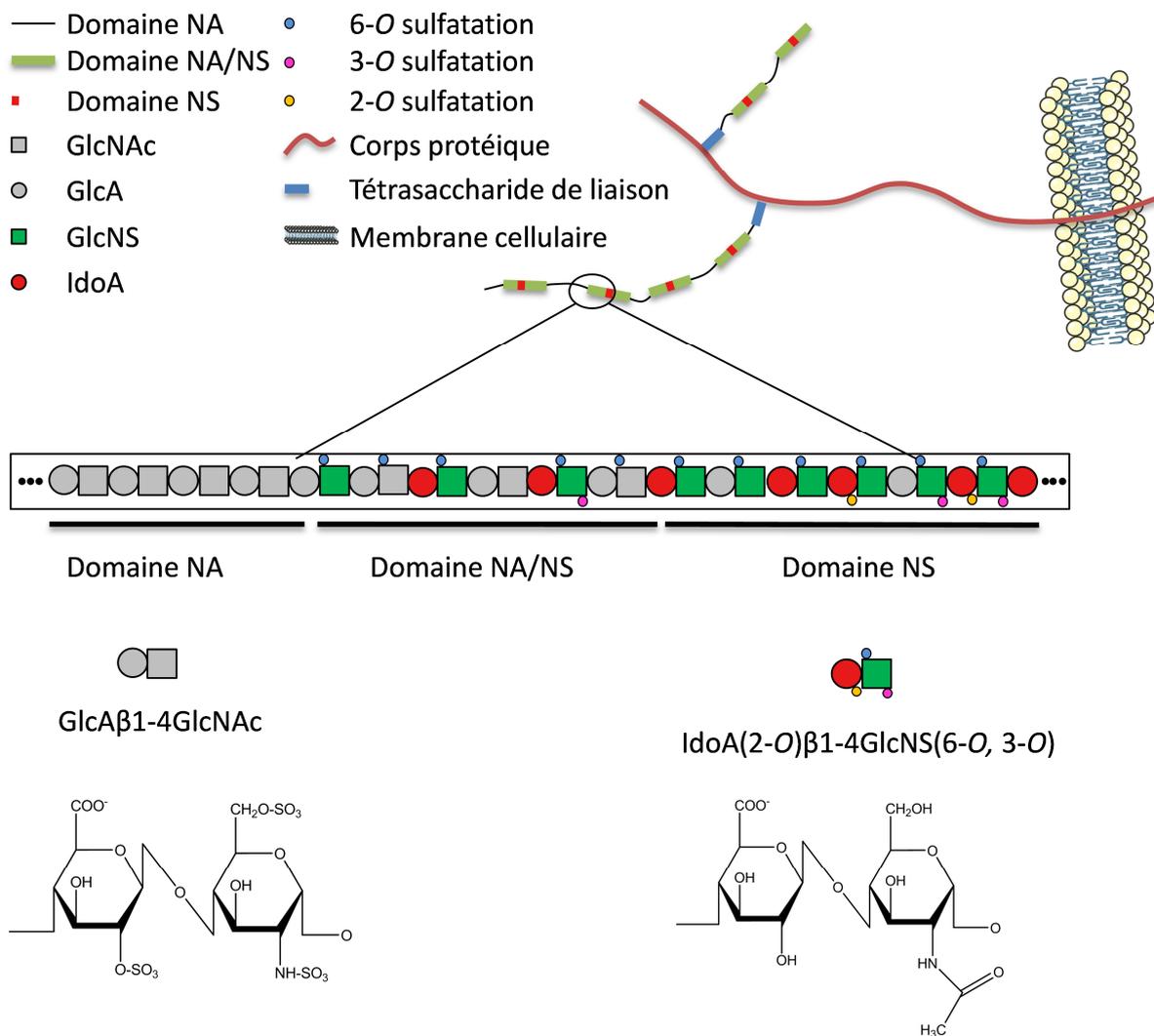


Figure 41 : Structure d'un héparane sulfate attaché à la fraction protéine d'un protéoglycane ancré à la membrane cellulaire, d'après Turnbull *et al.*, 2001.

Les domaines NS protégeraient les glycosaminoglycannes de la dégradation par des enzymes entraînant une variation dans la longueur des chaînes glycaniques portées par le protéoglycannes (Ben-Zaken *et al.*, 2003) (Figure 42).

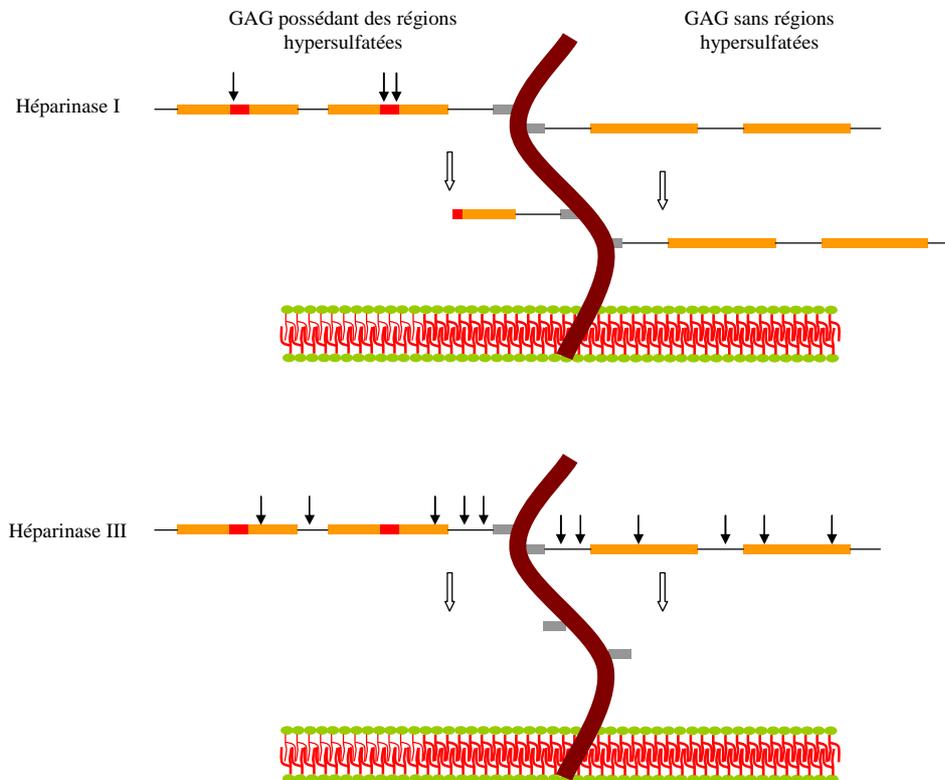


Figure 42 : Influence du code de sulfatation sur la sensibilité des GAGs aux enzymes de dégradation. L'héparinase I digère uniquement au sein des régions hyper sulfatées (en rouge). Les fragments de GAGs produits sont donc différents selon que la chaîne possède ou non ces régions. L'héparinase III digère 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.

ii. Modification post-synthétique des chondroïtines sulfates et dermatanes sulfates

Dans le cas de chondroïtine/dermatanes sulfates, l'ordre d'intervention des enzymes de modification de la chaîne glucidique n'est pas aussi tranché que pour les héparine/héparanes sulfates. Tout d'abord les chondroïtine sulfates et les dermatanes sulfates ne subissent pas de *N*-déacétylation mais une épimérisation en C5 du GlcA le transformant en IdoA est possible. Cette modification a pour conséquence d'obtenir une chaîne de type dermatanes sulfates.

En ce qui concerne la sulfatation, les trois familles de sulfotransférases qui agissent sont les chondroïtine 4-*O*-sulfotransférases, les 6-*O*-transférases et l'hexuronyl CS/DS 2-*O*-transférase. Les

enzymes CHST11, 12, 13 et 14 (également nommées C4ST1, 2, 3 et D4ST1) effectuent la sulfatation en position 4 du GalNAc. CHST13 n'est pas capable de sulfater une chaîne de dermatanes sulfates alors que CHST14 n'agit que sur ces derniers empêchant l'épimérisation inverse (Silbert et Sugumaran, 2002).

La sulfatation en position 6 du GalNAc est catalysée par les enzymes CHST3, 7 et 15 (également nommées C6ST1, 2 et GalNAc4S-6ST). Cette dernière a la capacité de sulfater en position 6 lorsque la position 4 l'est déjà contrairement aux deux précédentes.

Enfin la sulfatation en position 2 du GlcA ou de l'IdoA est réalisée par une CS/DS uronyl 2-O-sulfotransférase (également nommée CS/DS2ST ou UST). Ce type de sulfatation est conditionné par l'état de sulfatation du GalNAc adjacent. Silbert et Sugumaran rappellent que la présence d'un sulfate en position 2 d'un GlcA est rare, et qu'elle n'est présente que si le GalNAc adjacent est sulfaté en position 6 (Silbert et Sugumaran, 2002). Pour ce qui est du 2-O-sulfate sur l'IdoA, il est majoritairement associé à une 4-O-sulfatation du GalNAc.

iii. Modification post-synthétique des kératanes sulfates

Contrairement aux héparine/héparanes sulfates et chondroïtines/dermatanes sulfates, une partie de la sulfatation de kératanes sulfate intervient pendant l'élongation. En effet, lorsque β 3Gn-T7 ajoute le GlcNAc en position non réductrice de la chaîne, celui-ci est 6-O-sulfaté par l'enzyme CHST6 (GlcNAc6sT-5) (Akama *et al.*, 2002) dans les cas des KS de type I ou par les enzymes CHST2 et 4 (GlcNAc6sT-1, 2) dans le cas de type II (Kusche-Gullberg et Kjellen, 2003).

V.4. Dégradation des glycosaminoglycannes

La dégradation des glycosaminoglycannes peut être partielle et dans ce cas, nous parlerons d'un remodelage fonctionnel orientant vers une fonction biologique particulière, ou complète, et nous parlerons de recyclage.

V.4.a. Remodelage fonctionnel

Le remodelage fonctionnel est plutôt considéré comme un complément de modification post-synthétique en plus de la sulfatation et de l'épimérisation. Cette activité de dégradation a lieu à l'extérieur de la cellule, et est réalisée par deux familles d'enzymes : des hydrolases et des endosulfatases (Tableau 8 et Tableau 9).

Les hydrolases peuvent être divisées en deux catégories, les exoglycosidases et les endoglycosidases. Ces dernières ont la capacité de cliver les chaînes oligosaccharidiques en fonction de leurs séquences de reconnaissance. Au sein de cette famille, on distingue les héparanases, les hyaluronidases et les kératanases agissant respectivement sur les héparanes sulfates, les chondroïtines sulfate, les dermatanes sulfates, l'acide hyaluronique et les kératanes sulfates.

Les héparanases sont des enzymes qui permettent la dégradation des héparanes sulfates. Il existe trois enzymes dans cette famille, la CTAP-III (Connective tissue activating peptide III) (Proudfoot *et al.*, 1997), l'HSPE (Freeman et Parish, 1998) et l'HSPE 2 (McKenzie *et al.*, 2000). L'HSPE est localisée dans le sous endothélium (Dempsey *et al.*, 2000) et est surexprimée dans les cellules tumorales ou métastatiques d'un grand nombre de tissus (Vlodavsky *et al.*, 1999). L'HSPE 2 n'est pas exprimée dans les mêmes tissus que l'HSPE et son activité n'a toujours pas été confortée. Le rôle des héparanases est de remodeler les héparanes sulfates pour les adapter à l'état environnemental de la cellule comme au niveau des sites inflammatoires, ce qui favorise la migration leucocytaire (Parish *et al.*, 1998). Cette dégradation des héparanes sulfates aiderait le transport de protéines qui leurs sont liées vers leur lieu d'action (Sperinde et Nugent, 1998, Tumova *et al.*, 1999), mais également la libération de fragment d'héparanes sulfates ayant une activité de facteur de croissance (Vlodavsky *et al.*, 2006).

Les hyaluronidases ont tout d'abord été identifiées comme des endoglycosidases des AH, mais leur champs d'action est plus large. Il s'agit d'endo- β -acétylhexosaminidases comprenant 6 membres chez les mammifères : les Hyal 1 à 4, Phyal1 et PH-20/Spam1. Hyal 1 et 2 ont une expression ubiquitaire, mais seul Hyal 1 possède une faible activité envers les chondroïtines sulfates (Jedrzejak et Stern, 2005), Hyal 2 quant à elle ne possède d'activité qu'envers l'acide hyaluronique, leur activité vis-à-vis des chondroïtines sulfates n'ayant pas encore été prouvée. Hyal 4 quant à elle, possède uniquement une activité envers les chondroïtines hypersulfatés de type CS-D (Csoka *et al.*, 2001, Kaneiwa *et al.*, 2010), seulement son expression localisée dans le placenta et les muscles squelettiques n'explique pas la dégradation dans les autres tissus. PH-20/Spam1 est exprimée dans les testicules et joue un rôle dans la fécondation (Cherr *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, les deux autres hyaluronidases n'ont pas d'activité définie.

Ce remodelage pourrait être également réalisé par des molécules non enzymatiques comme l'acide hypochloreux et l'acide hypobromique provoquant une fragmentation des glycosaminoglycannes (Rees et Davies, 2006, Rees *et al.*, 2007).

Tableau 8 : Récapitulatif des endoglycosidases et exoglycosidases intervenant dans la dégradation de GAGs.

| Enzyme | Réaction | GAGs impliqué | Fonction |
|-----------------------------------|---|---------------|-----------------|
| α -L-iduronidase | Hydrolyse de la liaison α L iduronosodic | DS | Endoglycosidase |
| Hyaluronoglucosaminidase | Hydrolyse de la liaison GalNAc β (1,4)GlcA du résidu GalNAc4S | CS/DS | Endoglycosidase |
| Hexosaminidase | Hydrolyse de la liaison GlcNAc β (1,4)GlcA du résidu GlcNAc6S | KS | Exoglycosidase |
| β -galactosidase | Hydrolyse de la liaison Gal β (1,4)GlcNAc | KS | Exoglycosidase |
| β -glucuronidase | Hydrolyse de la liaison GalNAc β (1,4)GlcA | GalAGs | Exoglycosidase |
| α -N-acetylglucosaminidase | Hydrolyse de la liaison GlcNAc α (1,4)GlcA | Hp/HS | Exoglycosidase |
| Héparanase 1 | Hydrolyse de la liaison GlcA β (1,4)GlcNAc | Hp/HS | Endoglycosidase |

Tableau 9 : Récapitulatif des sulfatases intervenant dans la dégradation de GAGs.

| GAGs impliqué | Nom de l'enzyme | Action |
|---------------|---|------------------------|
| HS | glucuronate-2-sulfatase | 2-O-sulfate des GlcA |
| | SGSH (N-sulfoglucosamine sulfohydrolase) | 2-O-sulfate des GlcNAc |
| | IDS (iduronate 2-sulfatase) | 2-O-sulfate des IdoA |
| | GNS (N-acétylglucosamine-6-sulfatase) | 6-O-sulfate des GlcA |
| CS/DS | GALNS (N-acétylgalactosamine-6-sulfatase) | 6-O-sulfate des GalNAc |
| | ARSB (arylsulfatase B) | 4-O-sulfate des GalNAc |
| | IDS (iduronate 2-sulfatase) | 2-O-sulfate des IdoA |
| KS | GNS (N-acétylglucosamine-6-sulfatase) | 6-O-sulfate des GlcA |
| | GALNS (N-acétylgalactosamine-6-sulfatase) | 6-O-sulfate des GalNAc |

V.4.b. Le recyclage

La dégradation totale des glycosaminoglycannes débute dans les endosomes avec l'hydrolyse par les endoglycosidases de la liaison entre le tétrasaccharide de liaison et la chaîne saccharidique, catalysée par la HSPE pour les héparanes sulfates, les hyaluronidases pour les chondroïtines/dermatanes sulfates et une kératine sulfate endo-1,4- β -galactosidase pour les kératanes sulfates. Le corps protéique libéré est alors redirigé vers l'appareil de Golgi au niveau duquel une nouvelle chaîne polysaccharidique sera greffée (Edgren *et al.*, 1997). Au cours de leur migration dans les endosomes, les glycosaminoglycannes libres sont clivés en fragments de tailles inférieures par des endoglycosidases. Les endosomes fusionnent alors avec les lysosomes au niveau desquels différentes exoglycosidases et sulfatases agissent en hydrolysant les sucres à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne pour obtenir des monosaccharides et des sulfates libres. Les monosaccharides et les résidus sulfates sont réutilisés pour synthétiser de nouveaux glycosaminoglycannes (Fuller *et al.*, 2006) (Figure 43).

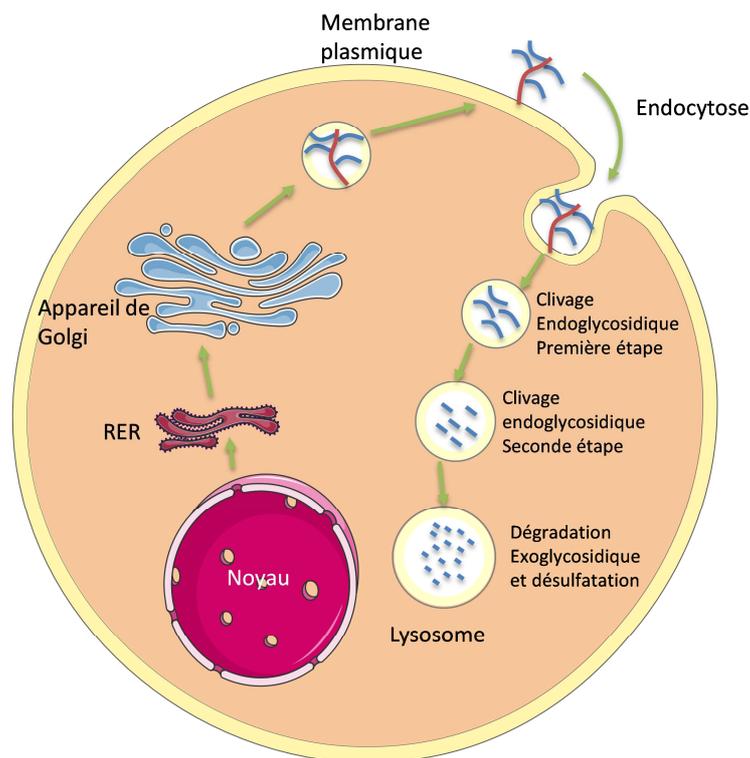


Figure 43 : Schéma représentant la dégradation des glycosaminoglycannes. Après l'endocytose, les GAGs sont séparés de leur corps protéique par des endoglycosidases spécifiques dans un environnement au pH neutre. Par la suite, en environnement acide, les GAGs sont fragmentés par d'autres endoglycosidases. L'étape finale qui se déroule dans le lysosome, consiste en l'intervention d'exoglycosidases et de sulfatases afin d'obtenir des monosaccharides et des sulfates libres, d'après Glycoword.

Le recyclage des glycosaminoglycannes est obligatoire car en cas de dysfonctionnement, l'individu développe une mucopolysaccharidose (MPS), terme regroupant un ensemble de 12 pathologies, caractérisées par, l'absence ou la trop faible présence d'enzymes lysosomales impliquées dans la dégradation des GAGs (Prabhakar et Sasisekharan, 2006).

V.5. Rôle des glycosaminoglycannes dans le système nerveux

Les héparanes sulfates et les chondroïtines sulfates sont très importants pour la construction du réseau neural qui comprend l'adhésion, le développement, la différenciation et la prolifération des cellules (Jiang et Couchman, 2003). Au niveau du SNC, les glycosaminoglycannes sont impliqués dans la morphogénèse, la plasticité neuronale, la réparation tissulaire ou encore la guidance axonale (Ichijo, 2006, Inatani *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2003, Hikino *et al.*, 2003, Fawcett, 2009). Du fait de leur large expression et de leur grande variété d'action, les glycosaminoglycannes sont impliqués dans de nombreuses pathologies allant de la cancérisation aux maladies neuro-dégénératives (Diaz-Nido *et al.*, 2002, Cohlberg *et al.*, 2002, Yin *et al.*, 2010, Theocharis *et al.*, 2010, Ween *et al.*, 2011).

Comme précédemment mentionné, les chondroïtines sulfates sont les glycosaminoglycannes les plus abondants au niveau du SNC. Une grande variété de protéoglycannes à chaînes de chondroïtines sulfates a été observée (Sugahara et Mikami, 2007) (Tableau 10). Il est connu qu'en fonction de leur patron de sulfatation, les chondroïtines sulfates portés par les PGs peuvent interagir avec différentes protéines dans la matrice extracellulaire (MEC). Ces spécificités d'interaction créent une organisation de la MEC propre au SNC. Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant le rôle des chondroïtines sulfates dans le SNC. Ils seraient impliqués dans le maintien de l'architecture tissulaire, dans la maturation des synapses des motoneurones (Rhodes et Fawcett, 2004). Il a également été montré qu'ils inhibent la plasticité et la régénération neuronale ainsi que la croissance axonale (Gu, W. L. *et al.*, 2009, Filous *et al.*, 2010). Si l'on prend le cas de la guidance axonale, ils inhiberaient par leur présence, la croissance des axones vers des régions dépourvues de chondroïtines sulfates. Elles agiraient également comme protecteurs neuronaux et anti-inflammatoires (Canas *et al.*, 2010, Egea *et al.*, 2010).

Tableau 10 : Récapitulatif des PGs à chaînes de CS localisés dans le SNC, d'après Aono et Oohira, 2006

| Nom du PG | Taille du core protéique (kDa) | Localisations | Origine cellulaire |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------|---------------------------------------|
| Brevican ^a | 145 | Sécrété | Cellules gliales/Neurones |
| GPI-brevican ^a | 140/125 | GPI | Cellules gliales |
| Versican V0 | ~550 | Sécrété | |
| Versican V1 | ~500 | Sécrété | |
| Versican V2 ^a | 400 | Sécrété | Oligodendrocytes |
| Aggrecan | 370 | Sécrété | Neurones |
| Neurocan ^a | 245 | Sécrété | Neurones/Astrocytes |
| Phosphocan ^a | 300 | Sécrété | Cellules gliales/Neurones |
| RPTPβ | 380 | Membranaire | |
| Neuroglycan C I ^a | 120 | Membranaire | Neurones |
| Neuroglycan C III ^a | >120 | Membranaire | Neurones |
| Neuroglycan C IV ^a | <120 | Membranaire | Neurones |
| NG2 | 300 | Membranaire | O2A progéniteurs des cellules gliales |
| Appicans | 96-130 | Membranaire | Astrocytes/Microglie |
| L-APLP2S | 100/110 | Membranaire | Astrocytes/Microglie |
| Testican/SPOCK | | Sécrété | Neurones |

^a Protéoglycannes spécifiques du SNC.

Les héparanes sulfates sont eux aussi fortement présents dans le cerveau où ils interagissent avec de nombreuses protéines (Zhang, X. et Li, 2010) notamment la PrP. Cette interaction implique la partie amino-terminale de la protéine prion au niveau des résidus chargés positivement 25-KKRPK-29 (Warner *et al.*, 2002). D'autres sites de liaison ont été mis en évidence, mais l'interaction est plus faible. Il s'agit des résidus 34 à 46, 44 à 56, 54 à 65 et 108 à 120. On retrouve des protéoglycannes à chaînes d'héparanes sulfates dans deux des quatre familles de PGs : membranaires (Syndecan, glypican) et sécrétés (Perlecan et Agrin) (Figure 44). Ils sont impliqués tout comme les chondroïtines sulfates dans le maintien de l'architecture de la MEC en créant un gradient de molécules morphogènes (Nadanaka et Kitagawa, 2008). Ils sont également impliqués dans le stockage de ligands ou de co-récepteurs insolubles (constituant de la MEC, agents pathogènes) et solubles (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines) formant ainsi un complexe de signalisation avec leurs récepteurs (Bernfield *et al.*, 1999, Kreuger *et al.*, 2006). Ils peuvent également agir comme des effecteurs paracrines en étant relâchés dans la MEC.

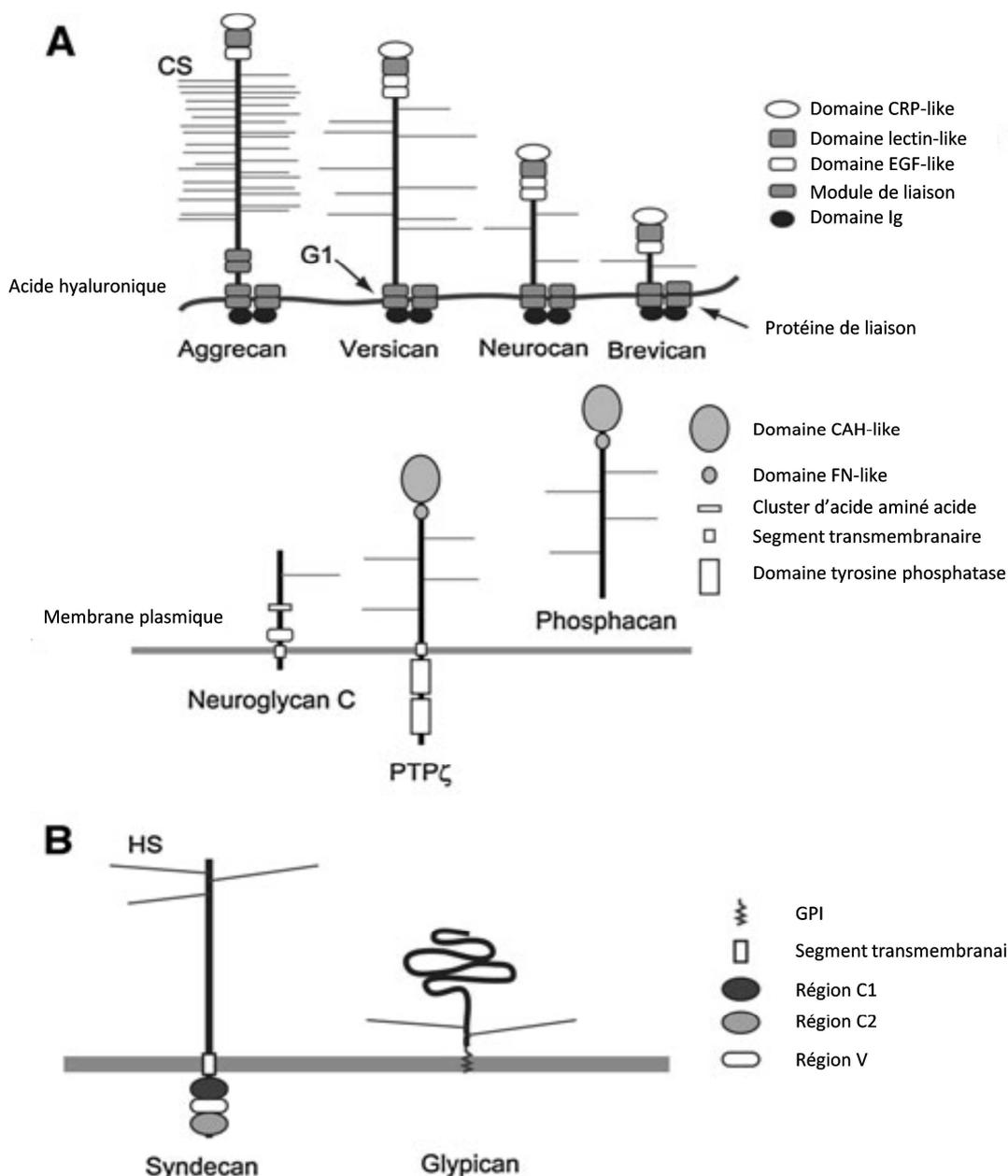


Figure 44 : Schéma représentant les PGs à chaîne d'héparanes sulfates retrouvés dans le cerveau. D'après Maeda, 2010

Parmi la famille des kératanes sulfates, seuls les kératanes sulfates III sont exprimés dans le système nerveux central (Funderburgh, 2002). Ils ont, comme les chondroïtines sulfates, pour fonction d'inhiber la croissance axonale (Jones, L. L. et Tuszynski, 2002). Leur expression n'est pas générale dans les SNC, chez l'adulte on les retrouve dans la microglie où ils participent à la réponse post-traumatisme (lésion physique) (Zhang, H. *et al.*, 2006b). Ils sont exprimés par les astrocytes chargés de former une cicatrice gliale et empêchent la régénération des neurones (Figure 45). La sulfatation des kératanes semble être primordiale pour l'orientation de l'action du glycosaminoglycane car Zhang et coll ont montré que la 6-O-sulfatation du GlcNAc est responsable

de l'inhibition de la croissance axonale (Zhang, H. *et al.*, 2006a). L'utilisation de souris KO pour le gène *GlcNAc6ST-1* a montré une diminution de la cicatrisation gliale et une augmentation de la croissance axonale après un traumatisme du SNC. Il a aussi été montré une modification de l'expression de sulfotransférases impliquées dans la synthèse des kératanes sulfates dans le cas de tumeurs astrocytaires (Kato *et al.*, 2008).

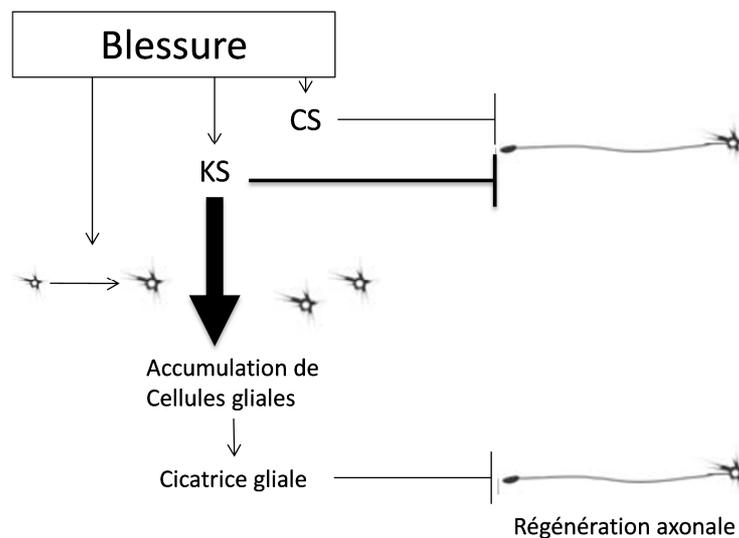


Figure 45 : Schéma représentant une hypothèse des rôles assurés par les KS et les CS dans la régénération neuronale et la cicatrisation gliale suite à un traumatisme dans le cerveau, d'après Zhang, H. *et al.*, 2006b.

V.6. Implication des glycosaminoglycannes dans les maladies neurodégénératives conformationnelles

Les pathologies à prion sont des maladies neuro-dégénératives au cours desquelles l'intégrité du CNS est atteinte. La MEC du CNS est riche en glycosaminoglycannes. Ceux-ci, notamment les héparanes sulfates et les dermatanes sulfates, sont retrouvés associés aux plaques amyloïdes (signes caractéristiques de ces pathologies) (Sipe, 1992, Fukuchi *et al.*, 1998, Ancsin, 2003, Hirschfield et Hawkins, 2003). Des études révèlent la capacité des héparanes sulfates et des HSPG à faciliter l'initiation de la formation de fibrille d'APP (Amyloid Precursor Protein) (Castillo *et al.*, 1998), de peptide β -amyloïde (Castillo *et al.*, 1999), de SAA (Serum Amyloid A) (Ancsin et Kisilevsky, 1999), de la protéine τ (Goedert *et al.*, 1996), de l' α -sinucléine (Cohlberg *et al.*, 2002) et de la protéine prion (Supattapone, 2004).

V.6.a. Maladie d'Alzheimer

La maladie neurodégénérative conformationnelle la plus connue est la maladie d'Alzheimer. Décrite en 1906 par le Dr Alois Alzheimer, elle se caractérise par des troubles mnésiques, de l'apraxie (perte de la compréhension de l'usage des objets usuels), de l'aphasie (impossibilité de traduire la pensée par les mots) et de l'agnosie (défaut de reconnaissance). Cette maladie est liée à l'accumulation extracellulaire de protéines β -amyloïdes dans certaines régions du cerveau. Cette accumulation induit la formation de plaques amyloïdes entraînant la mort des neurones. La maladie est également liée à la formation de neurofibrilles enchevêtrées constituées de protéine τ anormalement phosphorylée (Lee, V. M. *et al.*, 1991).

Les protéoglycannes de types héparanes sulfates (perlecan, l'agrin, le glypican 1 et les syndecan 1 et 3) sont associés aux dépôts amyloïdes et aux neurofibrilles enchevêtrées (Snow *et al.*, 1987, Young, I. D. *et al.*, 1989, Snow *et al.*, 1990a, Perry *et al.*, 1991, Watson *et al.*, 1997). La sulfatation des glycosaminoglycannes est essentielle pour qu'il y ait association avec les fibrilles, car une désulfatation chimique empêche le phénomène (Castillo *et al.*, 1999).

Deux rôles leur sont attribués:

- une facilitation de la formation du peptide β -amyloïde (Narindrasorasak *et al.*, 1991, van Horssen *et al.*, 2003).
- un « chaperonnage » protégeant le peptide β -amyloïde et les dépôts de protéines τ de la dégradation par des protéases (Snow et Wight, 1989, van Horssen *et al.*, 2003).

V.6.b. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une autre maladie conformationnelle dans laquelle les glycosaminoglycannes jouent un rôle. Cette pathologie est liée à l'agrégation de la protéine α -synucléine qui se caractérise par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire. Deux phénomènes sont responsables de l'agrégation de cette protéine :

- la présence de mutations dans le gène codant l' α -synucléine (Kruger *et al.*, 1998, Polymeropoulos *et al.*, 1997).
- L'interaction avec les glycosaminoglycannes (El-Agnaf *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2001, Narhi *et al.*, 1999).

Le protéoglycane impliqué dans cette pathologie est l'Agrine qui a été co-localisée avec l' α -sinucléine au niveau des corps de Lewy. Elle augmente la vitesse d'agrégation des fibrilles, ce qui en fait une actrice important du développement de cette pathologie (Liu, I. H. *et al.*, 2005).

V.6.c. Maladies à prions

Les glycosaminoglycannes sont également impliqués dans les maladies à prions (Diaz-Nido *et al.*, 2002, Snow *et al.*, 1990b). Leur métabolisme est affecté au cours d'une infection par les prions. On retrouve des métabolites des GAGs dans les urines des moutons et des humains malades mais également dans celles des souris transgéniques *Prnp*^{-/-} (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2005). La même équipe a récemment montré que l'activité hexosaminidase (dégradation des GAGs dans les lysosomes) augmentait dans le cerveau de souris malades (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2008). Ce résultat est confirmé par des travaux réalisés au laboratoire (Guillerme-Bosselut *et al.*, 2009). La présence de GAGs endogènes est obligatoire pour la liaison de la PrP^{Sc} à la cellule. En effet l'absence d'héparanes sulfates dans des cellules CHO empêche la fixation de la PrP^{Sc} et son internalisation (Hijazi *et al.*, 2005). De la même manière, la digestion enzymatique des GAGs de cellules N2a, CHO ou GT1-1 empêche l'internalisation de la PrP^{Sc} (Horonchik *et al.*, 2005).

Les GAGs de type héparanes sulfates sont retrouvés au niveau des dépôts amyloïdes dans le système nerveux (Guiroy *et al.*, 1991) où ils co-localisent avec la protéine PrP^{Sc} (McBride *et al.*, 1998).

Le rôle des HS est paradoxal quant à leur implication dans les pathologies à prion. D'un côté ils favorisent la formation de PrP^{Sc}: la diminution des héparanes sulfates cellulaires conduit à une réduction de la formation de la PrP^{Sc} (Ben-Zaken *et al.*, 2003). Wong et coll, suggèrent que les carbohydrates sulfatés induisent le changement conformationnel de la PrP^C et stimulent sa conversion en PrP^{res} (protéine résistance à la digestion par la PK) (Wong *et al.*, 2001). Les GAGs stimulent également l'amplification de PrP^{res} *in vitro* (Deleault *et al.*, 2005) et induisent la formation d'agrégats d'un fragment de protéine prion (PrP 185-208) dans les cellules neurales (Cortijo-Arellano *et al.*, 2008).

D'un autre côté, les héparanes sulfates inhibent l'apparition de PrP^{Sc}: Perez et coll, montrent que les GAGs sont capables d'inhiber la polymérisation de protéine prion synthétique (Perez *et al.*, 1998). De même, ils inhibent l'accumulation de PrP^{res} en augmentant le taux d'internalisation de la PrP^C dans des cellules infectées (Caughey et Raymond, 1993, Shyng *et al.*, 1995).

Tous les protéoglycannes porteurs de chaînes d'héparanes sulfates ne seraient pas impliqués dans l'interaction avec la protéine prion. Une expérience utilisant des siARN dirigés contre le

glypican-1 aboutit à la diminution de 55 % de la quantité de PrP^{Sc} dans des cellules N2a contrairement à l'utilisation de siARN dirigés contre le syndecan-1 (Taylor *et al.*, 2009).

Plus récemment, les chondroïtines sulfates ont été identifiés comme partenaires de la protéine prion en particulier les CS A (Triantaphyllidou *et al.*, 2006). La préférence d'interaction entre la PrP et les héparanes sulfates et chondroïtines sulfates n'est pas tranchée, et semble être tissu spécifique car l'expression de ces deux types de glycosaminoglycannes est hétérogène (Ben-Zaken *et al.*, 2003).

D'après Hooper, le paradoxe pourrait être expliqué par le fait que les GAGs exogènes entreraient en compétition avec le glypican-1 et autres HSPGs cellulaire pour la liaison avec la PrP^C et/ou PrP^{Sc} dans les cellules et les modèles animaux, ne permettant pas un contact assez proche pour induire la conversion (Hooper, 2011) contrairement aux systèmes acellulaires dans lesquels les GAGs serviraient de chaperons facilitant le contact entre la PrP^C et la PrP^{Sc} (Figure 46). Par contre, Bazar *et coll.*, proposent que les GAGs agiraient plutôt en empêchant la liaison entre la PrP^{Sc} avec la membrane qu'en modulant les propriétés fibrillaires (Bazar *et al.*, 2011).

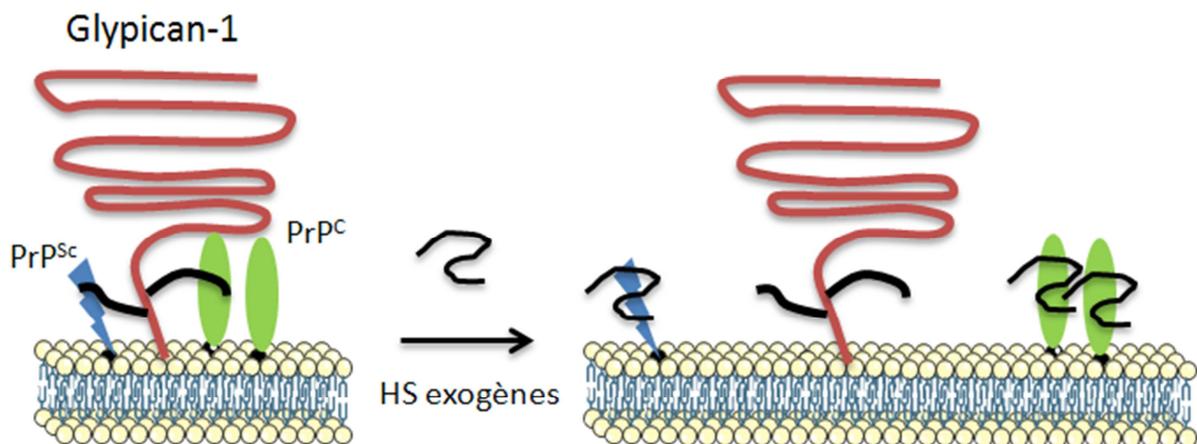


Figure 46 : Schéma représentant l'hypothèse d'Hooper sur la compétition entre les GAGs exogènes et le glypican-1 vis-à-vis de la PrP^C et de la PrP^{Sc}. Les HS et autres molécules thérapeutiques dérivées des HS pourraient agir pour partie en empêchant le contact entre la PrP^C et la PrP^{Sc} facilité par les chaînes de GAGs du glypican-1, d'après Hooper, 2011.

Par leurs multiples aspects, les GAGs sont considérés comme des molécules thérapeutiques potentielles. Différents glycanes sulfatés (héparines, suramine, pentosane polysulfate, dextrane sulfate) ainsi qu'une nouvelle classe d'héparanes mimétiques (HM2602) réduisent l'accumulation de la PrP^{Sc} *in vitro* et *in vivo* (Ehlers et Diringer, 1984, Ladogana *et al.*, 1992, Caughey et Raymond, 1993, Gabizon *et al.*, 1993, Schonberger *et al.*, 2003, Doh-ura *et al.*, 2004, Barret *et al.*, 2005, Ouidja *et al.*, 2007, Bone *et al.*, 2008). Il est important de noter que deux facteurs jouent un rôle important dans la diminution de l'accumulation de PrP^{Sc}. Il s'agit de la longueur des chaînes saccharidiques et du degré

de sulfatation de ces dernières. En ce qui concerne la sulfatation, les chaînes non sulfatées sont incapables d'influer sur l'accumulation alors que les chaînes moyennement sulfatées ont la capacité la plus importante. Lorsque les chaînes sont complètement sulfatées, l'efficacité se révèle moins bonne (Ouidja *et al.*, 2007).

VI. CHST8 : Une sulfotransférase d'intérêt

La protéine CHST8 (GalNAc-4-sulfotransférase 1) est codée par le gène *Chst8* situé sur les chromosomes 19 humain, 7 murin et 18 bovin. Sa localisation ainsi que sa séquence chez le mouton ne sont pas connues. Chez l'homme, le gène *Chst8*, organisé en 4 exons et 3 introns, produit trois transcrits de 2478, 2225 et 2136 pb possédant le même cadre de lecture ouvert (ORF : Open Reading Frame) d'une longueur de 1275 nucléotides. La traduction de cet ORF produit une protéine de 424 acides aminés d'une masse d'environ 49 kDa. La protéine humaine possède quatre sites potentiels de *N*-glycosylation aux positions 128, 294, 367 et 415.

Le gène murin est également organisé en 4 exons et 3 introns, produisant trois transcrits de 2372, 2053 et 830 pbs (Figure 47). Contrairement aux transcrits humains, un seul des trois transcrits murins (2372 pbs) possède un ORF d'une longueur de 1251 nucléotides traduit en une protéine de 417 acides aminés (Figure 48). Le second transcrit de 2053 nucléotides possède un codon stop prématuré entraînant une dégradation par le système NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay). Le dernier transcrit, le plus court, correspond à un transcrit non traduit. La protéine murine possède cinq sites potentiels de *N*-glycosylation aux positions 121, 122, 287, 360 et 408.

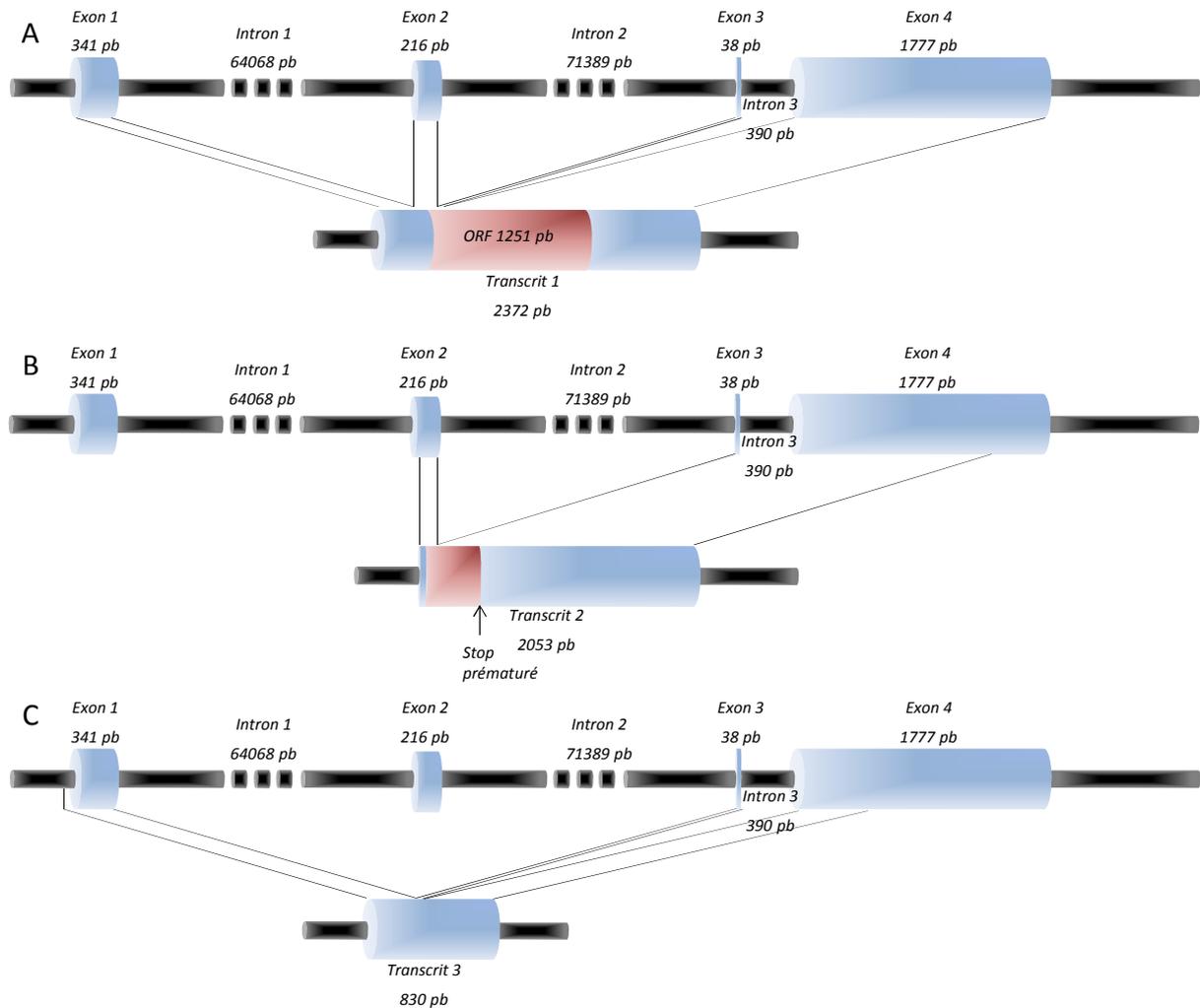


Figure 47 : Organisation génomique du gène *Chst8* murin et des transcrits produit. Les exons sont indiqués en bleu et les introns en noir. La partie des transcrit en rose correspond à la séquence traduite ou potentiellement traduite. **(A)** le transcrit 1 est le seul produire une protéine. **(B)** ce transcrit possède un codon stop prématuré qui le dirige vers une dégradation par le système NMD. **(C)** le transcrit 3 correspond à un transcrit non traduit.

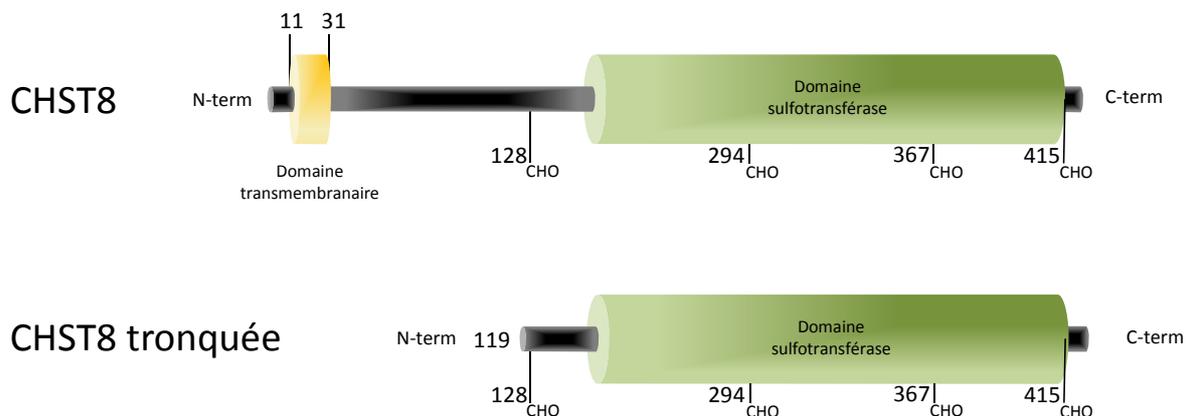


Figure 48 : Représentation de la protéine CHST8 humaine avec ses domaines d'activité. La protéine CHST8 humaine existe sous deux formes, suite à un clivage protéolytique. Ce clivage permet la libération de la forme tronquée dans le milieu extracellulaire. En jaune est symbolisé le domaine transmembranaire et en vert le domaine d'activité sulfotransférase.

CHST8 appartient à la famille des HNK-sulfotransférases comprenant également la HNK-1 sulfotransférase (Bakker *et al.*, 1997, Ong *et al.*, 1998), les chondroïtines-4-sulfotransférases 1, 2 et 3 (Hiraoka *et al.*, 2000, Okuda *et al.*, 2000, Yamauchi *et al.*, 2000, Kang *et al.*, 2002), la dermatane-4-sulfotransférase 1 (Evers *et al.*, 2001) et la GalNAc-4-sulfotransférase 2 (CHST9) (Hiraoka *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2001, Okuda *et al.*, 2003). Toutes ces enzymes présentent de fortes homologues au niveau des séquences peptidiques correspondant au domaine catalytique. La chondroïtine-4-sulfotransférase 1 et CHST8 présentent notamment 42 % d'identité et 60 % d'homologie.

Les protéines CHST8 et 9 sont des enzymes golgiennes transmembranaires de type II (Xia *et al.*, 2000, Okuda *et al.*, 2003). Elles catalysent le transfert d'un groupement sulfate provenant d'un substrat donneur (PAPS : 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) sur un substrat accepteur qui est la position 4 non réductrice d'un *N*-acétylgalactosamine (Xia *et al.*, 2000, Okuda *et al.*, 2003). Ces deux enzymes présentent néanmoins des variations dans leur efficacité vis-à-vis des substrats accepteurs. Elles sont exprimées dans de nombreux tissus et plus fortement dans la glande pituitaire (Boregowda *et al.*, 2005). Cette glande est connue pour synthétiser des glycoprotéines portant des motifs terminaux β 1,4GalNAc-4-SO₄ comme la LH, la TSH et la POMC (Baenziger et Green, 1988, Skelton *et al.*, 1992). CHST8 est la plus présente des deux enzymes dans de multiples régions du cerveau, du rein, des ovaires et de l'utérus. La différence des taux de transcrite de *Chst8* et *9* ainsi que leur ratio dans les différents tissus indiquent que leur expression est régulée de manière indépendante (Boregowda *et al.*, 2005). Tout cela indique qu'elles ont probablement une spécificité et/ou des propriétés différentes.

Une forme tronquée non golgienne de CHST8 a été observée chez l'humain. Elle ne résulte pas d'un épissage alternatif, mais d'un clivage de la forme transmembranaire comme il a déjà été montré pour d'autres glycosyltransférases (Colley, 1997). *In vitro*, son activité est orientée vers la sulfatation de la position 4 du GalNAc des chondroïtines (Xia *et al.*, 2000). Barret et coll l'ont mis en évidence au niveau de la région hypothalamo-hypophysaire chez la souris (Figure 49) (Barret *et al.*, 2005). Seulement il n'est pas encore déterminé si cette sulfatation se produit sur le résidu GalNAc terminal non réducteur et/ou si elle se produit au sein même de la chaîne saccharidique.

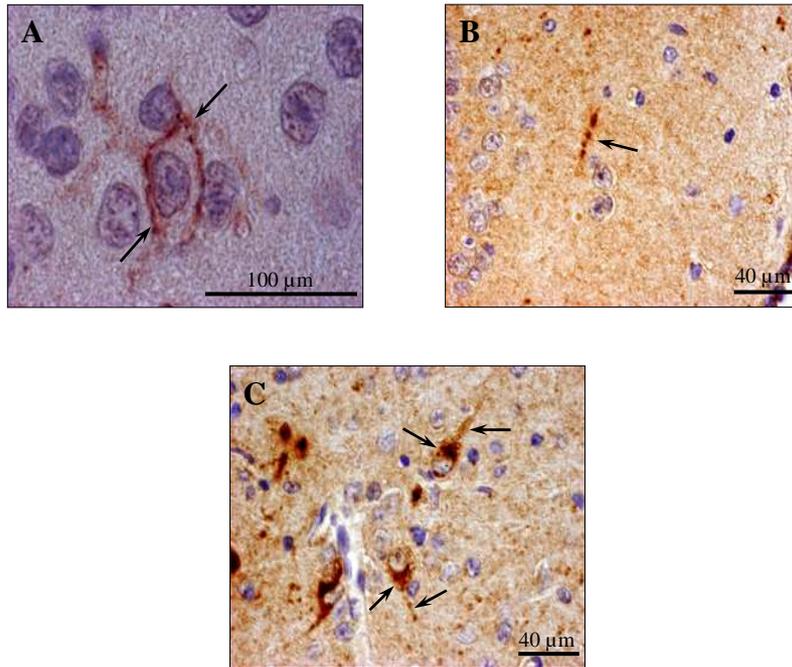


Figure 49 : Immunolocalisation de l'enzyme GalNAc4-ST1 sur cerveau de souris. (A et B) Coupes sagittales du cortex cérébral : le marquage correspondant à GalNAc4-ST1 est détecté au niveau de la membrane plasmique et des neurites. **(C)** Coupe latérale au niveau de l'hypothalamus: GalNAc4-ST1 est détectée au niveau cytoplasmique, mais aussi au niveau des extensions dendritiques, d'après Barret *et al.*, 2005.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

A l'heure actuelle, l'identification de l'agent responsable des pathologies à prions n'est plus d'actualité. Par contre, la mise en évidence de partenaires ou de conditions environnementales particulières à la protéine prion demeure en suspens. La protéine prion cellulaire retrouvée dans plusieurs compartiments cellulaires au cours de son métabolisme interagit avec divers partenaires. A la surface de la cellule, lorsque la PrP se situe dans les rafts, elle se trouve dans un environnement riche en glycoconjugués tels que les glycolipides ou les glycosaminoglycannes. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ces derniers au cours de mon travail de thèse. En effet, la protéine prion est en contact avec ces GAGs par l'intermédiaire des charges négatives que portent certains sucres. Plusieurs études ont montré que les charges portées par les GAGs ainsi que leurs distributions le long des chaînes polysaccharidiques s'avèrent importantes pour la stabilisation de la PrP^C et la synthèse d'agrégats (Diaz-Nido *et al.*, 2002, Schonberger *et al.*, 2003, Barret *et al.*, 2005, Ouidja *et al.*, 2007). Les GAGs sont également retrouvés au sein des dépôts amyloïdes dans le système nerveux (Guiroy *et al.*, 1991, Diaz-Nido *et al.*, 2002). De plus, Mayer-Sonnenfeld et coll ont détecté des métabolites de GAGs dans les urines de patients atteints de vMJC ainsi que d'animaux malades (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2005). L'ensemble de ces observations conduit à penser que les GAGs ont un rôle central dans l'établissement et le développement des pathologies à prions en tant que cofacteurs impliqués dans le processus de biosynthèse de la PrP^{Sc} en étant un partenaire de la PrP^C et de la PrP^{Sc} (Caughey et Baron, 2006). Cette hypothèse est également soutenue par le fait que la PrP^C est thermodynamiquement moins stable que la PrP^{Sc} et qu'elle nécessite donc des interactions lui permettant de rester dans sa conformation cellulaire (Baskakov *et al.*, 2001).

Si l'on reprend la genèse des recherches sur l'implication des GAGs en relation avec la protéine prion, les premières études ont été menées sur des cellules infectées (ScN2a) montrant alors que l'absence de GAGs de type héparanes sulfates entraînait une diminution du signal de la PrP^{Sc}. Le mécanisme par lequel les héparanes sulfates interviendraient reste flou. Il n'y en a probablement pas qu'un seul, mais le rôle de récepteur pour la PrP infectieuse a été suggéré par Horonchik et coll, 2005, lorsqu'ils ont montré que l'élimination des héparanes sulfates, l'inhibition de leur sulfatation ou encore la compétition avec des glycanes sulfatés entraînaient une diminution de la fixation de la PrP^{Sc} aux cellules ainsi que son internalisation.

Au sein des glycosaminoglycannes, les héparanes sulfates ne sont pas les seuls à jouer un rôle, l'héparine et les chondroïtines sulfates également (Ben-Zaken *et al.*, 2003). La nature du ou des glycosaminoglycannes impliqués pourrait dépendre du tissu et du type cellulaire car leur répartition n'est pas uniforme. Par exemple, dans le SNC ce sont les héparanes sulfates et les chondroïtines sulfate qui sont les plus présents. En fonction du système utilisé (système cellulaire ou animal et

système indépendant des cellules), les actions sont paradoxales. Ils peuvent agir comme acteurs de la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} ou comme inhibiteur de cette même conversion (Hooper, 2011).

Au sein de mon laboratoire d'accueil (UMR-INRA 1061 Génétique Moléculaire Animale), les travaux sur le prion ont débuté par une analyse de l'expression des gènes de la glycosylation au cours du développement des pathologies à prions. Les études ont été menées sur des lignées cellulaires, mais aussi grâce à un modèle animal murin de tremblante expérimentale. La lignée cellulaire utilisée (GT1-7) dérive de l'hypothalamus. L'analyse comparative des gènes de la glycosylation dans cette lignée cellulaire entre des cellules saines (n'exprimant pas la PrP^{Sc}) et des cellules exprimant de façon chronique la PrP^{Sc} a permis de mettre en évidence deux gènes (*Chgn1* et *Chst8*) dont l'expression variait significativement (Figure 50). Ces deux gènes interviennent dans le métabolisme des GAGs de la famille des chondroïtines sulfates, *Chst8* intervenant également dans la modification post traductionnelle de certaines protéines glycosylées. *Chgn1* est le gène codant l'enzyme permettant le greffage du premier sucre orientant la synthèse vers les chondroïtines à la suite du tétrasaccharide de liaison. *Chst8* code une protéine qui lorsque qu'elle est sous sa forme complète permet la sulfatation des résidus GalNAc terminaux des glycanes portés par certaines protéines comme la LH, TSH ou la POMC (Baenziger et Green, 1988, Skelton *et al.*, 1992, Siciliano *et al.*, 1994). Une forme tronquée de cette protéine a été mise en évidence chez l'humain et dans la lignée cellulaire hypothalamique GT1 au niveau de l'espace péri-cellulaire proche de la membrane plasmique et dans les neurites (Figure 49) (Xia *et al.*, 2000, Barret *et al.*, 2005). Elle est dépourvue du domaine transmembranaire et de la région tige responsable de la spécificité du substrat lui conférant une nouvelle activité de sulfatation dirigée vers le carbone en position 4 des résidus GalNAc des chondroïtines.

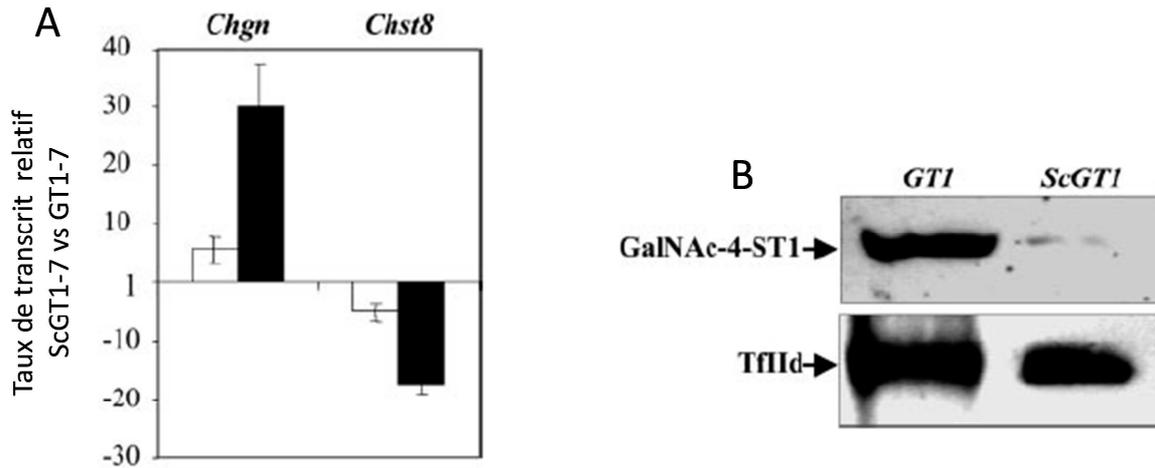


Figure 50 : Analyse de l'expression des gènes *Chgn1* et *Chst8*. (A) Modification de la quantité d'ARN messagers mesurée par une puce à ADN (barres blanches) et par PCR semi-quantitative (barres noires). (B) Analyse par Western Blotting de la présence de la protéine CHST8 (GalNAc-4-ST1) dans les cellules ScGT1 et GT1. La lignée cellulaire GT1 est une lignée hypothalamique neuroendocrine (Barret *et al.*, 2005).

Afin de déterminer si la modification de l'expression du gène *Chst8* était liée à la présence de PrP^{Sc}, les auteurs ont utilisé un agent « curant » de type héparane mimétique pour éliminer la PrP^{Sc} des cellules ScGT1. Cette action a pour résultat un retour à une valeur proche de celle observée dans les cellules GT1 (Figure 51). Ces résultats montrent que la variation d'expression de *Chst8* dépend de la présence de PrP^{Sc} dans les cellules.

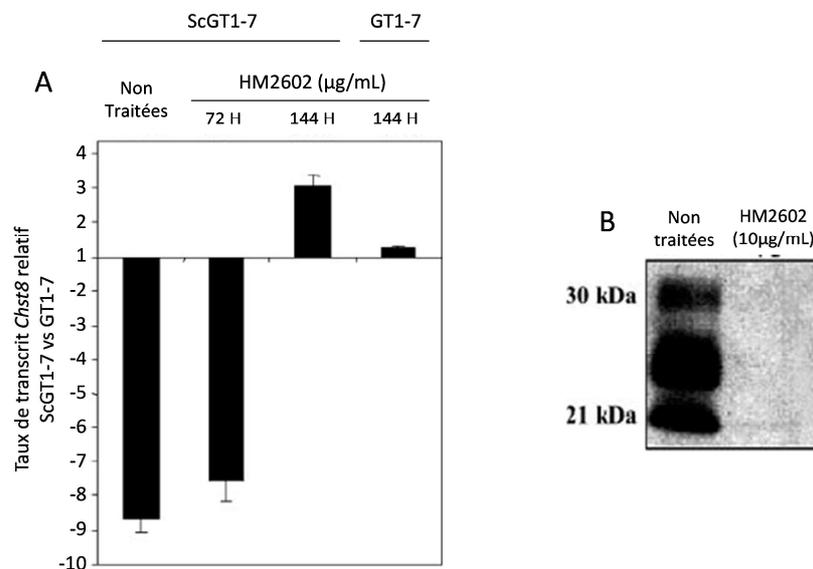


Figure 51 : Expression du gène *Chst8* dans les cellules GT1 et Sc GT1 au cours de la réversion par l'agent curant, le HM2602. Des cellules Sc GT1 non traitées par le HM2602 présentent une sous expression du gène *Chst8*. Après 144 h de traitement, l'expression du gène retrouve une valeur de base. Dans 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 144 h de traitement dans les cellules Sc-GT1. D'après Barret *et al.*, 2005.

L'ensemble de ces résultats nous a amené à nous interroger sur l'influence du gène *Chst8* dans les différents processus liés aux pathologies à prions. Par exemple, la variation de l'expression de *Chst8* serait-elle à l'origine de la transconformation ou en serait-elle une résultante ? De quelle manière la sous expression de *Chst8* influe sur la sulfatation des GAGS et quel est l'impact sur le processus de transconformation ? Pour cela nous avons choisi d'utiliser une lignée cellulaire différente de celle précédemment citée. Il s'agit de la lignée cellulaire MOv qui présentent des caractéristiques de cellules de la gaine de Schwann provenant de souris transgéniques Tg338 sensibles à l'agent de la tremblante (Archer *et al.*, 2004). Ce modèle a été choisi car il présente l'avantage d'être invalidé pour le gène *Prnp* murin et de posséder 6 copies de gène *Prnp* ovin (génotype sensible VRQ). Ceci a pour effet une surexpression d'un facteur 8 de la protéine prion ovine. Cette lignée est aussi sensible à l'infection par l'agent de la tremblante, 127S. De plus, une analyse différentielle du gène *Chst8* entre des cellules MOv et MOv exprimant chroniquement la PrP^{Sc} a montré une sous expression au niveau transcriptionnel d'un facteur $5 \pm 0,1$ dans les cellules infectées. Afin de reproduire la sous expression de *Chst8* observée dans les cellules Sc-GT1 et Sc-MOv, nous avons choisi de modifier génétiquement les cellules MOv en insérant de manière stable dans leur génome par l'intermédiaire d'un rétrovirus une séquence codant pour un ARNsh (small hairpin) capable de produire des ARNsi (small interference) spécifiques du transcrite de *Chst8*. Contrairement au Knock-out qui dans le cas de certaines sulfotransférases entraîne la létalité (Bullock *et al.*, 1998, Habuchi *et al.*, 2004, Kalus *et al.*, 2009), cette technique à la particularité de ne pas être efficace à 100 %, et donc de permettre l'obtention de clones possédant des niveaux d'extinction de *Chst8* différents (Shi, 2003, Reynolds *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2008).

Plusieurs clones ont été sélectionnés et caractérisés. Nous avons ainsi pu déterminer le nombre de copies de l'ARNsh intégré dans le génome des cellules, analyser le taux de transcrits relatifs de *Chst8*, la répartition des types de GAGs à la surface des cellules, le patron de sulfatation de ces derniers et déterminer les modifications d'expression du glycomérome résultant de la sous expression de *Chst8*.

Par la suite, afin de déterminer si CHST8 pouvait jouer un rôle dans le processus de transconformation, nous avons réalisé une expérience d'infection avec l'agent de la tremblante des cellules MOv sous exprimant *Chst8*.

MATERIELS ET METHODES

I. Modèles cellulaires et conditions de cultures

I.1. Types cellulaires (MOvS6, HEK 293 T) et conditions de cultures

I.1.a. Les cellules MOv

Les cellules MOvS6 nous ont été gracieusement fournies par Hubert Laude (VIM, INRA, Jouy-en-Josas). Cette lignée cellulaire dérive de ganglions de la racine dorsale de souris *tg338*. Ces souris, invalidées pour le gène *Prnp* murin, possèdent six copies du gène *Prnp* ovin codant le variant V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹ de la protéine prion ovine. Elles sur-expriment d'un facteur huit la protéine prion ovine et sont de ce fait très sensibles à une infection par la souche de prion ovin 127S (Archer et al,2004). Les cellules MOv ont été obtenues par croisement des lignées murines *tg301*^{+/-} exprimant l'allèle ovin V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹ et PrP^{0/0} Zürich I et immortalisées par transformation avec l'antigène T du virus SV40 (Archer et al,2004).

Les cellules MOv sont cultivées à 37 °C, sous 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Le milieu de culture se compose d'Opti-MEM (Gibco) supplémenté de SVF (Biowhittaker) 10 % (v/v), de pénicilline (100 U/mL final) et streptomycine (1.10⁻¹ mg/mL final) et de L-glutamine (2 mM final).

I.1.b. Les cellules HEK 293 T

La seconde lignée cellulaire utilisée pour cette étude est la lignée HEK 293T (Human Embryonic Kidney) modifiée de façon à exprimer l'antigène T du virus SV (Simian Virus) 40. Cet antigène est indispensable aux cellules pour répliquer un ADN viral avec une bonne efficacité (Patel et Tikoo 2006). Les HEK 293 T nous ont été fournies par Eric Julien (Institut de Génétique Moléculaire, UMR 5535 / IFR 122 CNRS Montpellier) et sont cultivées à 37 °C, sous 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Le milieu de culture est composé de DMEM (Eurobio) supplémenté de SVF (Hyclone) 10% (v/v), de pénicilline/streptomycine (5.10⁻² mg/mL final) et de L-glutamine (2 mM final).

II. Création des lignées MOv sous exprimant le gène *Chst8* par infection rétrovirale

II.1. Production du rétrovirus de la famille des lentivirus pour éteindre l'expression de *Chst8*

II.1.a. Choix de la séquence de l'ARNsh

La séquence de l'ARNsh (small hairpin/épingle à cheveux) reconnaissant le transcrit *Chst8* a été définie en utilisant la banque de données disponible sur le site <http://cancan.cshl.edu/cgi-bin/Codex/Codex.cgi>. La séquence retenue, complémentaire des transcrits de *Chst8* est la suivante : 5'-GACTCGGATGGATGCTTA-3'. Insuffisante à elle seule, elle doit être répétée de manière complémentaire de part et d'autre d'une séquence permettant la formation d'une boucle et terminée par une séquence de polyadénylation. Elle possède à chaque extrémité des sites de restriction pour les endonucléases BamH1 et EcoR1, permettant son intégration dans le vecteur RNAi Ready pSIREN-RetroQ (Clontech) (Figure 52).

5'-GATCC/ GACTCGGATGGATGCTTA/AAGTTCTCT/TAAAGCATCCATCCGAGTC/CTTTTTTAG-3'

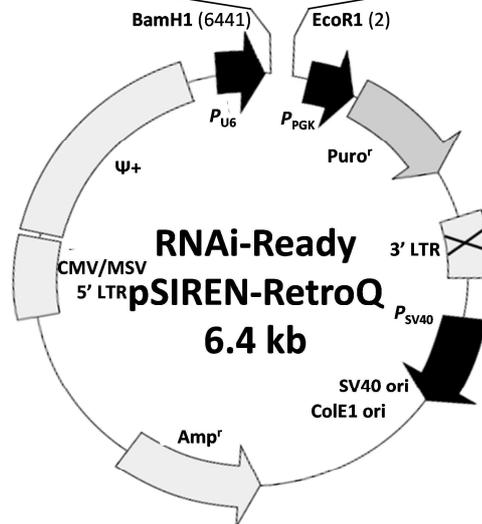


Figure 52 : Vecteur RNAi-Ready pSIREN-RetroQ. Le vecteur RNAi-Ready pSIREN-RetroQ possède un gène de résistance à l'ampicilline, un gène de résistance à la puromycine, des promoteurs P_{U6} et P_{SV40} , un signal d'encapsidation ψ^+ et deux séquences LTR (Long Terminal Repeats). La séquence intégrée dans le vecteur RNAi-Ready pSIREN-RetroQ possède aux extrémités des sites de restriction pour les enzymes BamH1 et EcoR1 (en vert), deux séquences complémentaires spécifiques du transcrit *Chst8* (en gras) et une séquence permettant l'épingle à cheveux (en rouge).

L'intégration de la séquence contenant l'ARNsh s'effectue par le biais d'un rétrovirus. La recombinaison homologue a lieu par l'intermédiaire des séquences 5' et 3' LTR. Lorsque l'intégration est réalisée, la transcription est permise par le promoteur P_{U6} , entraînant la formation d'un ARNsh par appariement des séquences complémentaires. Cet ARN, pris en charge par les complexes protéiques DICER puis RISC entraînant, après hybridation du transcrit avec la séquence ARN provenant de l'ARNsh, la dégradation des transcrits du gène *Chst8* par la machinerie de dégradation des ARN (Dcp1 et 2, XRNA) (Hammond *et al.*, 2001, Nykanen *et al.*, 2001). La sélection des clones recombinants ayant intégré la cassette d'expression s'effectue grâce à la résistance à la puromycine apportée par le vecteur.

II.1.b. Construction du vecteur transformant et production de lentivirus

Pour cloner l'oligonucléotide dans le vecteur pSIREN, celui-ci doit être double brin. Le brin 5' - 3' présenté ci-dessus, mais également son complémentaire ont été synthétisés (Sigma Genosys) avec des extrémités mimant les produits de digestion par BamH1 et EcoR1. Les deux oligonucléotides ont été mélangés en quantité égale (XX ng) et hybridés selon le protocole suivant : 30 s à 95 °C, 2 min à 72 °C, 2 min à 37 °C, 2 min à 25 °C et, au final, le produit d'hybridation maintenu à 4 °C. L'ADN double brin obtenu a été intégré de manière orientée dans le vecteur RNAi Ready pSIREN-RetroQ par ligature (0,5 pmol pour 50 ng de vecteur digéré) grâce aux sites de restriction BamH1 et EcoR1 complémentaires de ceux situés aux extrémités du vecteur.

Le vecteur ainsi construit est amplifié dans la bactérie *E. coli* DH5 α . Le vecteur est intégré dans les bactéries DH5 α par choc thermique de 30 s à 42 °C, puis le mélange est placé 5 min sur glace. Les bactéries sont alors mises en culture sans antibiotique pendant 1 h avant d'êtreensemencées sur une boîte de Pétri contenant de la gélose LB supplémentée en antibiotique (ampicilline 100 μ g/mL). Après 18 h d'incubation, les colonies bactériennes sont criblées par PCR (Sonde Sens : 5' CCCTAAGCGCCTGGATACTT 3' et sonde Antisens : 5' CCCGGACAAAGAGCATCTTG 3') et la construction est vérifiée par séquençage (ABI Prism 3100, Applied Biosystems).

Les lentivirus ont été produits dans la lignée cellulaire HEK 293 T. Pour cela, les cellules ont été cotransfectées avec trois plasmides différents : deux plasmides dénommés p182 et p183 (Fournis par Dr Eric Julien IGBM, UMR 5535 CNRS), contenant les gènes *gag* et *env* codant les protéines de la matrice virale, la capsid, les nucléoprotéines, les protéines membranaires ainsi que les protéines de surface du rétrovirus, et le gène *pol* codant pour l'ARN polymérase et l'intégrase. Le troisième vecteur est le RNAi Ready pSIREN-RetroQ contenant la séquence codant l'ARNsh cible du gène *Chst8*. Une solution contenant 3 μ g du vecteur RNAi Ready pSIREN-RetroQ, 1 μ g de plasmide p182, 1 μ g de plasmide p183 et 3 μ l/ μ g d'ADN d'agent transfectant (Jet-Pei™, Polyplus transfection™) dans 500 μ l de NaCl 150 mM est incubée 20 minutes à 20 °C. Cette solution est ensuite diluée dans un volume final de 5 mL avec du milieu de culture complet et mise en contact pendant 4 h à 37 °C avec les cellules HEK 293 T à 80 % de confluence dans une boîte de culture de 10 cm de diamètre. Le milieu est ensuite remplacé par 10 mL de milieu de culture complet. Pour augmenter l'efficacité de la production virale, une seconde infection est réalisée 24 h plus tard. La récupération des particules virales s'effectue 24 h après la seconde infection par filtration (45 μ m) du milieu de culture, puis le filtrat contenant les virus aliquoté par 2 mL et conservé à -80 °C.

II.2. Transformation de la lignés MOv par infection rétrovirale

Une prise aliquote de particules virales (2 mL) est mélangée à 1 mL de milieu complet additionné de 4 µL de polybrene® (1,5-diméthyl-1,5-diazaundecaméthylène polyméthobromide, hexadiméthrine bromide). Cette molécule est utilisée pour empêcher les phénomènes de répulsion entre les lentivirus et les acides sialiques de la matrice cellulaire (Davis *et al.*, 2004). Ce mélange est mis en contact pendant 12 h avec les cellules MOv à 80 % de confluence dans une boîte de culture de 10 cm de diamètre. Le milieu contenant les particules virales est ensuite remplacé par 10 mL de milieu complet. Après 24 h, de la puromycine est ajoutée à la concentration finale de 10 µg/mL afin de sélectionner les cellules infectées par les lentivirus. Ces cellules forment alors des îlots que l'on transfère dans une plaque 12 puits puis dans une boîte de culture de 10 cm de diamètre. L'absence de dilution limite ne permet pas de certifier que les îlots cellulaires proviennent d'une seule cellule. Les cellules obtenues, notées MOv.*Chst8*, constituent ainsi une population clonale.

II.3. Méthodes d'analyses des clones MOv.*Chst8*

II.3.a. Quantification de la sous expression de *Chst8*

- Extraction des ARN totaux à partir de cellules et synthèse des ADN complémentaires

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules MOv et des clones shMOv cultivés à confluence en flasque de 25 cm² en utilisant le RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne). La quantité d'ARN est mesurée par dosage au NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux en utilisant le kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). La transcription réverse est catalysée par la MultiScribe™ Reverse Transcriptase (10U dans 20 µL) en présence d'hexamères aléatoires, pendant 10 min à 25 °C puis 2h à 37 °C.

- PCR semi quantitative en temps réel

Le niveau de transcription des gènes est mesuré en utilisant la technique des sondes TaqMan (Applied Biosystems) sur l'appareil ABI Prism 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems). La quantification repose sur l'utilisation d'un rapporteur, la 6-carboxyfluorescéine (FAM), et d'un gène de référence, *Tbp* (TATA box binding protein). Pour cette analyse, 60 ng d'ADNc ont été utilisés avec 0,9 µM d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de *Chst8* et 0,25 µM de sonde TaqMan. La sonde spécifique du transcrit *Chst8* a été choisie sur le site du fabricant

(<https://products.appliedbiosystems.com>) dans une liste de sondes déjà testées et validées. Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes : une première étape de 10 min à 95 °C (dénaturation) suivie de 40 cycles de dénaturation/hybridation/élongation à 95 °C pendant 15 sec et 60 °C pendant 1 min.

II.3.b. Détermination du nombre d'insertion

- PCR quantitative en temps réel

La détermination du nombre d'insertion du transgène s'effectue par PCR quantitative utilisant la technologie SYBR Green I (intercalant fluorescent de l'ADN) et des amorces spécifiques de la séquence insérée. Une droite d'étalonnage a été réalisée en utilisant des quantités croissantes de vecteur RNAi Ready pSIREN-RetroQ contenant la séquence de l'ARNsh (de 500 à 16 000 copies en doublant la quantité à chaque fois) et additionné de 5 ng d'ADN génomique de cellule MOv pour assurer le même environnement génomique lors de l'amplification. Pour le témoin ainsi que pour les clones, 5 ng d'ADN génomique sont utilisés et chaque analyse réalisée en triplicata dans une plaque 96 puits (Applied Biosystems). Toutes les réactions de PCR en temps réel ont été accomplies avec l'appareil ABI Prism 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems) dans un volume de 25 µL selon les conditions suivantes : une première étape de 10 min à 95 °C (dénaturation) suivie de 40 cycles de dénaturation/hybridation/élongation à 95 °C pendant 15 sec et 60 °C pendant 1 min. Les amorces utilisées sont les sondes Sens : 5' CCCTTAAGCGCCTGGATACTT 3' et Antisens : 5' CCCGGACAAAGAGCATCTTG 3')

II.3.c. Microscopie confocale

Les cellules sontensemencées à 80 000 cellules/puits en plaque 12 puits contenant des lamelles en verre. Lorsque les cellules sont à 90 % de confluence, elles sont lavées au PBS puis fixées avec 1 mL de PFA 4 % (paraformaldéhyde) pendant 30 min. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois 5 min avec 1 mL de PBS avant saturation avec une solution de BSA à 3 % (p/v) contenant ou pas 0,1 % (v/v) de Triton X-100, en fonction du marquage recherché (surface ou intra-cellulaire). Une incubation avec 100 µL d'anticorps primaire anti-CS4 (chondroïtine-4-sulfate) (Tableau 11) ou isotypique à 4 °C sur la nuit à des concentrations de 1/50^{ème}, 1/100^{ème} et 1/200^{ème} dans une solution de PBS-BSA 1 % est ensuite réalisée. Les cellules sont alors lavées 3 fois 5 min au PBS avant d'être incubées 1 h à l'obscurité avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 dans une solution de PBS-BSA 1 % (p/v) à une dilution de 1/500^{ème}.

En parallèle, les noyaux ont été colorés au Hoechst à une concentration de 0,5 µg/mL pendant 5 minutes après fixation. Les lames sont observées au microscope confocal (Zeiss, LSM 510 META).

Tableau 11 : Anticorps et fluorochromes utilisés pour la microscopie confocale et la cytométrie en flux

| Anticorps et fluorochrome | Reconnaissance | Excitation-Emission | Fournisseur | Quantité | Hôte |
|--|---|---------------------|-------------|----------|--------|
| Anti-Chondroïtin 4 Sulfate, Clone BE-123 | Sulfate en position 4 sur un chondroïtine | / | Millipore | 2 µg | Souris |
| IgG ₁ control | / | / | Millipore | 2 µg | Souris |
| Alexa fluor 488 | IgG (H+L) | 488nm - 530nm | Invitrogen | 2 µg | Chèvre |
| Hoechst | ADN | 405nm - 460nm | / | / | / |

II.3.d. Cytométrie en flux

Les cellules à confluence en boîte de culture de 25 cm² sont décollées avec 2 ml de PBS/EDTA 0,53 mM additionné de 0,5 % de trypsine pendant 5 min à 37 °C. L'addition de 6 ml de milieu complet arrête la réaction de trypsination. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 400 g. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 1ml de PBS, et les cellules comptées. Un million de cellules sont utilisées pour la cytométrie en flux, elles sont pour cela centrifugées 5 min à 400 g. Le marquage avec l'anticorps primaire anti-CS4 (2 µg) s'effectue à 4 °C dans 100 µl de PBS pendant 45 min. A la suite de ce marquage, 500 µl de PBS sont ajoutés et une centrifugation de 5 min à 400 g est effectuée. Les cellules sont ensuite lavées par remise en suspension du culot avec 200 µl de PBS et centrifugées 5 min à 400 g. Le second marquage est effectué dans des conditions identiques au premier. Les cellules sont reprises dans 500 µl de PBS/PFA 1 %.

Les cellules sont analysées avec le BD FACSCalibur flow cytometer. La fenêtre d'analyse est déterminée en fonction de la taille (FSC : Forward scatter) et de la « granularité » des cellules (SSC : Side scatter). Pour chaque échantillon, 10 000 évènements sont comptabilisés dans la fenêtre d'analyse. L'alexa 488 a été excité à l'aide d'un laser argon (raie à 488 nm) et sa fluorescence verte recueillie avec un filtre passe-bande de 530 ± 30 nm.

II.3.e. Western blotting

- Dosage des protéines totales

Les cellules MOv sont lavées par du PBS puis lysée directement dans la flasque de culture en ajoutant 1,5 ml de tampon de lyse (Tris HCL 50 mM pH 7,4, déoxycholate de sodium 0,5 % (p/v), Triton X-100 0,5 % (v/v)) pendant 20 min à 4 °C sous agitation. Le lysat est ensuite centrifugé 2 min à 800 g à 4 °C pour éliminer l'ADN. Le surnageant est récupéré et les protéines dosées par la méthode de Bradford avec la BSA comme standard (Bradford, 1976).

- Marquage Anti-PrP

Pour le marquage de la protéine prion, 25 µg de protéines totales sont déposées sur gel. Les conditions de migration et de transfert sont identiques au marquage anti-CHST8. Pour ce qui est du marquage proprement dit, après le transfert, l'anticorps primaire sha31 dilué au 1/40 000 (Tableau 12) est directement mis en contact avec la membrane pendant 12 h à 4 °C dans une solution de TBS-Tween 20 0,5 % (v/v) (TBS-T). Ensuite, la membrane est lavée 2 fois 10 min avec 30 mL de TBS-T. Le marquage avec l'anticorps secondaire (Tableau 13) dilué au 1/5 000 dans du TBS-Tween 20 0,05 % (v/v) est ensuite effectué avant trois lavages avec 30 mL de TBS-T.

- Révélation

La révélation par autoradiographie est finalement effectuée par l'utilisation du BM Chemiluminescence Blotting kit (Roche) selon les recommandations du fournisseur. L'empreinte lumineuse est détectée avec des films autoradiographiques (KODAK BioMax MR Films Kyoto, Japan).

Tableau 12 : Anticorps primaires utilisés pour les western-blotting.

| Anticorps primaire | Reconnaissance | Fournisseur | Facteur de dilution | Hôte |
|--------------------|----------------|-------------|---------------------|--------|
| GalNAc4ST-1 (M20) | N-terminale | Santa Cruz | 500 | Chèvre |
| GalNAc4ST-1 (C20) | C-Terminale | Santa Cruz | 500 | Chèvre |
| Sha 31 | | Spi Bio | 40 000 | Souris |
| Actine | | Santa Cruz | 5 000 | Lapin |

Tableau 13 : Anticorps secondaires utilisés pour les western-blotting.

| Anticorps secondaire | Fournisseur | Facteur de dilution | Hôte |
|----------------------|-------------|---------------------|-------|
| Anti Souris | Dako | 5 000 | Lapin |
| Anti chèvre | Dako | 5 000 | Lapin |
| Anti Lapin | Dako | 5 000 | Porc |

II.3.f. Analyse des composants glucidiques portés par la MEC

- Dosage des glycosaminoglycannes

La quantification des glycosaminoglycannes sulfatés est effectuée selon la méthode de Barbosa (Barbosa *et al*, 2003) avec quelques modifications. Les cellules MOv cultivées en flasque de 75 cm² (20 millions de cellules) sont lavées avec du PBS et récupérées par grattage afin de conserver la matrice extracellulaire. Après centrifugation pendant 5 min à 1 000 g, le culot cellulaire est lysé dans 300 µL d'un tampon (Trisma base - HCl 50 mM pH 7,9, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM et Triton X100 1 %) 10 min à 4 °C puis centrifugé pendant 30 min à 13 000 g. Les échantillons sont alors digérés à la protéinase K (PK; (200 µg/mL) pendant une nuit à 56 °C. La PK est inactivée en haussant la

température à 90 °C pendant 30 min. Après refroidissement, une digestion de l'ADN pendant une nuit à 37 °C avec 2 unités de DNase (QIAGEN) est effectuée. De plus, pour compléter l'élimination de l'ADN, les échantillons sont centrifugés 10 min à 10 000 g dans des filtres Nanosep MF 0,2 µm (Pall Corporation, France). L'étape suivante consiste en la séparation des protéines résiduelles par addition de NaCl à une concentration finale de 4M. Aux échantillons, après agitation à 4 °C pendant 30 min, est additionné du TCA 10 % (p/v) final, 15 min avant une centrifugation de 10 min à 10 000 g. Le TCA est extrait du surnageant en utilisant du chloroforme. La phase aqueuse est dialysée contre un tampon Tris (Tris 50 mM, acétate de sodium 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8) puis contre de l'eau en utilisant des cassettes de dialyse Slide-A-lyser MINI dialysis Units (PIERCE, USA). Après une étape de lyophilisation, les échantillons sont dissous, en fonction des analyses, dans de l'eau ou dans un tampon de digestion pour les glycanases (100 mM d'acétate de sodium, CaCl₂ 10mM, pH 7).

Les GAGs sulfatés totaux et les chondroïtines sulfatées sont quantifiés en utilisant du 1-9 dimethyl-methylene blue (DMMB). Pour le dosage des GAGs sulfatés totaux, 1 mL de DMMB à 34 mg/L (dans 5 % d'éthanol, 0,2 mM de GuHCL, 2 % de sodium formate (p/v) et 0,15 % d'acide formique (v/v) est ajouté à 100 µL d'échantillon. Le mélange est alors agité 30 min puis centrifugé 30 min à 13 000 g, donnant ainsi un culot bleu formé d'un complexe GAG-DMMB insoluble. Ce culot est dissous par addition d'un mL de solution de décomplexation (50 mM d'acétate de sodium pH 6.8, 10 % de propan-1-ol (v/v), 4 M de GuHCL) et agité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 656 nm.

Pour déterminer la proportion de chondroïtines sulfates dans les échantillons, 100 µL de ceux-ci après traitement PK et DNase sont additionnés de 100 µL de nitrite de sodium 5 % (p/v) et 100 µL d'acide acétique à 33 % (v/v) pendant 1h afin d'éliminer les héparanes sulfates. La réaction est stoppée par l'ajout de 100 µL d'ammonium sulfamate à 12,5 % (p/v). 100 µL de ce mélange sont alors utilisés pour le dosage des chondroïtines sulfates, identique au dosage des GAGs sulfatés totaux. Une courbe de calibration est effectuée avec une gamme de chondroïtines sulfates A (0,25 – 3 µg). La quantité de GAGs sulfatés et de chondroïtines sulfatées est exprimée en µg de GAGs/10⁶ cellules.

- **Chromatographie en phase liquide à haute performance**

Les échantillons repris dans le tampon de digestion des glycanases après la lyophilisation sont traités avec 20 mU de chondroïtinase ABC (AMS Bio) pendant 1 h30 min à 37 °C. Les disaccharides de chondroïtines sulfates sont récupérés par centrifugation sur filtre Nanosp MF 0.2 µm (Pall Corporation, France). Afin de déterminer la composition des disaccharides, les échantillons sont analysés par HPLC suivant le protocole de Toyoda *et al*, 1999 avec quelques modifications.

L'équipement de chromatographie est composé d'un autosampler (Midas, SPARK Holland), d'une pompe Smartline 1000, (Knauer) et d'un fluorimètre (RF20-A, Shimadzu). L'échantillon (50 µL) est chargé sur la colonne échangeuse d'ions (Propac PA-1, 4.6x250 mm Dionex) et élué par un gradient de solvant composé d'un éluant A (NaCl 0,1 M) et d'un éluant B (NaCl 1 M) à un débit de 1 mL/min (Pompe Goebel). Le gradient est réalisé de la manière suivante : 0-5 min (0 % B), 5-25 min (0-3 % B), 25-30 min (3-50 % B), 30-50 min (50-100 % B), 50-65 min (100 % B), 65-70 min (100-0 % B) et de 70-75 min (0 % B).

Les effluents de la colonne sont mélangés en direct avec une solution à 2 % (v/v) de 2-cyanoacétamide et une solution d'hydroxyde de sodium à 250 mM. Ces deux solutions sont injectées à un débit de 0,25 mL/min. Le mélange passe alors dans un capillaire de réaction (10 m de longueur et 0,5 mm de diamètre interne) chauffé à 120 °C, suivi d'un refroidissement dans un autre capillaire (3 m de longueur et 0,25 mm de diamètre interne). La fluorescence de l'effluent est alors détectée à 410 nm après une excitation à 346 nm. Pour l'analyse, les standards de disaccharides non saturés utilisés pour l'identification des pics sont les suivants : Δ UA-GalNAc, Δ UA-GalNAc4S, Δ UA-GalNAc6S, Δ UA-GalNAc4S6S, Δ UA2S-GalNAc4S, Δ UA2S-GalNAc6S, Δ UA2S-GalNAc4S6S, GlcA-GalNAc4S, GlcA-GalNAc6S (Dextra-Labs, UK). L'aire des pics est mesurée et le pourcentage de chaque disaccharide contenu dans l'échantillon est déterminé. Un contrôle de digestion des chondroïtines sulfates est effectué en utilisant des échantillons de chondroïtines sulfates commerciaux en parallèle des échantillons d'intérêts.

III. Analyse du glycotranscriptome des clones sous exprimant Chst8

III.1. Extraction des ARN totaux à partir de cellules et synthèse d'ADN complémentaire

L'extraction des ARN totaux est effectuée selon le même protocole qu'énoncé au paragraphe II.3.a.1).

III.2. Analyse de l'expression des transcrits

L'analyse du niveau de transcription des gènes liés à la glycosylation a été réalisée par TLDA. La technique de TLDA est une PCR semi quantitative en temps réel de 384 gènes en parallèle dans le cas présent, avec comme support une carte microfluidique. Cette carte contient dans chaque puits une sonde TaqMan spécifique d'un gène, les amorces permettant l'amplification et la polymérase. Les différents gènes présents sur la carte microfluidique ont été sélectionnés en utilisant les banques GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), CAZY (<http://www.cazy.org>) et MGI (<http://www.informatics.jax.org>). Il s'agit de gènes codant pour des glycosidases, glycosyltransférases, translocases, sulfotransférases, transporteurs de sucres et lectines (Tableau 14). Elle comporte également les sondes de 6 gènes de « ménage » (*18S*, *G6pdx*, *Gapdh*, *Actb*, *Tbp*, *Thbd*). La normalisation des données a été faite en utilisant les gènes *Tbp* et *G6pdx* (gènes présentant la plus grande stabilité d'expression au sein des différents échantillons).

Pour une plaque, une quantité de 400 ng d'ADNc a été distribuée entre les différents puits par centrifugation 2 min à 260xg. L'amplification PCR a été réalisée selon les conditions suivantes : une première étape de dénaturation de 10 min à 95 °C, suivie de 40 cycles de dénaturation (15 s à 95 °C)- hybridation - élongation (1 min à 60 °C). La mesure de l'évolution de la fluorescence a été réalisée avec l'ABI PRISM 7900HT Sequence Detector System (Applied Biosystems) et quantifiée avec le logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems) selon la méthode comparative des $\Delta\Delta C_t$. Cette méthode utilise un échantillon calibrateur pour permettre la comparaison du niveau d'expression des gènes entre différents échantillons. Les données ont ensuite été analysées et exprimées en quantité relative de transcrit dans le clone par rapport au témoin MOv.

Tableau 14 : Résumé des gènes liés à la glycosylation de *Mus musculus* présents sur la carte microfluidique TLDA.

| Fonction protéique | Nombre de gènes connus | Nombre de gènes sur la carte microfluidique |
|------------------------|------------------------|---|
| Glycosyltransférases | 233 | 146 |
| Glycosidases | 75 | 53 |
| Transporteurs de sucre | 34 | 26 |
| Translocases | 2 | 2 |
| Métabolisme des sucres | 28 | 24 |
| Lectines | 193 | 102 |
| Sulfotransférases | 53 | 22 |
| Total | 594 | 375 |

IV. Infection des cellules et détection de la protéine prion PrP^{Sc}

IV.1. Infection des lignées MOv par l'agent de la tremblante

Les cellules MOv ou les clones shRNA sont inoculés à la densité de 80 000 cellules par puits d'une plaque de culture de 12 puits. Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, le milieu de culture (Opti-MEM (Gibco) supplémenté de SVF (Biowhittaker) 10 % (v/v), de pénicilline/streptomycine ($5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL final) et de L-glutamine (2 mM final)) est remplacé par 1 mL de mélange composé de milieu frais et de 10 μ l d'homogénat de cerveau (20 % dans du glycérol 5 % (v/v)) provenant de souris tg338 ayant développées une tremblante expérimentale. Ce mélange est laissé 4 jours en contact avec les cellules qui sont alors lavées deux fois avec 1 ml PBS puis décollées (PBS/EDTA 0,53 mM + trypsine 0.05 %) et séparées en deux dans deux flasques de 25 cm² jusqu'à confluence. L'une des deux flasques est utilisée pour les analyses de protéique, l'autre est utilisée pour les passages successifs des cellules.

IV.2. Détection de la protéine prion résistante par western blotting

Pour la détection de la PrPres, 150 μ g de protéine sont digérées avec 1,6 μ g de protéinase K dans un volume final de 200 μ l de tampon de lyse (Tris HCL 50 mM pH 7,4, déoxycholate de sodium 0,5 % (p/v), triton X-100 0,5 % (v/v)) pendant 30 min à 37 °C. La réaction est stoppée par addition du cocktail d'anti-protéase Complete (Roche).

Afin de réduire le volume réactionnel de la réaction de digestion pour réaliser l'électrophorèse ultérieure, les protéines sont précipitées. Pour cela, 4 volumes de méthanol à -20 °C sont ajoutés aux protéines puis placés 1 h à -20 °C. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 30 min à 12 000 g à 4 °C. Le surnageant est délicatement enlevé et le culot est repris dans du tampon de charge et du DTT comme expliqué dans le paragraphe II.3.e) pour être dénaturé et déposé sur le gel.

Le protocole de migration, de transfert et d'immunomarquage des protéines sur la membrane de nitrocellulose est identique à celui pour la PrP^C cité au paragraphe II.3.e).

Pour la révélation, se référer au protocole cité au paragraphe II.3.e)

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I :

Analyse de l'impact de la sous expression du gène *Chst8* sur la transconformation de la protéine prion cellulaire

I. Caractérisation de clones MOv sous exprimant le gène *Chst8*

I.1. Création et sélection des clones MOv.*Chst8*

Dans le but d'éteindre l'expression du gène *Chst8*, une séquence codant un ARNsh spécifique de ce gène a été intégrée par recombinaison homologue au niveau des séquences LTR (Long Terminal Repeat) du génome des cellules MOv (Tardat et al, 2007). Deux impératifs nous ont conduits à choisir une insertion stable par infection rétrovirale dont le principe est expliqué dans la Figure 53. Tout d'abord la nécessité d'obtenir des clones stables afin de réaliser les expériences d'infection par l'agent de la tremblante mais également la volonté d'obtenir différents niveaux de sous expression du gène *Chst8*. En effet, contrairement au « knock-out » où l'extinction d'un gène est totale, l'utilisation d'ARNsh permet une diminution du taux de transcrite d'un gène au mieux de l'ordre de 80 à 90 % (Reynolds *et al.*, 2004, Shi, 2003, Kondo *et al.*, 2008).

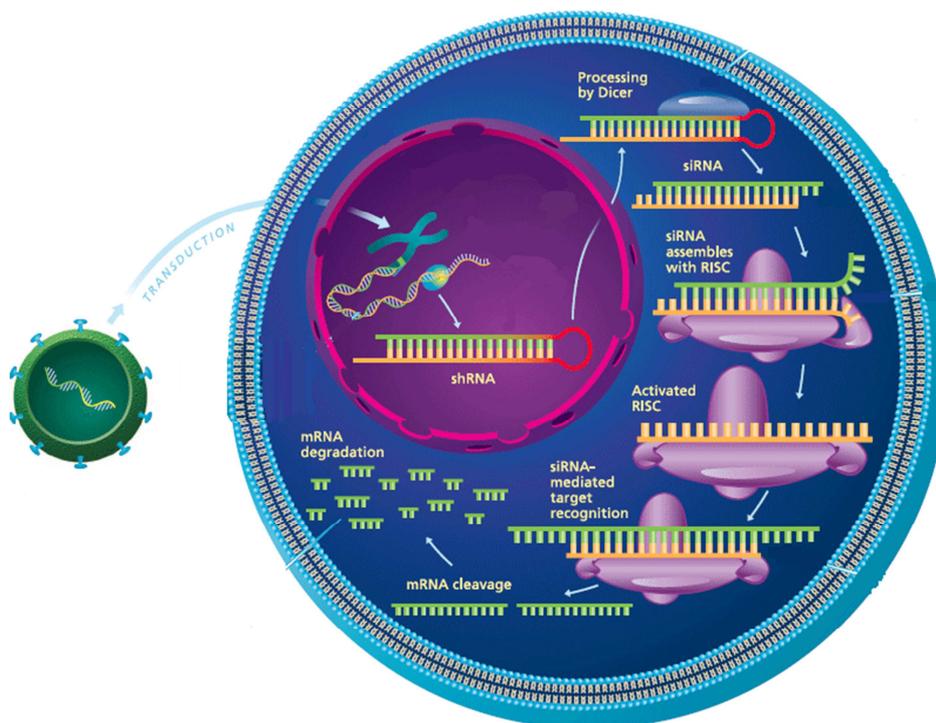


Figure 53 : Mécanisme d'action de l'ARNsh. Les cellules sont infectées par un rétrovirus contenant le vecteur RNAi pSIREN RetroQ avec la séquence codant l'ARNsh spécifique des transcrits *Chst8*. La séquence d'intérêt bornée par deux séquences LTR est intégrée dans le génome de la cellule par recombinaison homologue. L'ARNsh est alors transcrit puis pris en charge par le complexe protéique DICER pour le transformer en ARNsi. Intervient alors un autre complexe RISC, qui sépare les deux brins d'ARN permettant l'hybridation spécifique avec l'ARNm *Chst8*. L'ARNm est ensuite clivé puis dégradé en petit morceau. http://www.ddmag.com/images/0605/jolliff1_lrg.gif.

La séquence codant l'ARNsh (voir Matériels et Méthodes) est insérée dans le vecteur rétroviral sous la dépendance d'un promoteur rétroviral humain de type U6 (Figure 54). Le fragment du plasmide qui s'intègre dans le génome contient, en plus de la séquence codant l'ARNsh, un gène de résistance à la puromycine permettant la sélection des cellules transformées.



Figure 54 : Cassette d'insertion du rétrovirus. Cette cassette comprend des séquences 5' et 3' LTR permettant la recombinaison homologue dans le génome de la souris. La séquence Ψ^+ correspond au signal d'encapsidation du rétrovirus. La séquence codant l'ARNsh spécifique du transcrite *Chst8* est placée sous la dépendance du promoteur rétroviral humain de type U6. Le gène de résistance à la puromycine est situé en aval de l'ARNsh sous la dépendance du promoteur PGK.

Le traitement des cellules infectées par le rétrovirus avec la puromycine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nous a permis de sélectionner 12 îlots de croissance correspondant chacun à une population clonale. Ces cellules sont appelées MOv.*Chst8*. Dans les clones isolés, la quantité de transcrits de *Chst8* a été mesurée par PCR semi-quantitative avec la technologie TaqMan après deux passages (Figure 55). Les 12 clones testés présentent une quantité relative de transcrite inférieure au témoin confirmant l'efficacité de la séquence codant l'ARNsh. Les valeurs des quantités relatives de transcrits varient d'un facteur -16 ± 1.86 pour le clone 12 à -267 ± 28 pour le clone 5.

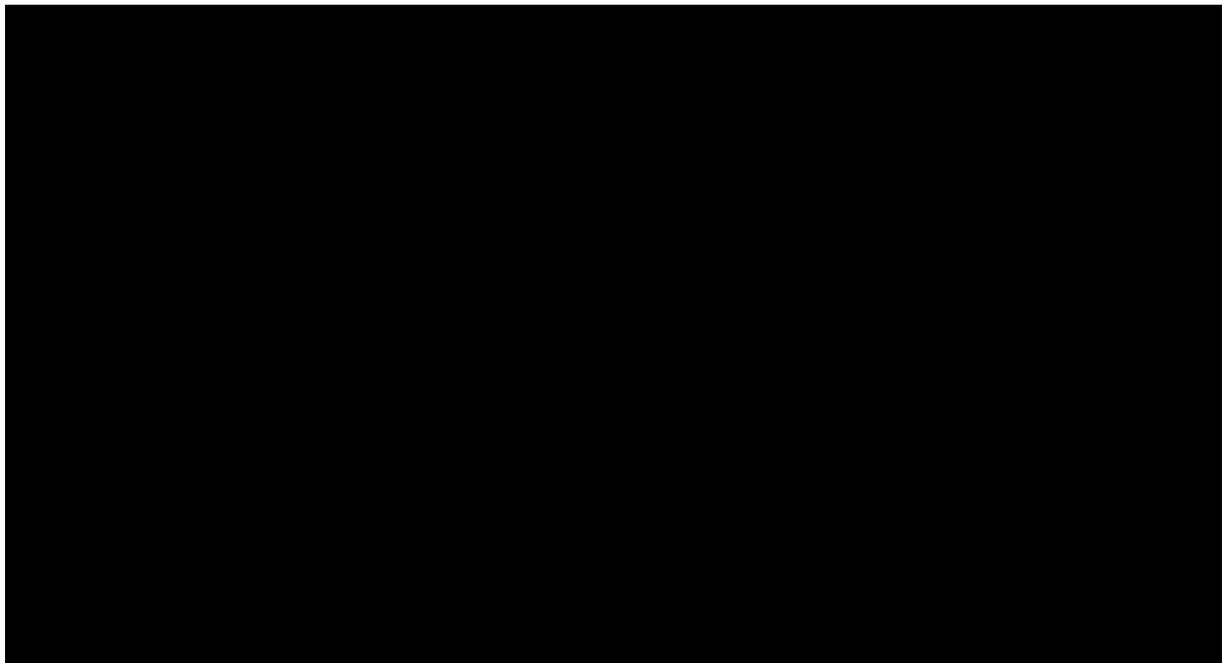


Figure 55 : Niveau relatif de transcrits du gène *Chst8* dans les cellules exprimant l'ARNsh spécifique de *Chst8* par rapport aux cellules MOv non infectées. Les mesures du taux d'expression relatif du gène *Chst8* ont été réalisées sur les différents clones deux repiquages après l'isolement des clones, et les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène de référence *Tbp* (TATA box binding protein) (Milhiet *et al.*, 1998).

Parmi les 12 clones, les clones 1 à 5 ont été sélectionnés (renommés MOv1.*Chst8* à MOv5.*Chst8*) car ils représentaient une bonne répartition quantitative dans l'échelle de diminution de transcrit *Chst8*.

La stabilité du niveau de diminution du taux de transcrits *Chst8* a été testée au cours de 15 repiquages successifs sans pression de sélection. A partir du cinquième repiquage, la quantité relative de transcrit s'est stabilisée à des valeurs différentes de celles obtenues à l'issue des deux premiers passages (Tableau 15). Les écarts-types importants observés pour les clones 2 à 5 sont liés à la très faible quantité de transcrit *Chst8* entraînant lors de la RT-PCR semi quantitative une fluorescence à la limite du seuil de détection de l'appareil. La variation des niveaux de transcrits au cours des premiers passages, est probablement due au temps nécessaire de mise en place du système d'extinction des ARNsh ainsi qu'à la stabilisation des séquences insérées dans le génome des cellules.

Tableau 15 : Expression relative du gène *Chst8* dans les clones MOv.*Chst8* par rapport aux cellules MOv, après cinq repiquages sans pression de sélection. Les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène *Tbp* (Milhiet *et al.*, 1998).

| Clones | Niveau relatif de transcrit <i>Chst8</i> |
|--------------------|--|
| MOv1. <i>Chst8</i> | -2,76 ± 0,35 |
| MOv2. <i>Chst8</i> | -282 ± 91 |
| MOv3. <i>Chst8</i> | -651 ± 99 |
| MOv4. <i>Chst8</i> | -998 ± 664 |
| MOv5. <i>Chst8</i> | -104,62 ± 29,19 |

Les clones ont alors été congelés dans N₂ liquide pour en assurer la conservation. A l'issue de la décongélation des clones, l'efficacité de l'extinction par l'ARNsh a été à nouveau testée et, étonnamment, elle diminuait progressivement lors des repiquages successifs dans un milieu sans puromycine. Il est très possible que des séquences intégrées aient été éliminées suite au traumatisme subi au cours de la congélation et progressivement lors de la culture en l'absence de pression de sélection. Ceci expliquerait cette diminution observée au fil des passages. Afin de la stopper, la pression de sélection a été réinstaurée et maintenue à raison de 3 µg puromycine/mL entraînant la mort de 90 % des cellules. Ce taux de mortalité révèle bien une perte pour la majorité des cellules des séquences intégrées. Après cinq passages en présence de puromycine, le niveau relatif des transcrit *Chst8* a été mesuré pour les cinq clones (Tableau 16).

Tableau 16 : Quantification relative du nombre de transcrit *Chst8* dans les cellules MOv.*Chst8* par rapport aux cellules MOv, cinq repiquages après restauration de la pression de sélection. Les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène *Tbp* (Milhiet *et al.*, 1998).

| Spécificité de l'ARNsh | clone | Niveau relatif du transcrit <i>Chst8</i> |
|------------------------|--------------------------------|--|
| <i>Chst8</i> | MOv1 <i>Chst8</i> ⁻ | 1,01 ± 0,03 |
| | MOv2 <i>Chst8</i> ⁻ | -1,03 ± 0,03 |
| | MOv3 <i>Chst8</i> ⁻ | -1,36 ± 0,11 |
| | MOv4 <i>Chst8</i> ⁻ | -3,84 ± 0,30 |
| | MOv5 <i>Chst8</i> ⁻ | -113,5 ± 38,58 |

Les niveaux des transcrits *Chst8* sont très différents de ceux observés pour ces mêmes clones avant congélation. En effet, on n'observe plus de diminution des transcrits *Chst8* pour les clones MOv.*Chst8*⁻ 1 à 3, et le clone MOv4.*Chst8*⁻ présente seulement une diminution d'un facteur 4 environ. Par contre, pour le clone MOv5.*Chst8*⁻ on n'observe pas de variation significative du niveau de transcrit qui reste aux environs de -100.

Il existe trois transcrits issus du gène *Chst8*, mais un seul code pour une protéine. L'un est un transcrit présentant un codon stop prématuré et donc dégradé rapidement par le système NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay), l'autre est un transcrit également non codant mais qui n'est pas dégradé par le système NMD (Figure 47). Pour ce qui est de ce dernier, ni la sonde TaqMan ni l'ARNsh ne le reconnaissent du fait de sa courte séquence. Pour le second transcrit (NMD), bien que contenant la séquence reconnue par les amorces et la sonde TaqMan et l'ARNsh, sa dégradation précoce ne doit pas engendrer d'interférence dans l'analyse du taux de transcrit du gène *Chst8* ainsi que dans la dégradation par l'intermédiaire de l'ARNsh (Figure 56).

La diminution de l'efficacité de l'extinction peut avoir différentes origines. Tout d'abord la suppression de la pression de sélection a pu permettre aux cellules de se séparer par recombinaison illégitime de tout ou partie des séquences précédemment intégrées. De plus, parmi les cellules ayant conservé des séquences insérées, la remise en place de la pression de sélection a également pu induire la sélection d'une population possédant un nombre inférieur de séquences insérées actives ou transcriptionnellement moins actives au sein des clones. Enfin, la localisation de l'insertion peut avoir un rôle important dans la qualité de la diminution du nombre de transcrit *Chst8*, notamment si celle-ci s'est faite dans une région d'hétérochromatine. Ces régions sont dites transcriptionnellement inactives en raison de la compaction de l'ADN rendant inaccessible les promoteurs à la machinerie de transcription (Grewal et Moazed, 2003).

Au vue de ces résultats, nous avons choisi de ne conserver que les clones 4 et 5 pour la suite des expériences.

La technique de transformation des cellules étant basée sur l'insertion de séquences extra-génomiques dans le génome des cellules MOv, un contrôle a également été réalisé par transformation des cellules MOv avec le vecteur RNeasy pSIREN RetroQ contenant un ARNsh dirigé contre le gène de la luciférase (*luc*), gène absent du génome des cellules eucaryotes de mammifères. Ce contrôle permet d'observer l'effet de la transformation des cellules sur le niveau d'expression du gène d'intérêt.

Dix ilots de croissance ont été sélectionnés lors du traitement à la puromycine des cellules et les clones obtenus testés comme précédemment par rapport à la diminution des transcrits *Chst8*. Pour 9 des 10 clones, il n'a pas été observé de modification significative (± 2) du taux de transcrits *Chst8*. Par contre, pour un des clones, une augmentation du taux de transcrits *Chst8* d'un facteur 11, a été mesurée (Tableau 17).



Figure 56 : Alignement des trois transcrit *Chst8*. La séquence surlignée en bleu correspond à l'ORF. En vert est surlignée la séquence amplifiée par PCR semi quantitative. En rouge est surlignée la séquence reconnue par l'ARNsh. L'alignement a été réalisé avec le logiciel en ligne Dialign

Tableau 17 : Quantification relative du nombre de transcrit *Chst8* dans les cellules étudiées. Les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène *Tbp* (Milhiet *et al.*, 1998).

| Spécificité de l'ARNsh | clone | Niveau relatif du transcrit <i>Chst8</i> |
|------------------------|--------------------------------|--|
| <i>Luc</i> | MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | +11,02 ± 0,54 |
| | MOv.Luci | +1,77 ± 0,03 |

Cette augmentation est surprenante car la méthodologie utilisée a pour but de provoquer la dégradation des transcrits du gène *Luc* (Figure 53). L'augmentation d'un facteur 11 du niveau des transcrits mesurée dans ce clone peut avoir deux origines:

- Une insertion proche ou dans la région régulatrice du gène *Chst8* dont l'expression serait alors sous la dépendance des promoteurs viraux.

- Une modification de l'expression du ou des facteurs de transcription spécifiques du promoteur de *Chst8* aboutissant à une augmentation de la transcription du gène. Seulement la région régulatrice de *Chst8* n'ayant pas été décrite, il est donc difficile de déterminer quels seraient les facteurs de transcription intervenant dans la régulation de ce gène et d'en analyser l'expression.

Le but de cette étude étant d'analyser l'impact de la modification de l'expression du gène *Chst8* sur la capacité de transconformation de la PrP, nous avons vérifié que l'expression du gène *Prnp* ne se trouvait pas affectée par l'infection rétrovirale. L'expression du gène codant la protéine prion ne montre pas de variation marquée (Tableau 18).

Tableau 18 : Quantification relative du nombre de transcrit *Prnp* dans les cellules étudiées. Les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène *Tbp* (Milhiet *et al.*, 1998).

| Spécificité de l'ARNsh | clone | Niveau relatif du transcrit <i>Prnp</i> |
|------------------------|--------------------------------|---|
| <i>Chst8</i> | MOv4 <i>Chst8</i> ⁻ | -1.89 ± 0.09 |
| | MOv5 <i>Chst8</i> ⁻ | -2.4 ± 0.26 |
| <i>Luc</i> | MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | -1.61 ± 0.05 |
| | MOv.Luci | 1.04 ± 0.01 |

I.2. Détermination du nombre d'insertions de la séquence codant l'ARNsh dans les différents clones

La technique utilisée pour transformer les cellules MOv de manière stable entraîne une insertion aléatoire de la séquence comprenant l'ARNsh (Figure 53), que ce soit en nombre ou en localisation dans le génome des cellules MOv. Afin de déterminer le nombre d'insertions dans chacun des clones, nous avons réalisé une PCR quantitative. Les amorces utilisées ont été testées en réalisant une gamme étalon avec un nombre défini de vecteurs rétroviraux (Figure 57).

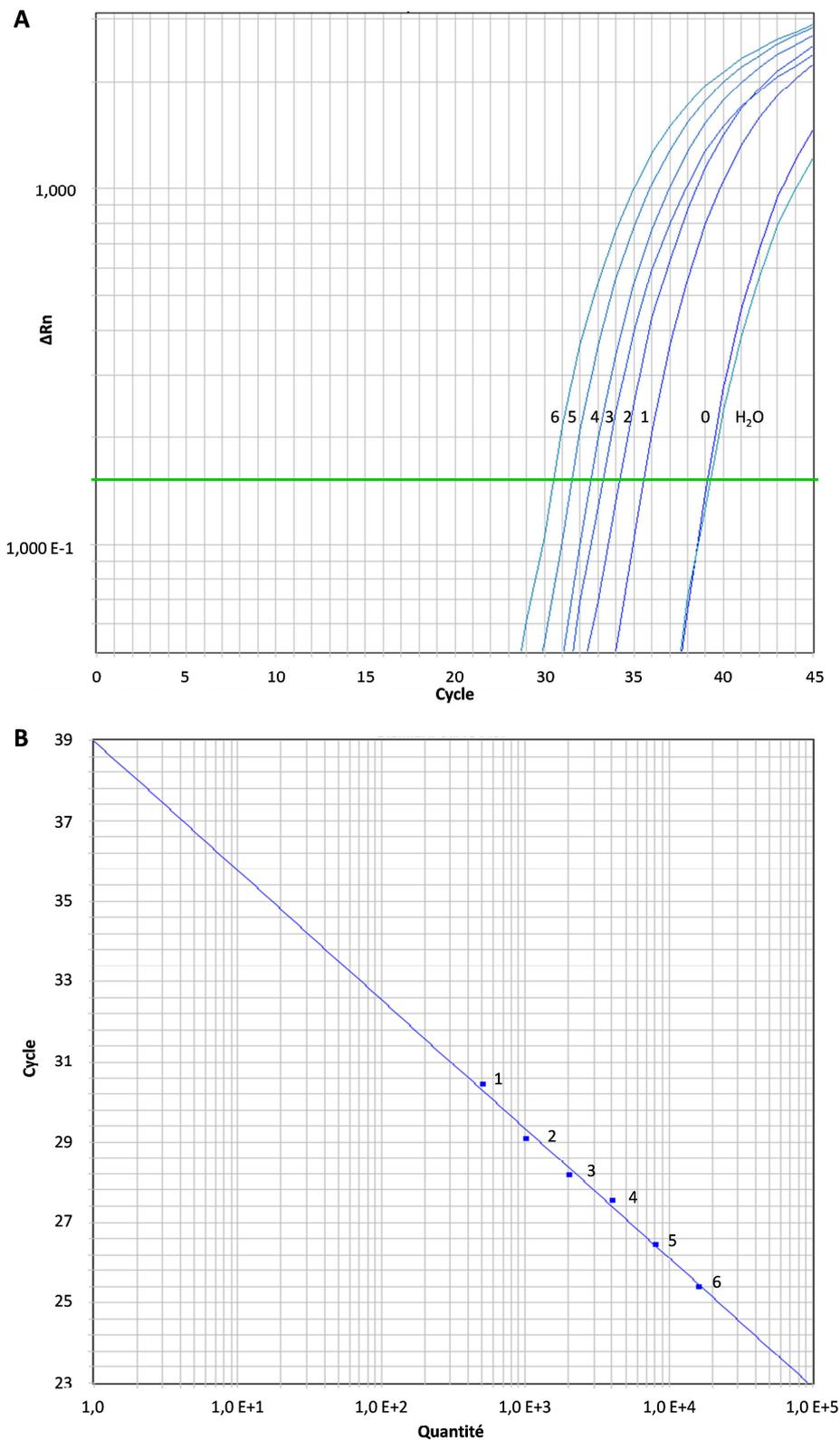


Figure 57 : Gamme étalon pour la détermination du nombre de séquence contenant l'ARNsh intégrées dans le génome des cellules MOv. La gamme étalon a été réalisée par PCR quantitative avec du SybrGREEN comme fluorochrome. Elle comprend une quantité de vecteur allant de 500 copies pour (1) à 16 000 copies pour (6). Le nombre de cycle d'amplification nécessaires à l'apparition significative de la fluorescence (ΔRn) est déterminé par les courbes du graphique (A). Le graphique (B) correspond à la droite étalon permettant de rapporter un nombre de cycle à une quantité de séquences. Un contrôle ne contenant que de l'eau (0) a été réalisé pour déterminer le « bruit de fond ».

Pour chaque clone, un triplicata d'échantillons ainsi qu'un triplicata d'expériences ont été réalisés permettant d'obtenir une moyenne sur 9 points de PCR (Figure 58). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 19. On peut remarquer que le nombre d'insertions du transgène entre les clones est au moins de 4, et ne varie que d'un facteur inférieur à deux. Par contre, de manière paradoxale, le nombre d'insertions est inversement proportionnel au niveau relatif de transcrits *Chst8*. Ceci pourrait être dû à l'insertion de séquences dans des régions hétérochromatiques pour le clone 4, ce qui expliquerait qu'il n'y a pas de relation entre le nombre d'insertion et l'efficacité des ARNsh.

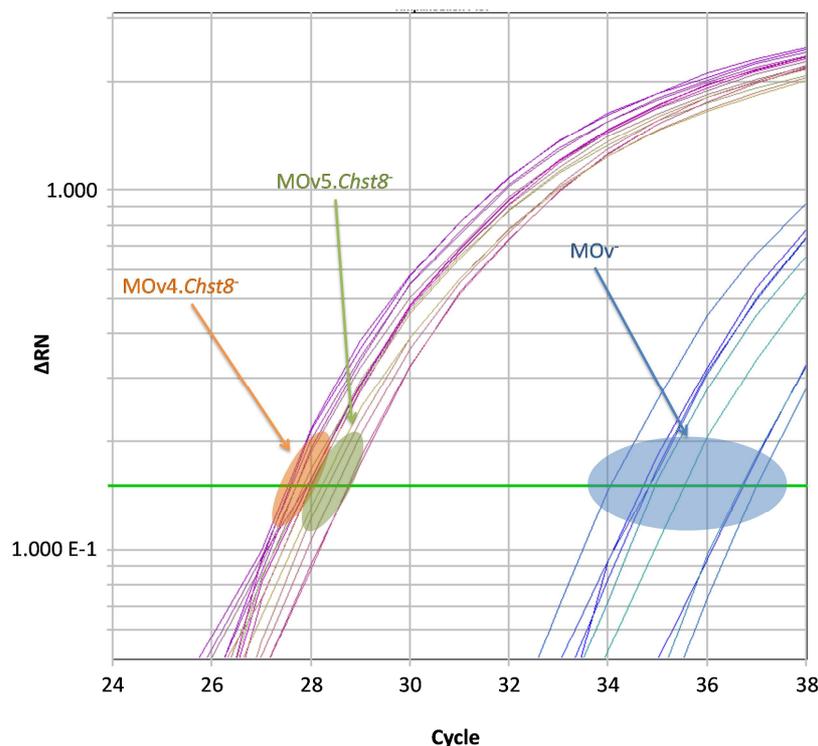


Figure 58 : Détermination du nombre d'insertion de séquence codant l'ARNsh. Le graphique représente les courbes de fluorescence des échantillons MOv4.Chst8 et MOv5.Chst8 et MOv. Le nombre de cycles nécessaires pour la détection de la fluorescence correspond à la zone d'intersection avec la valeur seuil établie symbolisée par la ligne verte. Les valeurs de cycle pour les cellules MOv se situent dans la zone de non significativité. Il s'agit du « bruit de fond » de l'amplification.

Tableau 19 : Nombre de copies intégrées dans le génome des clones MOv.Chst8 de la séquence codant l'ARNsh spécifique des transcrits Chst8. Le nombre d'insertion a été déterminé par PCR quantitative en utilisant le SybrGreen comme fluorochrome. La droite étalon a été réalisée en utilisant une gamme croissante de vecteur pSIREN RetroQ contenant la séquence d'ARNsh.

| Spécificité de l'ARNsh | Nom du clone | Nombre d'insertion de transgène |
|------------------------|-------------------|---------------------------------|
| <i>Chst8</i> | MOv4 <i>Chst8</i> | 6-7 |
| | MOv5 <i>Chst8</i> | 4-5 |

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

L'activité de sulfatation d'une forme tronquée de la protéine CHST8 ayant été montrée vis-à-vis des chondroïtines (Xia *et al.*, 2000), et aux vues des interactions précédemment décrites entre les GAGs et la protéine prion, nous avons vérifié l'impact de la sous expression de *Chst8* sur le profil électrophorétique de la protéine prion (Figure 59).

L'analyse par western blotting montre que le signal PrP est inférieur dans le contrôle MOv.luci par rapport au contrôle MOv. Actuellement, nous n'avons pas d'explication pour ce résultat. Si l'on observe maintenant les clones 4 et 5 qui possèdent un taux relatif de transcrit *Chst8* inférieur aux témoins MOv et MOv.luci, ils présentent également une diminution du signal PrP du même ordre que le contrôle MOv.luci.

Concernant les cellules MOv.*Chst8*⁺, le signal est au contraire plus fort (1,45), là encore en l'absence d'augmentation de l'expression de *Prnp*.

La relation entre le taux de transcrit *Chst8* et la quantité de PrP reste floue mais deux hypothèses peuvent être suggérées :

- Dans le cas de la première hypothèse, la variation de l'expression de *Chst8* et/ou de gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs pourrait modifier la quantité et la nature des GAGs de la matrice extracellulaire. La PrP et les GAGs étant en relation étroite, ces conditions pourraient entraîner une modification même faible de la conformation de la protéine prion. Certains types de structures partiellement résistants à la dénaturation pourraient apparaître entraînant une plus ou moins grande accessibilité à l'anticorps. C'est le cas des structures de type coiled-coil, résultant de l'interaction entre hélices α que l'on retrouve notamment au niveau des protéines virales, qui présentent une résistance partielle à la dénaturation. Des structures de ce type ont été mises en évidence dans des prions riche en Glutamine/Asparagine (Fiumara *et al.*, 2011).

- La seconde hypothèse, quant à elle, consisterait en une modification du « turn-over » de la protéine prion entraînant une augmentation de sa dégradation lorsque la quantité, la nature et/ou la sulfatation des glycosaminoglycannes se trouve modifiées. Ces variations de signal peuvent être la conséquence d'une modification de l'environnement de la protéine prion notamment la quantité et la nature des glycosaminoglycannes interagissant avec elle. Les GAGs ont été décrits comme impliqués dans l'internalisation et donc le « turn-over » de la PrP (Shyng *et al.*, 1995). L'utilisation de glycannes sulfatés sur des cellules N2A en cultures a pour effet d'augmenter

l'internalisation de la PrP aboutissant à une augmentation de la proportion de PrP dans les endosomes précoces, tardifs et le lysosome.

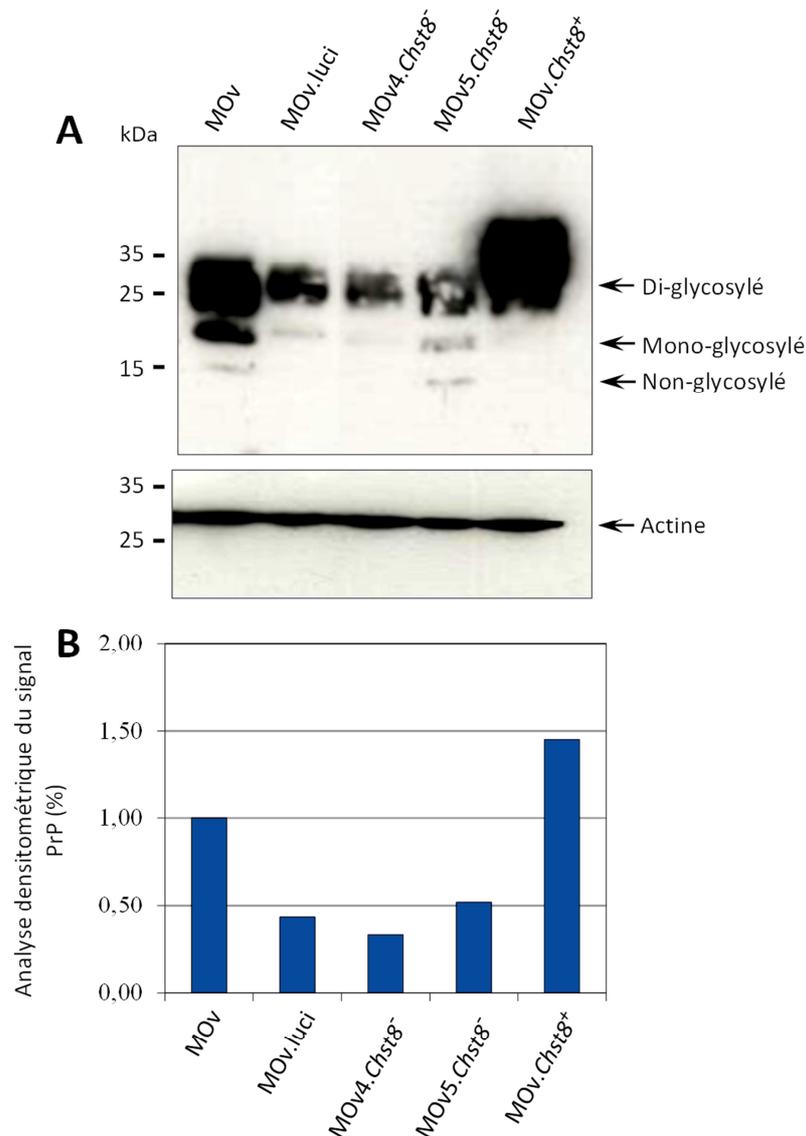


Figure 59 : Profil électrophorétique de la PrP^C dans les différents clones cellulaires. (A) Immunodétection de la protéine prion cellulaire sur un lysat de 25µg de protéines totales. La protéine est détectée en utilisant l'anticorps anti prion sha31 (SPI-bio). La position des formes diglycosylées, monoglycosylées et non-glycosylées est indiquée sur la droite. Le poids moléculaire est indiqué sur la gauche. L'immunodétection de l'actine est réalisé grâce à l'anticorps anti-actine (Santa-Cruz Biotechnologies.inc). **(B)** Analyse densitométrique du signal PrP exprimée en fonction du témoin MOv. Le signal PrP correspond à la somme des signaux de chaque glycoforme rapporté au signal obtenu pour les cellules MOv, le tout normalisé par le signal de l'actine.

La glycosylation de la protéine prion est importante pour la localisation (Salamat *et al.*, 2011), la conformation et la transconformation de celle-ci, nous avons donc également regardé la répartition des glycoformes dans chacun des clones (Tableau 20). Dans les cellules MOv, la protéine prion est retrouvée majoritairement sous forme diglycosylée (73 %), et très minoritairement sous

forme non glycosylée (1,3 %). La diminution de signal dans le témoin MOv.luci entraîne la perte de la détection de la forme non glycosylée, on peut néanmoins remarquer que la forme monoglycosylée diminue en proportion par rapport aux cellules MOv.

MOv4.*Chst8*⁻ et MOv5.*Chst8*⁻, qui ont un signal plus de deux fois inférieur aux cellules MOv ont également une variation dans la répartition des glycoformes. En effet la proportion de protéines monoglycosylées diminue au profit de la forme diglycosylée (Tableau 20).

Enfin les cellules MOv.*CHst8*⁺ qui sur-expriment le gène *Chst8*, malgré un signal PrP plus important, ne présentent plus de protéine prion non glycosylée. La forme diglycosylée représente à elle seule environ 96 % de la PrP détectée.

Tableau 20 : Répartition des glycoformes de la protéine prion dans les différentes cellules MOv et MOv transformées.

| Glycoformes | Clone | | | | |
|----------------|-------|----------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | MOv | MOv.luci | MOv4. <i>Chst8</i> ⁻ | MOv5. <i>Chst8</i> ⁻ | MOv. <i>Chst8</i> ⁺ |
| Nonglycosylée | 1,3 | 0,0 | 0,1 | 2,6 | 0,2 |
| Monoglycosylée | 25,8 | 6,0 | 4,4 | 10,5 | 3,9 |
| Diglycosylée | 72,9 | 94,0 | 95,5 | 86,9 | 95,9 |

L'insertion de la séquence rétrovirale semble affecter la conformation de la protéine prion cellulaire (Figure 59). On peut suggérer que le contexte dans lequel est normalement produite la protéine prion a été modifié, ce qui pourrait alors induire une conformation légèrement différente et par conséquent :

- Modifier l'accessibilité des sites de *N*-glycosylation aux différentes enzymes de glycosylation.
- Diminuer la reconnaissance par l'anticorps utilisé suite à une dénaturation incomplète des protéines.

L'augmentation du nombre de transcrits *Chst8* est associée à une quantité supérieure de signal PrP avec une forte prédominance de la forme diglycosylée. Des résultats similaires ont déjà été décrits au cours de la différenciation neuronale de cellules bipolaires 1C11 (Ermonval *et al.*, 2009). Lorsque ces cellules s'engagent dans la voie noradrénergique, il y a prédominance de la forme diglycosylée. Ceci s'accompagne de modifications de l'expression de certains gènes du glycomé, notamment *Chst8*, retrouvé surexprimé d'un facteur 300. De plus, la modification de profil électrophorétique est plus importante au niveau des protéines prions localisées dans les « rafts » donc en contact direct avec la MEC. Ces résultats associés aux nôtres semblent bien montrer une implication des GAGs sulfatés dans le métabolisme de la protéine prion.

I.4. Impact de la sous expression de *Chst8* sur l'expression des autres gènes du « glycomé »

La redondance dans l'action des gènes intervenant dans les processus de modification post-traductionnelle telle que la glycosylation est importante, particulièrement au niveau de la synthèse ou de la sulfatation des GAGs (Silbert et Sugumaran, 2002, Kusche-Gullberg et Kjellen, 2003, Ledin *et al.*, 2004). Nous avons donc décidé d'analyser l'expression du glycomé lorsque *Chst8* est sous-exprimé. Pour cela nous avons utilisé la technique de PCR semi quantitative avec la technologie TLDA (TaqMan Low Density Array). Avec une même carte, il est possible d'analyser en parallèle l'expression de 375 gènes associés à la glycosylation, gènes impliqués dans les mécanismes de la glycosylation, et de 9 gènes de référence (Voir Matériels et Méthodes). Lors de l'analyse comparative nous avons utilisé comme témoins les cellules MOv et les MOv.luci. Après élimination des gènes non exprimés dans nos modèles cellulaires de référence et ceux dont l'expression variait d'un facteur supérieur ou égal 2 entre les deux témoins, nous avons pu identifier 56 gènes dont l'expression est modifiée au moins d'un facteur supérieur à 2 (Tableau 21). Ces gènes codent pour des protéines qui interviennent dans différents processus cellulaires (7 gènes du métabolisme des carbohydrates, 26 gènes impliqués dans synthèse ou la dégradation des glycolipides et glycoprotéines, 10 gènes impliqués dans synthèse et dégradation des glycosaminoglycannes, 12 gènes impliqués dans adhésion cellulaire) (Tableau 21).

Les clones sous exprimant le transcrite *Chst8* (clones 4 et 5) présentent peu de différence dans le nombre et la nature des gènes modifiés dans leurs expressions (Tableau 21). Les glycosyltransférases (clone 4 : 6/20, clone 5 : 10/25) et les lectines (clone 4 : 6/20, clone 5 : 8/25) sont les gènes qui sont le plus affectés. Néanmoins, d'autres gènes impliqués notamment dans la sulfatation des glycosaminoglycannes, sont modifiés dans leur expression. C'est le cas de *Hs3st3a1* et *Ndst3* qui présentent une interaction vis-à-vis d'un résidu commun. En effet, *Ndst3* code pour une enzyme (**N**-déacétylase/*N*-sulfotransférase) responsable de la déacétylation des résidus GlcNAc des héparanes sulfates et de leur sulfatation (Ledin *et al.*, 2004). Parfois cette sulfatation ne s'effectue pas et laisse le résidu à l'état de GlcN (Toida *et al.*, 1997), favorisant alors l'activité sulfotransférase de l'enzyme HS3ST3A3 vis-à-vis des résidus GlcN (Liu, J. *et al.*, 1999). Dans notre cas, nous observons une augmentation de l'expression de *Ndst3* pouvant entraîner une augmentation de la quantité de la protéine et donc aussi de son activité. Il n'est donc pas impossible d'envisager que cette augmentation d'activité augmente la quantité de résidus GlcN disponibles. Ces derniers sont des substrats de l'enzyme codée par le gène *Hs3st3a1*, également surexprimée dans les cellules

MOv.*Chst8*⁻. Ne travaillant que sur le taux de transcrits, ceci n'en demeure pas moins une hypothèse envisageable.

Les cellules MOv.*Chst8*⁺ sont caractérisées par la modification d'expression de 11 gènes qui leurs sont propres (Glycosyltransférases : *B4galnt1*, *B3gnt9*, *Chpf2*, *Ugcg*, *St3gal3*. Lectine : *Mcam*. Transporteur de sucre : *Slc2a6*. Sulfotransférases : *Chst11*, *Chst1* et *Chst8*). La relation entre eux ou avec la surexpression de *Chst8* n'est pas évidente. Une recherche de liaisons « Known and Predicted Protein-Protein Interactions » a été effectuée ne donnant aucun lien entre les produits de ces quatre gènes (Figure 60).

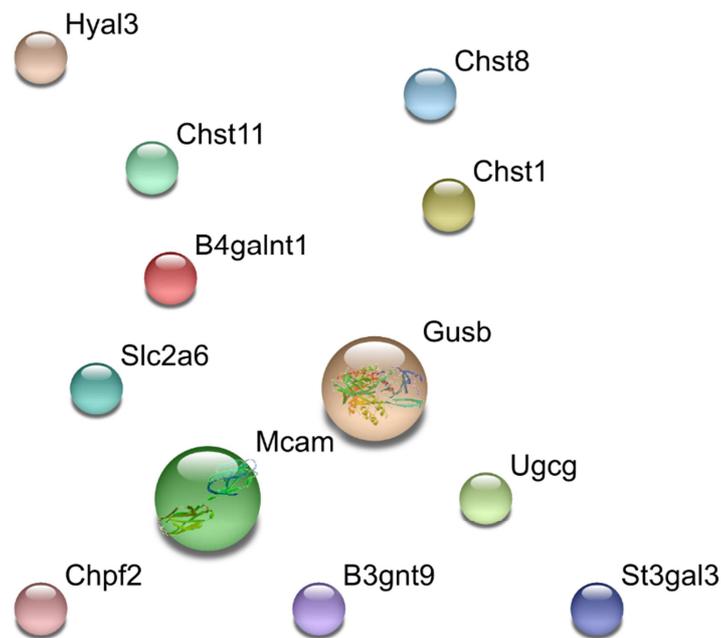


Figure 60 : Schéma d'interactions potentielles et prédites des protéines codées par les gènes variants uniquement dans les cellules MOv.*Chst8*⁺. La recherche de liaisons « Known and Predicted Protein-Protein Interactions » a été réalisé avec le logiciel en ligne STRING 9.0 <http://string-db.org/>.

L'analyse de l'expression des gènes dans les cellules surexprimant *Chst8* révèle que le nombre de gènes variant est plus faible (14 gènes : 9 codants des glycosyltransférase, 1 codant une glycosidase, 2 codant des transporteurs de sucres, 1 codant une lectine, et 2 codant des sulfotransférases) et qu'en majorité ils sont différents de ceux variants pour les clones MOv.*Chst8*⁻. Nous pouvons également noter que lorsqu'il y a des gènes en commun entre ces cellules d'un côté et les cellules MOv4.*Chst8*⁻ et MOv5.*Chst8*⁻ de l'autre, ils ne varient pas forcément dans le même sens. Par exemple, *Ext13* qui code pour un glycosyltransférase essentielle pour l'orientation de la synthèse des héparanes sulfates, qui est sous exprimé dans le clone 5 est surexprimé dans les cellules MOv.*Chst8*⁺ alors que *St8sia2* est sous-exprimé dans les trois.

Tableau 21 : Gènes présentant une modification d'expression supérieure à un facteur deux dans les clones MOv sous et sur-exprimant le transcrit *Chst8*.

| Fonctions protéiques | Nombre de gènes connus | Nombre de gènes étudiés | MOv4. <i>Chst8</i> ⁻ | | MOv5. <i>Chst8</i> | | MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | |
|------------------------|------------------------|-------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|--|---|
| | | | Gènes sous exprimés d'un facteur > 2 | Gènes surexprimés d'un facteur > 2 | Gènes sous exprimés d'un facteur > 2 | Gènes surexprimés d'un facteur > 2 | Gènes sous exprimés d'un facteur > 2 | Gènes surexprimés d'un facteur > 2 |
| Glycosyltransférase | 233 | 146 (63 %) | <i>Galnt2</i> <i>St3gal1</i> <i>Fut4</i> <i>Galntl3</i> <i>St6gal1</i> | <i>St8sia2</i> | <i>St3gal1</i> <i>Galntl3</i> <i>Glta8d1</i> <i>Pigo</i> <i>St6gal1</i> <i>Parp3</i> <i>Chgn</i> <i>Extl3</i> | <i>Mgat3</i> <i>St8sia2</i> | <i>Galnt2</i> <i>Chpf2</i> <i>Chgn</i> | <i>B4galnt1</i> <i>B3gnt9</i> <i>St3gal3</i> <i>St8sia2</i> <i>Ugcg</i> <i>Extl3</i> |
| Glycosidase | 75 | 53 (71 %) | <i>Gla</i> <i>Gba</i> <i>Chi3l1</i> <i>Man1a</i> | | <i>Mgea5</i> <i>Renbp</i> | | | <i>Man1a</i> |
| Transporteur de sucre | 34 | 26 (76 %) | <i>Slc2a3</i> | | <i>Slc2a1</i> <i>Slc2a3</i> | | <i>Slc2a1</i> | <i>Slc2a6</i> |
| Translocase | 2 | 2 (100 %) | | | | | | |
| Métabolisme des sucres | 28 | 24 (86 %) | | | | | | |
| Lectine | 193 | 102 (53 %) | <i>Itga2</i> <i>Itgb2</i> <i>Itgb3</i> <i>Itgb1</i> <i>Siglecf</i> | <i>Siglece</i> | <i>Cd248</i> <i>Clec3b</i> <i>Itgb2</i> <i>Itgb7</i> <i>Itgb1</i> <i>Siglecf</i> <i>Klra6</i> <i>Clgn</i> | | <i>Mcam</i> | |
| Sulfotransférase | 55 | 22 (40 %) | <i>Chst8</i> | <i>Hs3st3a1</i> <i>Ndst3</i> | <i>Chst8</i> <i>Ndst3</i> | <i>Hs3st3a1</i> | | <i>Chst8</i> <i>Chst1</i> <i>Chst11</i> |

Nous pouvons remarquer que dans les cellules MOv.*Chst8*⁻, La modification d'expression des gènes qui est majoritairement orientée vers la sous expression contrairement aux cellules MOv.*Chst8*⁺.

Nous pouvons également noter qu'un seul gène est commun à l'ensemble des cellules transformées. Il s'agit du gène *St8sia2* qui code pour une sialyltransférase agissant au niveau de *N*-glycoprotéines et également dans la synthèse d'acide polysialique responsable de la modulation des propriétés adhésives de NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule) (Angata *et al.*, 2000) (Figure 61). La protéine NCAM1 interagit également avec la PrP au niveau des « rafts » de la membrane cellulaire afin de stimuler la neuritogénèse par l'intermédiaire de la kinase p59fyn (Beggs *et al.*, 1994, Santuccion *et al.*, 2005).

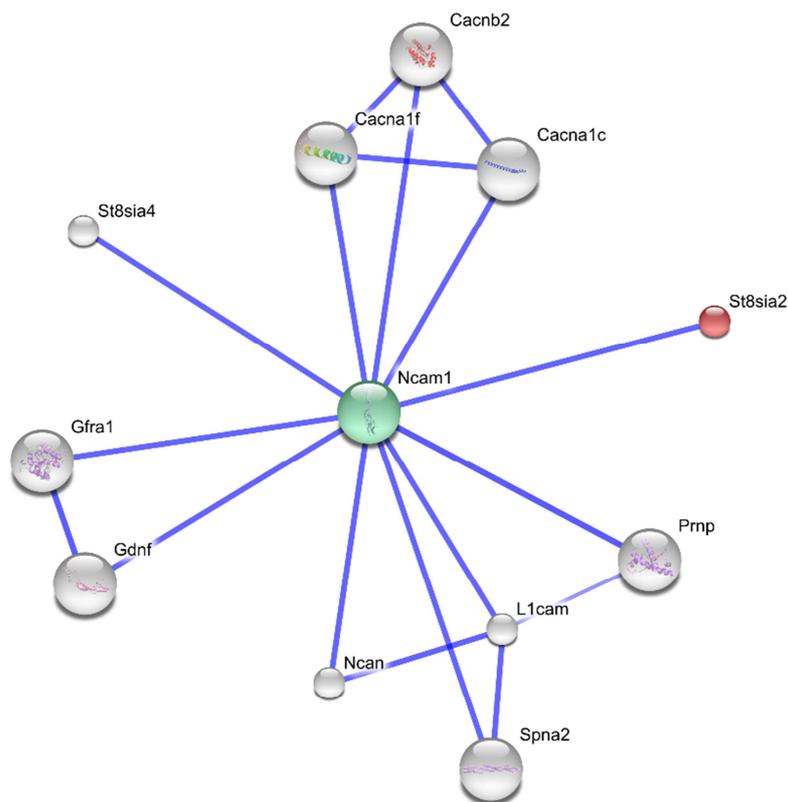


Figure 61 : Schéma d'interactions potentielles et prédites de ST8SIA2. La recherche de liaisons « Known and Predicted Protein-Protein Interactions » a été réalisée avec le logiciel en ligne STRING 9.0 <http://string-db.org/>.

L'insertion stable de l'ARNsh spécifique du transcrit *Chst8* a eu pour conséquence une dérégulation importante de plusieurs gènes impliqués dans des processus de glycosylation (Tableau 21). Il s'agit d'une étude préliminaire nécessitant l'analyse de l'expression de gènes préalablement

écartés de l'analyse ou nouvellement mis en lumière. C'est le cas de *Hyal4* qui a été montré comme codant une enzyme possédant une activité de dégradation de chondroïtine sulfate (Kaneiwa *et al.*, 2010). D'autre part, 17 gènes codant des glycosyltransférases et glycosidases présentent une modification d'expression, cela pourrait conduire à un bouleversement de la représentation glucidique à la surface des cellules via la modification des chaînes glycaniques portées par les protéines (glycoprotéines et protéoglycannes). Les variations observées au niveau de la répartition des glycoformes de la protéine prion pourraient également s'expliquer en partie par ces modifications d'expression. Plusieurs gènes impliqués dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Intégrines, lectines), sont également altérés dans leur expression, seulement nous ne savons pas encore par quelle voie la modification de la structure des GAGs influe sur l'expression de ces gènes. Pour ce qui est des gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs, si l'on fait une synthèse des différentes variations (Tableau 22), nous voyons nettement une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la sulfatation des héparanes sulfates dans les cellules MOv.*Chst8*⁻, alors que pour les cellules MOv.*Chst8*⁺ c'est une légère augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la sulfatation des chondroïtines sulfates.

Tableau 22 : Orientation des modifications d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des GAGs. Les signes – et + correspondent à une variation d'expression d'un facteur supérieur à 2 et inférieur à 4. Lorsque la variation d'expression est supérieur à 4, sont ajoutés les signes - - ou ++.

| Clones cellulaires | Synthèse | | Dégradation | | Sulfatation | |
|---------------------------------|----------|----|-------------|----|-------------|-----|
| | CS | HS | CS | HS | CS | HS |
| MOv4. <i>Chst8</i> ⁻ | | | | | - | +++ |
| MOv5. <i>Chst8</i> ⁻ | -- | | | | -- | +/- |
| MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | -- | + | | | ++ | |

1.5. Impact de la modification de l'expression de *Chst8* sur la nature et la sulfatation des glycosaminoglycannes

Le gène *Chst8* code une sulfotransférase active au niveau des résidus GalNAc terminaux de certaines glycoprotéines. Un clivage post-traductionnel permet l'obtention d'une forme tronquée ayant une activité de sulfatation des chondroïtines (Xia *et al.*, 2000). Nous avons analysé la sulfatation des chondroïtines mais aussi la nature même des GAGs dans l'ensemble des clones et témoins. Pour cela nous avons eu recours à plusieurs approches comme le dosage biochimique des GAGs, leur analyse par HPLC, leur localisation par microscopie confocale et une quantification relative par cytométrie en flux des différents clones cellulaires.

I.5.a. Analyse de la nature des GAGs et de leur sulfatation

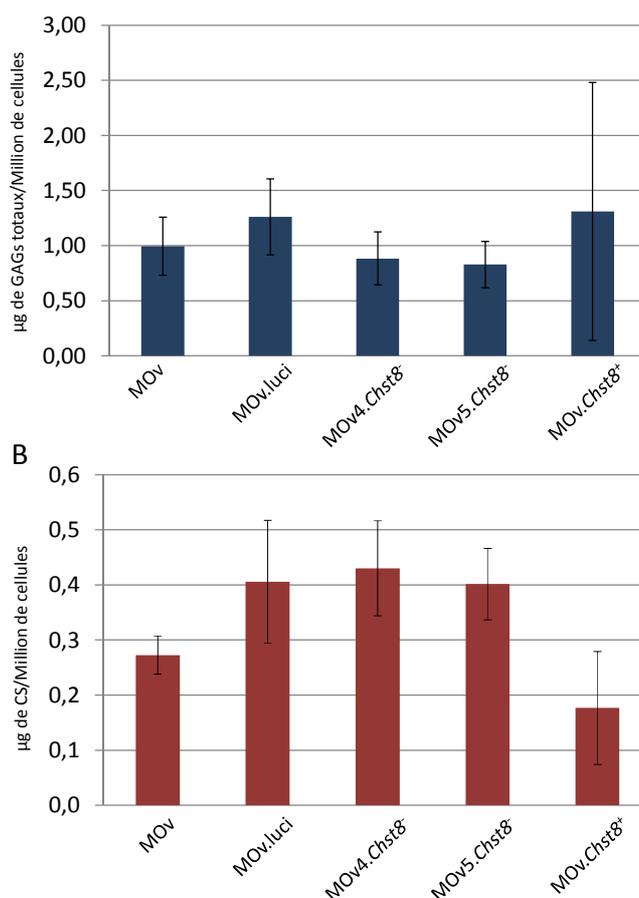
Les cellules de type Schwann expriment au moins deux types de glycosaminoglycannes qui sont le glypican 1, principalement composé de héparanes sulfates et le syndecan-3, composé de chondroïtines sulfates et d'héparanes sulfates (Chernousov *et al.*, 2006). Afin d'analyser les modifications de la nature et de la sulfatation des GAGs dans les cellules MOv transformées, nous avons dosé la quantité totale de glycosaminoglycannes sulfates (Figure 62A), leur répartition entre les différents types de glycosaminoglycannes ainsi que la sulfatation de ces derniers.

La technique de dosage des glycosaminoglycannes utilisée ne permettant de doser que ceux qui sont sulfatés, ceux non sulfatés n'ont donc pas été pris en compte dans l'analyse de quantification que ce soit pour les GAGs totaux ou les chondroïtines.

Les résultats du dosage des glycosaminoglycannes sulfatées ne montrent pas de variation significative dans la quantité de glycosaminoglycannes sulfates totaux entre les différents clones. Les valeurs s'établissent entre 0,83 et 1,26 µg/Million de cellules avec des écarts types ne permettant pas l'obtention de significativité en les clones. Aucune relation entre la quantité de glycosaminoglycannes sulfates totaux et l'activité de CHST8 n'a été décrite à l'heure actuelle. La variabilité des résultats obtenus pour les cellules MOv.*Chst8*⁺ ne nous permettent pas de conclure quant à la valeur observée.

L'analyse des chondroïtines sulfates montre que pour les clones transformés MOv.luci et MOv.*Chst8*⁻, leur quantité augmente (0,41, 0,43 et 0,40 µg/Million de cellules) par rapport aux cellules contrôles MOv (0,27 µg/Million de cellules) (Figure 62B). Cette augmentation ne peut donc être attribuée qu'à un effet dû à l'insertion de la séquence étrangère et non à l'action de l'ARNsh dirigé contre le transcrite *Chst8*. En revanche, les cellules MOv.*Chst8*⁺ ne semble pas avoir une quantité de chondroïtines sulfates significativement inférieure aux cellules MOv. Mais entre les cellules sous et surexprimant les transcrits *Chst8*, la différence est significative avec une quantité plus importante de chondroïtines sulfates dans les cellules MOv.*Chst8*⁻. Contrairement aux glycosaminoglycannes sulfates, l'expression de *Chst8* semble jouer un rôle dans la quantité de chondroïtines sulfates. Néanmoins, la relation entre l'expression de *Chst8* et la quantité de chondroïtines sulfates est probablement indirecte. Plus généralement, c'est la sulfatation du carbone en position 4 des résidus GalNac qui semble intervenir dans la quantité de glycosaminoglycannes. En effet, l'enzyme CHST11 (C4ST-1) qui possède cette activité, est impliquée dans la régulation de la quantité et l'élongation des chaînes de chondroïtines sulfates en agissant de concert avec l'enzyme Chgn-2 (Kluppel *et al.*, 2005, Izumikawa *et al.*, 2011). L'extinction du gène codant CHST11 a pour résultat la diminution drastique de la quantité de chondroïtines sulfates. L'explication de la variation

de la quantité de chondroïtines sulfates dans les cellules MOv sous et surexprimant *Chst8*, pourrait être la présence d'une compétition entre CHST8 et CHST11 vis-à-vis de leur substrat donneur commun (le PAPS, 3'-PhosphoAdénosine 5'-PhosphoSulfate). En effet, la diminution de l'expression de *Chst8*, et donc potentiellement la diminution de l'enzyme CHST8, augmenterait la quantité de chondroïtines sulfates en permettant une plus grande accessibilité au substrat donneur à CHST11 et inversement lorsque *Chst8* est surexprimé et cela en l'absence de variation de l'expression du gène *Chst11*.

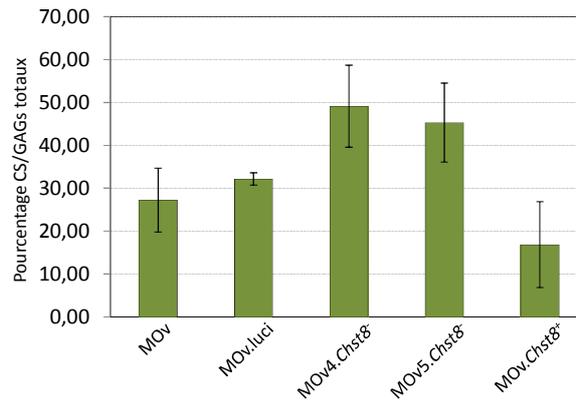


| Nature des GAGs | Clone | | | | |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | MOv | MOv.luci | MOv4.Chst8 ⁻ | MOv5.Chst8 ⁻ | MOv.Chst8 ⁺ |
| Glycosaminoglycannes sulfatés totaux | 0,99±0,26 | 1,26±0,35 | 0,88±0,24 | 0,83±0,21 | 1,31±1,17 |
| Chondroïtines sulfatées | 0,27±0,04 | 0,41±0,03 | 0,43±0,09 | 0,40±0,06 | 0,18±0,10 |

Figure 62 : Quantification des GAGs sulfatés totaux (A) et des chondroïtines sulfatées (B). La quantification des résidus sulfatés et réalisée en utilisant la technique de dosage au DMMB. La quantité de GAGs sulfatés et de CS est exprimée en µg/Million de cellules. Les dosages ont été effectués à partir de trois échantillons indépendants, sauf pour les cellules MOv.luci (1 échantillon).

Les cellules MOv que nous avons utilisées sont des cellules de Schwann issues des ganglions dorsaux des racines nerveuses. Etant donné la présence presque exclusive de chondroïtines sulfates et de héparanes sulfates dans le système nerveux central, les variations dans la quantité de chondroïtines sulfates couplées à l'absence de modification dans la quantité de glycosaminoglycannes sulfatés totaux sont vérifiées par la différence dans le pourcentage que représentent les chondroïtines sulfates parmi les glycosaminoglycannes sulfates (Figure 63). En effet, des variations importantes sont mises en évidence, permettant de distinguer deux groupes au niveau des clones. Dans le premier groupe, on retrouve les cellules sous exprimant *Chst8* avec des valeurs de 49,2 % et 45,3 % de chondroïtines sulfates parmi les glycosaminoglycannes totaux. Dans le second groupe, les cellules MOv.*Chst8*⁺ avec une valeur de 16,9 %. Enfin le troisième groupe avec les cellules témoins MOv avec 27,3 %. La modification d'expression de *Chst8* engendre donc une variation dans la proportion de chondroïtines sulfates présent dans les glycosaminoglycannes.

Les chondroïtines et les héparanes sulfates possèdent le même tétrasaccharide de liaison au corps protéique. L'orientation de la synthèse vers l'un ou l'autre type est le fruit de l'activité de deux enzymes, GalNAcT-1 (*Chgn1*) et GlcNAcT-1 (*Extl2/Extl3*). En parallèle de l'effet indirect que pourrait avoir CHST8 sur la quantité de chondroïtines sulfates par l'intermédiaire de sa compétition avec CHST11 pour le substrat donneur lors de la synthèse des glycosaminoglycannes, la variation de l'expression de l'un des deux gènes codant pour GalNAcT-1 et GlcNAcT-1 pourrait modifier la proportion de chaque type. De plus, une modification de l'expression de gènes codant les enzymes de dégradation des héparanes sulfates et chondroïtines sulfates pourrait également intervenir.



| Nature des GAGs | Clone | | | | |
|-------------------------|------------|-------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | MOv | MOv.luci | MOv4.Chst8 ⁻ | MOv5.Chst8 ⁻ | MOv.Chst8 ⁺ |
| Chondroïtines sulfatées | 27,3 ± 7,4 | 32,0 ± 1,45 | 49,2 ± 9,6 | 45,3 ± 9,2 | 16,9 ± 10,0 |

Figure 63 : Représentativité des chondroïtines sulfatées parmi les glycosaminoglycannes sulfatés totaux. Le pourcentage de CS est déterminé à partir de la quantification des GAGs totaux et des CS. Il s'agit de la moyenne de la quantité de CS par rapport à la moyenne de la quantité de GAGs totaux.

Les analyses transcriptomiques (Tableau 21) sur les différents clones cellulaires ne permettent cependant pas d'observer d'orientation précise vers la synthèse ou la dégradation des GAGs. Le gène *Chgn* n'est variant que dans les cellules MOv5.Chst8⁻ et MOv.Chst8⁺ où il est respectivement éteint et sous exprimé d'un facteur 2,5. Le gène *Extl3* n'est, quant à lui, variant que dans les cellules MOv.Chst8⁺ où il est surexprimé d'un facteur 2,1. Le gène *Extl2* n'est en revanche jamais variant. Ces variations ne permettent pas d'expliquer les modifications du pourcentage de chondroïtines sulfates dans les différents clones (Figure 64). Seule la combinaison de la sous expression de *Chgn* et la sur expression d'*Extl3* oriente dans le sens de la diminution des chondroïtines sulfates observée dans les cellules MOv.Chst8⁺. Si l'on regarde maintenant les gènes codants pour des enzymes intervenant dans la dégradation des glycosaminoglycannes, aucun gène ne présente de variation d'expression.

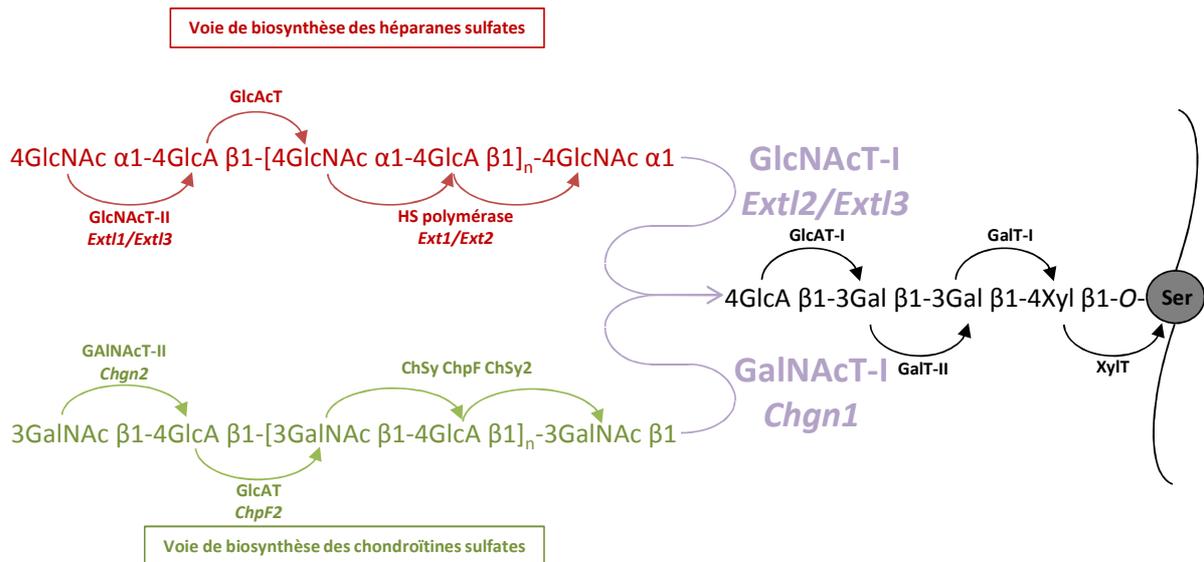


Figure 64 : Représentation schématique de la biosynthèse des GAGs de type HS et CS. Après la synthèse du tétrasaccharide de liaison (en noir) la synthèse est orientée soit vers la synthèse des héparanes sulfates (HS en rouge) soit vers la synthèse des chondroïtines sulfates (CS en vert). Le cœur protéique est représenté en gris. Les différentes glycosyltransférases sont représentées également. En violet sont indiqués les gènes impliqués dans la synthèse des héparanes et chondroïtines sulfates variants dans les clones MOv5.*Chst8*⁻ et MOv5.*Chst8*⁺ Adapté de Sugahara et Kitagawa, 2002.

Les chondroïtines sulfates sont des chaînes polysaccharides structurées en unités disaccharidiques répétées un grand nombre de fois et greffées sur un corps protéiques. Ces unités disaccharidiques peuvent présenter différents taux de sulfatation allant de l'absence de sulfate (non sulfatées) à la présence de 2 groupements sulfates (disulfatées). L'une des activités de CHST8 étant potentiellement la sulfatation des chondroïtines sur le carbone en position 4 des résidus GalNac, nous avons réalisé une analyse de l'état de sulfatation des chondroïtines sulfates dans les différents clones sous et surexprimant *Chst8*.

Pour cela, nous avons utilisé la technique HPLC permettant après digestion des chondroïtines sulfates par la chondroïtinase ABC, une bonne séparation des différents disaccharides des chondroïtines en fonction de leurs charges et de leur masse. La nature des disaccharides est déterminée par comparaison avec une gamme de standards (Figure 65).

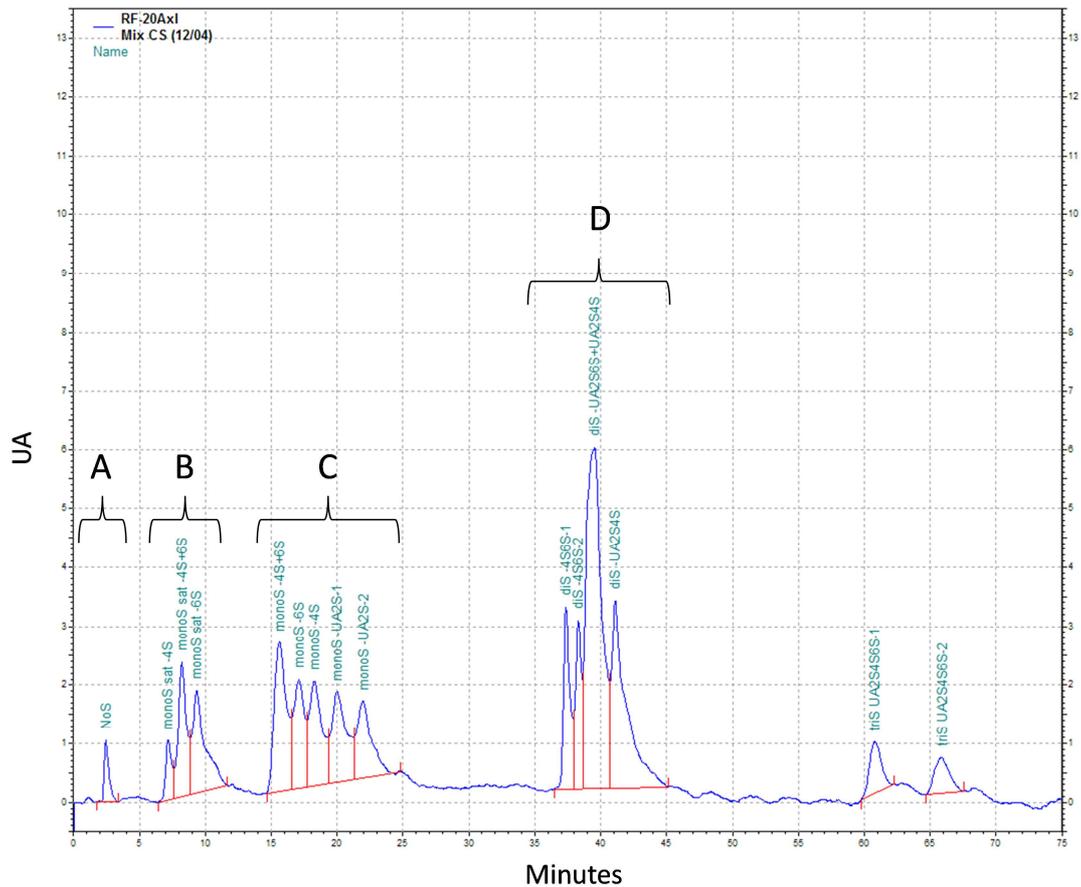


Figure 65 : Chromatogramme des standards de disaccharides de chondroïtines. Les disaccharides sont retenus en fonction de leurs charges (degré de sulfatation) et de leurs masses. Les premiers à sortir de la colonne de chromatographie sont les disaccharides non sulfatés (**A**). Suivent les disaccharides monosulfatés saturés (**B**) et non saturés (**C**). Pour finir, les derniers à être relâchés sont les disaccharides disulfatés (**D**).

La quantification des différents disaccharides s'effectue en déterminant l'aire des pics pour chaque degré de sulfatation et en les comparant à l'aire totale de tous les pics. Les résultats des chromatographies pour les différents clones ne nous permettent pas de distinguer au sein du même degré de sulfatation les différentes positions des sulfates sur les disaccharides (Figure 66).

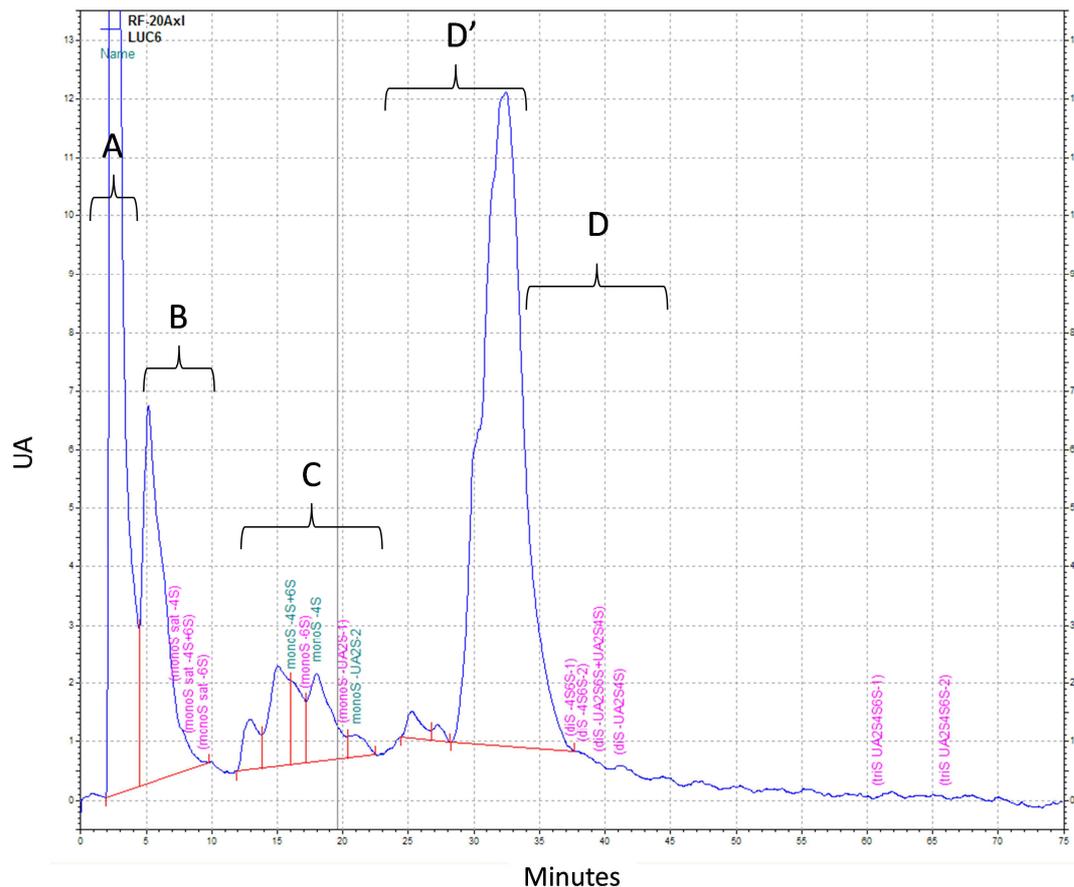


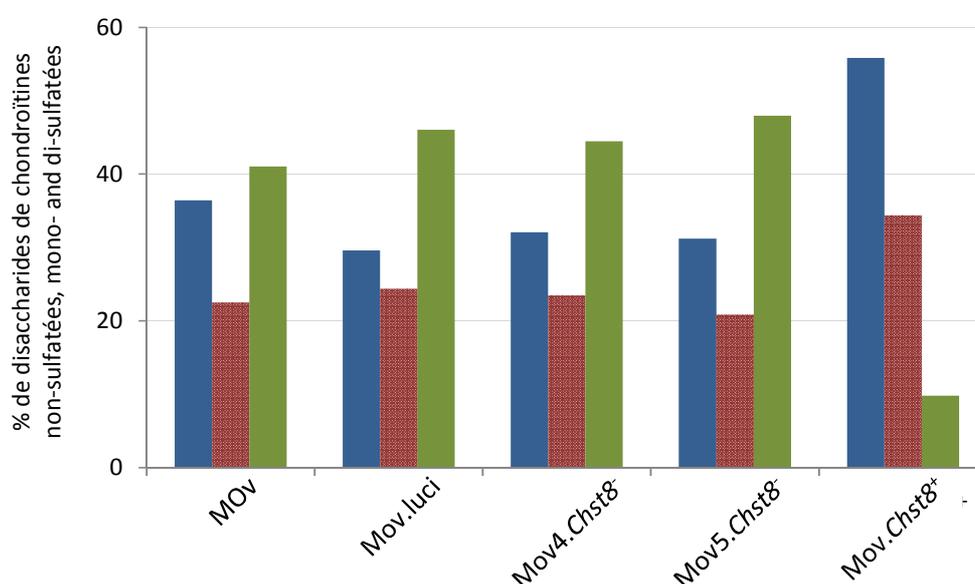
Figure 66 : Exemple de chromatogramme du produit de la digestion par la chondroïtinase ABC des chondroïtines extraites des cellules MOv.luci. Le pic (A) correspond aux disaccharides non sulfatés ainsi qu'à de potentielles impuretés. Les pics (B) correspondent quant à eux aux disaccharides monosulfatés saturés et les pics (C) aux disaccharides monosulfatés insaturés. Les pics (D') semblent correspondre à des disaccharides disulfatés qui pourraient être saturés. La zone (D) correspond au temps de sorties des disaccharides disulfatés insaturés.

L'analyse de la répartition de la sulfatation à travers les chondroïtines sulfates (Figure 67) montre que les cellules témoins ainsi que les clones MOv.Chst8⁻ sont composées en majorité de chondroïtines sulfates constituées de disaccharides disulfatés de type CS-B (GalNAc 4S ou 6S – GlcA/idoA 2S ou 3S) ou CS-E (GalNAc 4S6S). Nous pouvons néanmoins noter un décalage dans le temps de rétention des pics correspondant aux chondroïtines disulfates qui initialement étaient détectés entre 35 et 45 minutes et qui pour tous les échantillons sont détectés entre 25 et 35 minutes. Cela pourrait avoir deux causes :

- Une déacétylation du résidu GlcA, mais cela n'existe pas chez les chondroïtines sulfates, contrairement aux héparanes sulfates. Celle-ci serait due à l'expérience, mais elle semble peu probable étant données les conditions utilisées.

- Une saturation des disaccharides qui serait le résultat de l'action de hyaluronidases. En effet, l'hydrolyse effectuée par les hyaluronidases engendre la formation de disaccharides saturés, c'est-à-dire dépourvue de double liaison sur l'acide hexuronique.

Les cellules MOv.*Chst8*⁺ quant à elles, sont au contraire plus riches en CS-A (GalNAc 4S) ou C (GalNAc 6S) c'est-à-dire constituées d'unités disaccharidiques monosulfatées. Les pics de disaccharides non sulfatés pouvant être faussés par des impuretés, il ne nous est donc pas possible de les prendre en compte dans l'explication des résultats.



| Clones | % des différents états de sulfatations des chondroïtines | | |
|---------------------------------|--|---------------|-------------|
| | Non sulfatées | Monosulfatées | Disulfatées |
| MOv | 36,5 | 22,5 | 41,0 |
| MOv.luci | 29,6 | 24,4 | 46,0 |
| MOv4. <i>Chst8</i> ⁺ | 32,1 | 23,5 | 44,5 |
| MOv5. <i>Chst8</i> ⁺ | 31,2 | 20,9 | 47,9 |
| MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | 55,8 | 34,4 | 9,8 |

Figure 67 : Analyse de la sulfatation des chondroïtines. Les histogrammes bleus représentent le pourcentage des unités disaccharidiques nonsulfatées, les histogrammes oranges celui des unités disaccharidiques monosulfatées et les histogrammes verts celui des unités disaccharidiques disulfatées.

I.5.b. Analyse semi-quantitative du taux de chondroïtines présentant un résidu GalNAc 4-*O*-sulfaté

Après avoir analysé de « manière large » les glycosaminoglycannes sulfatés en les quantifiant, nous avons réduit le champ d'investigation en quantifiant les chondroïtines sulfatées. Au sein de ces chondroïtines sulfatées, nous avons alors différencié les différents degrés de sulfatation des disaccharides les constituant. Afin d'affiner encore l'analyse, nous avons ciblé un type de sulfatation précise correspondant à l'activité de la protéine CHST8 codée par le gène *Chst8*. Il s'agit de la sulfatation du carbone en position 4 des résidus GalNAc des chondroïtines.

Deux approches ont été réalisées. L'une par microscopie confocale et la seconde par cytométrie en flux.

La microscopie confocale a pour but de déterminer la localisation des chondroïtines 4-*O*-sulfatées. Pour cela nous avons réalisé deux types de marquages en perméabilisant ou non les cellules au Triton X100. Les données de la littérature localisent les chondroïtines au niveau de la membrane cellulaire et de la matrice extra cellulaire. Les résultats obtenus sur les cellules non perméabilisées montrent un marquage de surface (Figure 68) qui corrobore la présence de chondroïtines 4 sulfate à la membrane. Le marquage intracellulaire quant à lui montre un marquage diffus dans le cytoplasme. Il n'y a pas de marquage précis à l'intérieur du cytoplasme pouvant indiquer leur présence dans un organe précis. Il est probable que le protocole utilisé pour perméabiliser les cellules ait également endommagé les différentes membranes des organites intracellulaires libérant alors leur contenu dans le cytoplasme. Ou alors, les disaccharides sont effectivement présents dans le cytoplasme mais cela n'a jamais été montré.

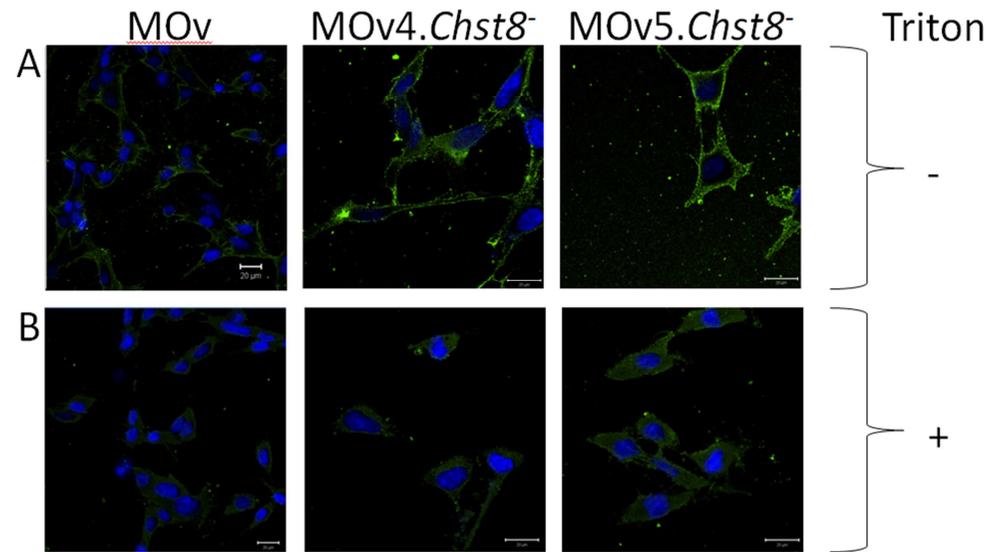


Figure 68 : Localisation cellulaire des chondroïtines GalNAc 4-O sulfatées. Immunomarquage de cellules MOv et MOv transformées par un rétrovirus contenant une séquence codant un ARNsh spécifique des transcrits *Chst8*, perméabilisées (+) et non perméabilisées (-) par du Triton X-100, avec l'anticorps Anti chondroïtine 4 sulfate (Millipore) et un anti mouse couplé au fluorochrome Alexa 488 (Santa Cruz, USA). **(A)** Les cellules sous exprimant le transcrit *Chst8* (clone 4 et 5) semblent arborer de façon plus importante des chondroïtines GalNAc 4-O sulfatées. **(B)** Le marquage intracellulaire présente un signal diffus dans l'ensemble du cytoplasme. Les noyaux sont marqués avec du Hoescht 33342. Les barres correspondent à 20 μ m.

La cytométrie en flux est complémentaire à l'analyse par microscopie confocale par le fait qu'elle permet la quantification de l'intensité relative de fluorescence (Figure 69).

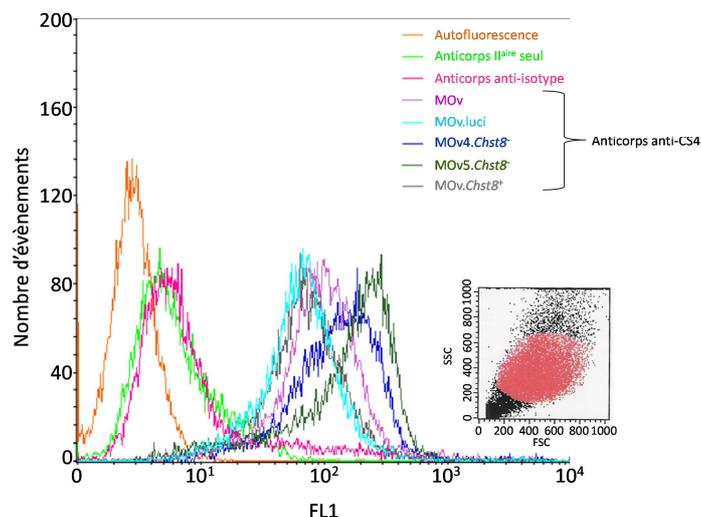
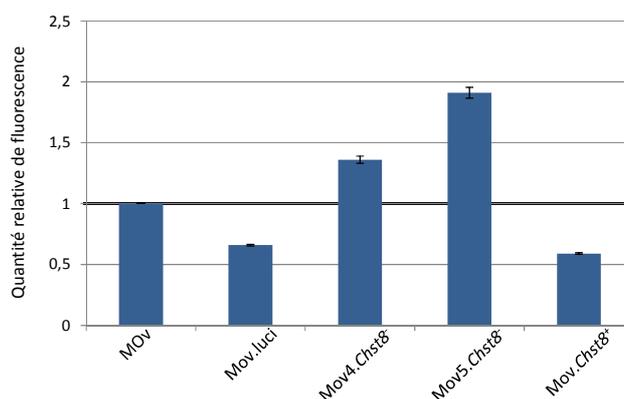


Figure 69 : Analyses par cytométrie en flux des cellules MOv et MOv transformées après marquage par un anticorps anti GalNAc 4-O sulfatées. L'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome Alexa 488. Différents contrôles ont été effectués notamment l'autofluorescence des cellules ainsi qu'un marquage anti-isotype et un marquage avec uniquement l'anticorps secondaire. L'histogramme pour chaque clone est représenté avec une couleur différente et résulte de l'analyse de 10 000 cellules comprises dans la fenêtre d'analyse (en rouge) définie par la taille est la « granularité » des cellules.

La quantification relative du signal de fluorescence est calculée en comparant la moyenne de fluorescence de 10 000 évènements pour chaque échantillon à celle des cellules témoins MOv. (Figure 70).



| Clones | Moyenne de fluorescence | Quantité relative de fluorescence |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| MOv | 128,58 ± 1,32 | 1 ± 0,01 |
| MOv.luci | 83,28 ± 1,02 | 0,65 ± 0,01 |
| MOv4.Chst8 ⁻ | 168,13 ± 3,25 | 1,31 ± 0,03 |
| MOv5.Chst8 ⁻ | 227,77 ± 4,96 | 1,77 ± 0,04 |
| MOv.Chst8 ⁺ | 91,36 ± 0,62 | 0,71 ± 0,00 |

Figure 70 : Quantification relative de fluorescence des cellules MOv transformées. La quantification relative est calculée à partir de la moyenne de fluorescence de chaque échantillon en comparaison de celle du témoin. Les valeurs de fluorescence sont obtenues à partir de trois échantillons indépendants.

La mesure de l'intensité de fluorescence relative, réalisée sur les cellules non perméabilisées, montre que celle-ci est significativement supérieure uniquement pour les cellules MOv.*Chst8*⁻ 4 et 5. Cette augmentation de la quantité de chondroïtines GalNAc 4-*O* sulfatées ne peut pas être liée à l'activité de la forme tronquée de CHST8 surtout pour le clone MOv5.*Chst8*⁻ où l'expression du gène codant l'enzyme est très fortement diminuée. Ce résultat pourrait s'expliquer par une augmentation de la disponibilité du substrat donneur commun aux deux enzymes, le PAPS, pour l'enzyme CHST11 qui catalyse la réaction de GalNAc 4-*O* sulfatation des chondroïtines. Par contre, le cas contraire ne se vérifie pas car une augmentation de l'expression de *Chst8* ne semble pas diminuer la quantité de chondroïtines GalNAc 4-*O* sulfatées par rapport aux cellules MOv.luci.

I.6. Impact de la sous expression de *Chst8* sur la morphologie des cellules MOv

Les analyses précédentes montrent clairement qu'il y a une modification de la matrice extracellulaire dans les différents clones, aussi des analyses microscopiques de la morphologie des cellules ont été réalisées. Les photographies prises 12 h après ensemencement (10 % de confluence) montrent, pour tous les clones, peu de différences morphologiques par rapport aux cellules MOv (Figure 71). Cependant, le temps de culture nécessaire pour atteindre la confluence n'est pas identique pour toutes les cultures, les contrôles atteignent un état de confluence 96 h après inoculation, alors que le clone 5 l'atteint en 120 h. De plus, l'organisation des cellules à confluence diffère. Les cellules MOv, MOv.luci et MOv.*Chst8*⁺ sont organisées en faisceaux unidirectionnels. Au contraire, les cellules MOv.*Chst8*⁻ présentent une organisation plus aléatoire sans réelle structuration, avec par endroit de légers amas (Figure 72).

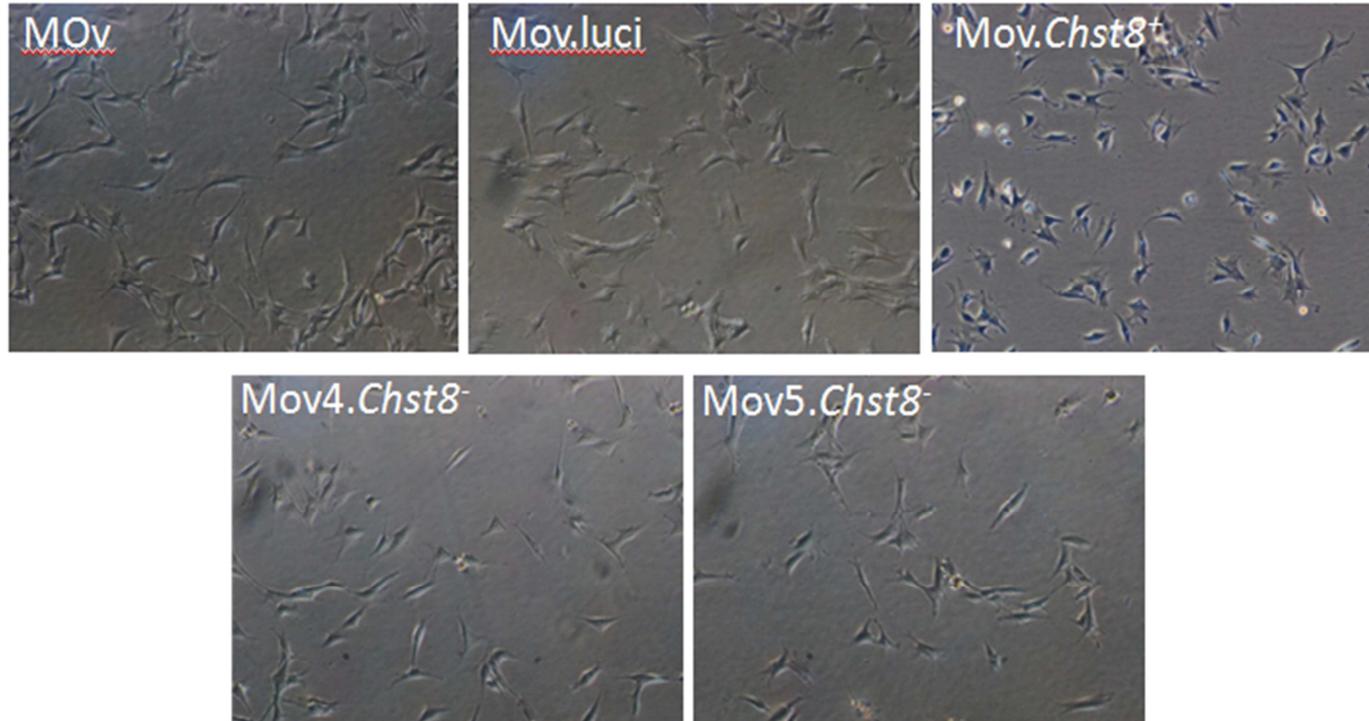


Figure 71 : Morphologie des cellules MOv et MOv transformées 12 h après ensemencement (10 % de confluence). Les différentes cellules ne présentent pas de modifications morphologiques particulières entre elles. (Grossissement X100).

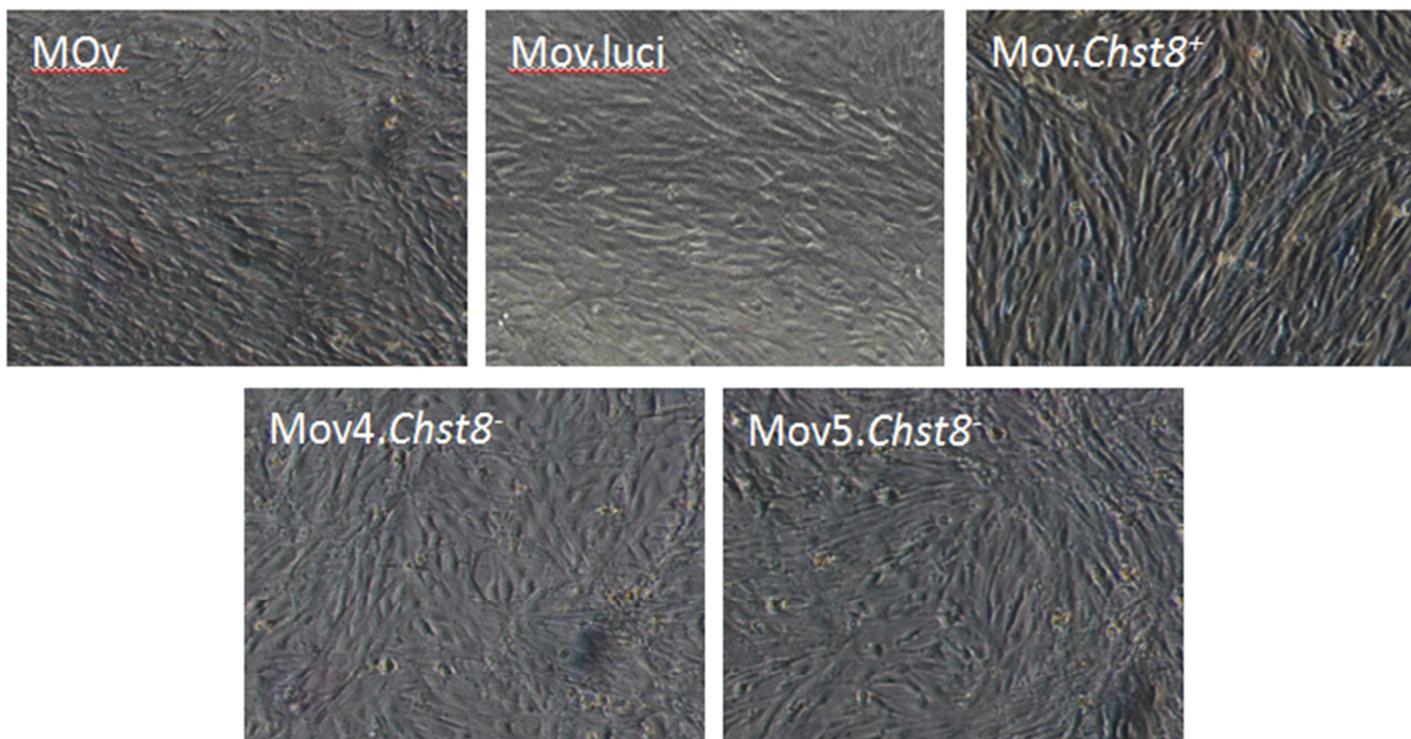


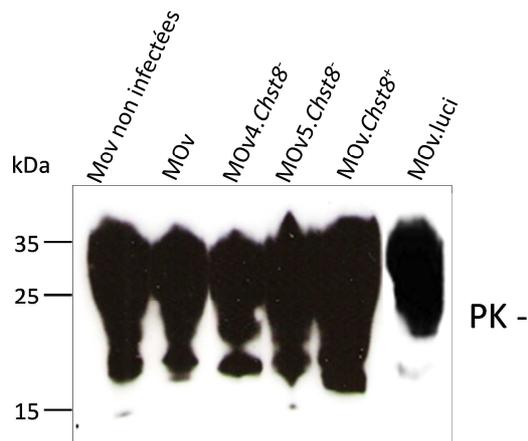
Figure 72 : Morphologie des cellules MOv et MOv transformées à confluence. Les cellules MOv, MOv.luci et MOv.Chst8⁺ forment des faisceaux unidirectionnels alors que les cellules MOv.Chst8⁻ prolifèrent aléatoirement sans réelle structuration (Grossissement X100).

Des travaux ont été menés sur l'implication des chondroïtines sulfates et kératanes sulfates dans la migration, l'adhésion et la croissance des cellules neuronales (Mace *et al.*, 2002, Theocharis *et al.*, 2010). La surexpression de CHST3 (C6ST-1) facilite la migration des cellules de Schwann au cours de la croissance axonale (Liu, J. *et al.*, 2006), et les chondroïtines fortement sulfatées jouent un rôle dans la migration neuronale au niveau du cortex cérébral (Ishii et Maeda, 2008). Chez le poisson zèbre, l'extinction du gène codant CHST11 provoque des défauts de formation des somites et de guidance des axones (Mizumoto *et al.*, 2009). La régénération neuronale ainsi que la plasticité est également affectée lorsque les GAGs et notamment les chondroïtines sulfates et les kératanes sulfates sont modifiés (Filous *et al.*, 2010, Gu, W. L. *et al.*, 2009). En effet, la diminution de la quantité de chondroïtines sulfates permet la régénération neuronale à la suite d'une blessure dans le système nerveux central. L'augmentation de leur quantité ainsi que la modification d'expression de gènes impliqués dans les processus d'adhésion cellulaire (*Itga*, *Itgb*, *Itgbl1*, *Siglecf*, *Cd245*) vont dans le sens de la modification phénotypique que l'on observe pour les cellules MOv.*Chst8*.

II. Analyse de l'influence de la sous expression de *Chst8* sur la transconformation de la PrP^C et la réplication de la PrP^{Sc}

Afin de déterminer l'influence de la dérégulation de l'expression de *Chst8* sur la transconformation de la protéine prion cellulaire ainsi que la réplication de la PrP^{Sc}, nous avons effectué une expérience d'infection des différents clones de cellules MOv sous-exprimant ou surexprimant le gène *Chst8* avec une source d'agent infectieux. La source d'agent infectieux est un homogénat de cerveau de souris tg338 (souris transgénique « ovinisée ») contenant la souche de tremblante expérimentale 127S (Archer *et al.*, 2004).

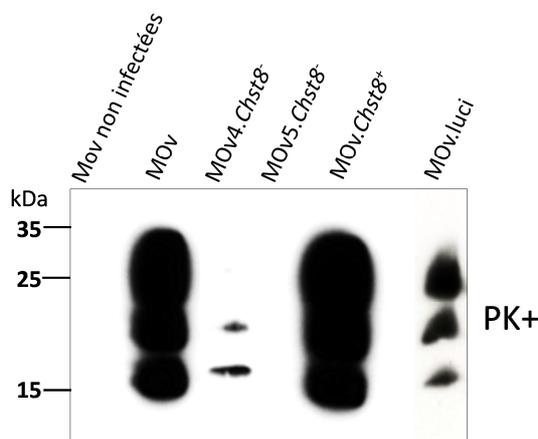
Lors du premier passage après infection un signal conséquent pour la protéine prion cellulaire est détecté par western-blotting dans l'ensemble des échantillons (Figure 73) contrairement à ce que l'on pouvait observer pour ces mêmes cellules avant contact avec l'agent infectieux (Figure 59). En effet, on détecte à présent un signal PrP conséquent dans les clones 4 et 5 (1,00 et 1,06) ce qui n'était pas le cas avant (0,37 et 0,51). Les cellules MOv.*Chst8*⁺ (1,25) présentent toujours un signal légèrement plus fort que les cellules contrôlent.



| Passages | MOv | MOv.Chst8 ⁻ | | MOv.Chst8 ⁺ | MOv.luci |
|----------|-----|------------------------|----------------|------------------------|----------|
| | | 4 | 5 ⁻ | | |
| 1 | 1 | 1,00 | 1,06 | 1,25 | 0,86 |

Figure 73 : Infection des clones MOv.Chst8⁻ au passage 1. Les cellules en culture exposées à un inoculum infectieux contenant la souche de prion 127S sont testées pour la présence de protéine prion totale (PK). L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps anti prion sha31 sur des extraits protéique de cellules issus du premier passage après infection. Pour la détection de la PrP totale, 25 µg de protéine ont été déposés sur le gel. L'intensité relative du signal PrP dans les cellules MOv transformées est calculée par rapport au témoin MOv.

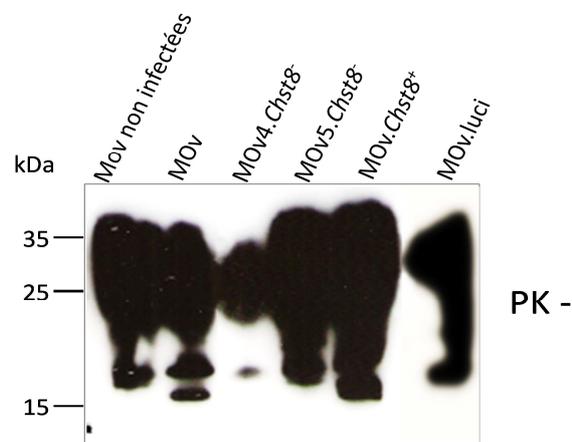
Après digestion à la protéinase K, un signal PrPres est observé dans l'ensemble des clones excepté pour le clone 5 (Figure 74). Alors que l'intensité est relativement similaire pour les cellules témoins MOv et les cellules MOv.Chst8⁺, celle-ci est beaucoup plus faible dans le clone 4 (0,05). Les autres cellules contrôles, MOv.luci, présentent une intensité plus faible (0,48) que les cellules MOv.



| Passages | MOv | MOv.Chst8 ⁻ | | MOv.Chst8 ⁺ | MOv.luci |
|----------|-----|------------------------|----------------|------------------------|----------|
| | | 4 | 5 ⁻ | | |
| 1 | 1 | 0,05 | 0,00 | 1,11 | 0,48 |

Figure 74 : Infection des clones MOv.Chst8⁻ au passage 1. Les cellules en culture exposées à un inoculum infectieux contenant la souche de prion 127S sont testées pour la présence de protéine prion résistante à la digestion par la protéinase K (PK+). L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps anti prion sha31 sur des extraits protéique de cellules issus du premier passage après infection. Pour la détection de la PrP totale, 150 µg de protéine ont été déposés sur le gel. L'intensité relative du signal PrP dans les cellules MOv transformées est calculée par rapport au témoin MOv.

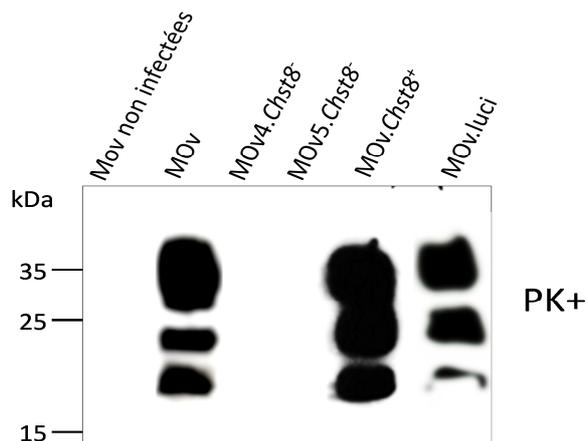
Lors du second passage, nous détectons toujours un signal PrP totale dans l'ensemble des clones, mais celui-ci s'atténue dans les cellules MOv.*Chst8*⁻ 4 (0,51) avec une diminution de 50 % d'intensité relative (Figure 75), ce qui correspond à ce que l'on observe avant infection.



| Passages | MOv | MOv. <i>Chst8</i> ⁻ | | MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | MOv.luci |
|----------|-----|--------------------------------|------|--------------------------------|----------|
| | | 4 | 5 | | |
| 2 | 1 | 0,51 | 1,14 | 1,37 | 1,01 |

Figure 75 : Infection des clones MOv.*Chst8*⁻ au passage 2. Les cellules en culture exposées à un inoculum infectieux contenant la souche de prion 127S sont testées pour la présence de protéine prion totale (PK-). L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps anti prion sha31 sur des extraits protéiques de cellules issus du second passage après infection. Pour la détection de la PrP totale, 25 µg de protéine ont été déposés sur le gel.

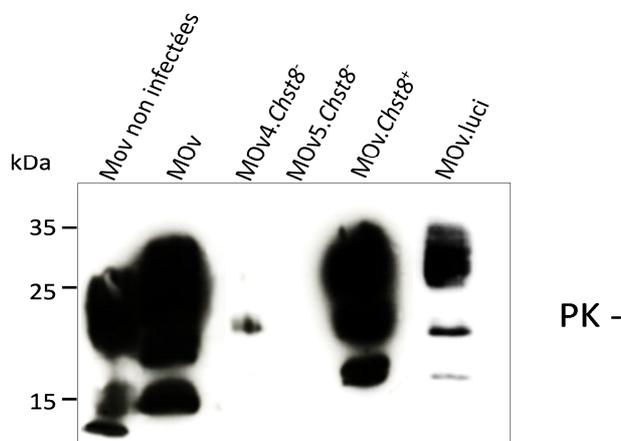
Contrairement au passage 1, le signal PrPres n'est plus présent dans les clones MOv.*Chst8*⁻. Les clones contenant la séquence codant l'ARNsh spécifique de *Chst8* ne présentent plus aucun signal (Figure 76). On se retrouve dans le cas de ce que l'on pourrait appeler une infection abortive. La formation des PrPres observé au premier passage et son autoréplication (passage 2 et 3) semblent être deux événements distincts (Vorberg *et al.*, 2004).



| Passages | MOv | MOv.Chst8 ⁻ | | MOv.Chst8 ⁺ | MOv.luci |
|----------|-----|------------------------|------|------------------------|----------|
| | | 4 | 5 | | |
| 2 | 1 | 0,00 | 0,00 | 1,32 | 0,94 |

Figure 76 : Infection des clones MOv.Chst8⁻ au passage 2. Les cellules en culture exposées à un inoculum infectieux contenant la souche de prion 127S sont testées pour la présence de protéine prion résistante à la digestion par la protéinase K (PK+). L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps anti prion sha31 sur des extraits protéique de cellules issus du premier passage après infection. Pour la détection de la PrP totale, 150 µg de protéine ont été déposés sur le gel. L'intensité relative du signal PrP dans les cellules MOv transformées est calculée par rapport au témoin MOv.

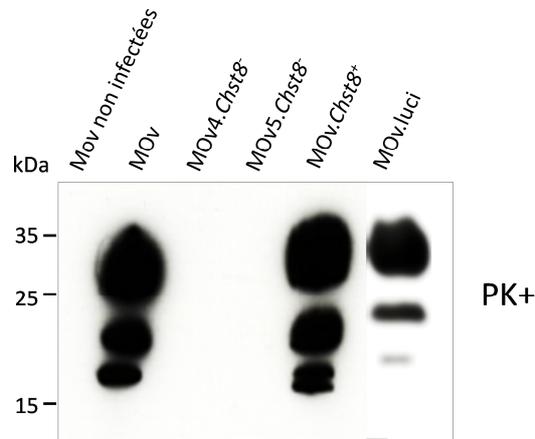
Le troisième passage, confirme la tendance observée lors du second passage avec une diminution plus forte de l'intensité du signal PrP totale dans les clones MOv.Chst8⁻ (Figure 77).



| Passages | MOv | MOv.Chst8 ⁻ | | | | | MOv.Chst8 ⁺ | MOv.luci |
|----------|-----|------------------------|------|------|------|------|------------------------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 3 | 1 | 0,12 | 0,01 | 0,16 | 0,08 | 0,00 | 0,98 | 0,40 |

Figure 77 : Infection des clones MOv.Chst8⁻ au passage 3. Les cellules en culture exposées à un inoculum infectieux contenant la souche de prion 127S sont testées pour la présence de protéine prion totale (PK-). L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps anti prion sha31 sur des extraits protéique de cellules issus du second passage après infection. Pour la détection de la PrP totale, 25 µg de protéine ont été déposés sur le gel.

Comme pour le passage 2, il n'y a pas de signal PrPres dans les clones MOv.*Chst8*⁻. Ceci confirme la non chronicité de l'infection observée lors du premier passage dans ces clones (Figure 78).



| Passages | MOv | MOv. <i>Chst8</i> ⁻ | | MOv. <i>Chst8</i> ⁺ | MOv.luci |
|----------|-----|--------------------------------|------|--------------------------------|----------|
| | | 4 | 5 | | |
| 3 | 1 | 0,00 | 0,00 | 1,02 | 0,63 |

Figure 78 : Infection des clones MOv.*Chst8*⁻ au passage 3. Les cellules en culture exposées à un inoculum infectieux contenant la souche de prion 127S sont testées pour la présence de protéine prion résistante à la digestion par la protéinase K (PK+). L'immunodétection est réalisée avec l'anticorps anti prion sha31 sur des extraits protéiques de cellules issus du premier passage après infection. Pour la détection de la PrP totale, 150 µg de protéine ont été déposés sur le gel. L'intensité relative du signal PrP dans les cellules MOv transformées est calculée par rapport au témoin MOv.

L'induction de PrPres dans des cellules en culture est le plus souvent réalisée en utilisant des souches de prions adaptées aux rongeurs (Vilette, 2008) par l'intermédiaire de cellules « scrapies » ou d'extrait de cerveau infecté. Dans notre cas, nous avons utilisé un homogénat de cerveau contenant la souche 127S qui est la plus adaptée aux cellules MOv (Archer *et al.*, 2004). Comme attendu, aux vues des précédentes études réalisées avec le même matériel biologique, l'homogénat de cerveau a induit l'apparition de PrPres et son expression chronique dans les cellules témoins MOv et MOv.luci (Figure 74). Le même résultat est également obtenu pour les cellules MOv.*Chst8*⁺ ayant un taux de transcrite *Chst8* supérieur à la normale. Pour les cellules MOv.*Chst8*⁻, le résultat est différent. Seule une apparition transitoire de PrPres est obtenue (Figure 74, Figure 76), aucune chronicité de l'infection n'est observée. Ce phénomène d'infection abortive a déjà été montré (Vorberg *et al.*, 2004). Dans un premier temps, la PrP^{Sc} exogène entraîne la transconformation d'une partie de la PrP^C puis dans un second temps, la PrP^{Sc} néo synthétisée s'autoréplique pour permettre une infection chronique des cellules au cours des repiquages. Pour le clone 4, la présence de PrP^{Sc} amenée par l'homogénat de cerveau induirait une modification de la conformation de la PrP^C mais lors du repiquage et donc de l'élimination de la PrP^{Sc} exogène, l'environnement non propice ne permettrait pas l'autoréplication de la PrP^{Sc} nouvellement formée, l'effet de dilution faisant alors disparaître le signal PrP^{Sc}. Pour les cellules MOv5.*Chst8*⁻, la PrP^{Sc} exogène n'induit pas la

transconformation initiale. Les modifications de la matrice extracellulaire (MEC) dont les GAGs sont les principaux composants, sont connues dans les maladies à prion (Mayer-Sonnenfeld *et al.*, 2005) ainsi que dans les modèles cellulaires « scrapies » (Ben-Zaken *et al.*, 2003, Barret *et al.*, 2005). Nous avons pu mettre en évidence dans les différents clones un dérèglement dans la nature et la sulfatation des GAGs, ainsi que de nombreux gènes codant pour des enzymes responsables de la synthèse ou la dégradation des N-glycannes sont affectées dans leurs expressions (Tableau 21). Ces dernières pourraient alors modifier les structures glycaniques des protéines de l'environnement proche de la PrP mais également de la PrP elle-même. On sait que la glycosylation de la protéine prion est importante pour la localisation de la PrP (Salamat *et al.*, 2011) ainsi que pour sa transconformation. En effet dans le cerveau de souris non infectée comme infectée, la PrP^C est majoritairement présente sous forme diglycosylée alors que la PrP^{Sc} l'est plutôt sous forme non glycosylée (Muller *et al.*, 2005). De plus, la composition des « perineural nets » est modifiée dans le cerveau de model murin de pathologie à prion (Costa *et al.*, 2009), tout comme dans des bovins atteints de ESB (Papakonstantinou *et al.*, 1999). Ces dernières modifications seraient dues à l'augmentation de l'activité de hyaluronidases dans l'espace extracellulaire. Les différents résultats obtenus confortent l'hypothèse de la participation active de l'environnement glycanique de la protéine prion, et particulièrement des glycosaminoglycannes dans son processus de transconformation mais aussi d'auto-réplication.

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans BBRC.

ARTICLE 1:

The *Chst8* transcript level modulates the PrP^C to PrPres transconformation in MOv cells.

Chapitre II :

Analyse phylogénique de la protéine prion

Le polymorphisme de la protéine prion qui est associé à la sensibilité/résistance aux ESSTs est localisé au niveau de domaines impliqués dans la structure secondaire de la protéine, que ce soit les hélices α ou les feuillets β , ou bien dans la liaison entre ces deux structures. Chez l'humain, deux mutations augmentant le risque de développer spontanément la MJC, lorsqu'elles sont présentes simultanément, sont situées dans le brin β 1 et l'hélice α 2.

Pendant ma thèse, j'ai également participé à un travail portant sur l'étude du polymorphisme de la protéine prion à travers le prisme de la phylogénie. Le but de cette étude était de comparer les informations obtenues des analyses phylogénétiques avec les polymorphismes observés dans différents mammifères ayant une relation avec les ESSTs, afin de répondre aux deux questions suivantes :

- Quelles sont les régions de la protéine prion qui ont subi le plus de modification au cours de l'évolution des mammifères ?
- Les régions reconnues comme jouant un rôle important dans la sensibilité ou la résistance aux ESSTs ont-elles varié ou non ?

Les résultats obtenus lors de ce travail montrent que sur les 14 sites identifiés, tous sauf un se trouvent dans des régions conservées au cours du temps. Ceci a donné lieu à la rédaction d'un article scientifique publié dans *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*.

ARTICLE 2 :

Polymorphism of the protein prion in mammals: a
phylogenic approach.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Des études menées précédemment au sein du laboratoire avaient permis de mettre en évidence la dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans des processus de glycosylation dans des lignées cellulaires chroniquement infectées mais également dans une lignée murine « ovinisée » atteinte de tremblante expérimentale (Barret *et al.*, 2005, Guillerme-Bosselut *et al.*, 2009). Parmi ces gènes, le gène *Chst8* s'est avéré être un candidat intéressant de par l'activité de la protéine qu'il code, mais également car la dérégulation de ce gène disparaît lors du traitement des cellules chroniquement infectées, par un agent « curant » (Héparanes mimétiques HM2602). En effet, ce gène est sous exprimé dans les cellules Sc-GT1 et Sc-MOv, deux lignées exprimant chroniquement la PrP^{Sc}. Comme ce gène code une sulfotransférase qui lorsqu'elle se trouve sous forme clivée possède, *in vitro*, une activité de sulfatation des résidus GalNAc des chondroïtines, l'hypothèse fut émise que la sous expression de *Chst8* pouvait avoir un rôle important dans l'initiation et la chronicité de l'infection par de l'agent scrapie en agissant sur la sulfatation des chondroïtines faisant partie de l'environnement immédiat de la protéine prion cellulaire. Nous avons donc choisi d'utiliser la lignée MOv, plus facilement infectable que la lignée GT1, afin de sous-exprimer de façon stable le gène *Chst8* en utilisant un ARNsh et de l'infecter à l'aide de l'agent de la tremblante. La diminution du nombre de transcrit *Chst8* n'a pas pour conséquence la diminution de la quantité de chondroïtines sulfatées sur le carbone en position 4 des résidus GalNAc. Cette observation est logique car c'est l'enzyme CHST11 qui est la principale impliquée dans cette activité. Seulement ce n'est pas par une augmentation de l'expression de son gène, qui ne varie pas, mais plutôt par l'augmentation de la disponibilité du substrat donneur du fait de l'absence de compétition.

L'insertion stable de la séquence codant un ARNsh spécifique du transcrit *Chst8* a pour effet la modification importante de l'expression nombreux gènes impliqués dans les processus glycaniques et notamment des glycosaminoglycannes. Malgré l'absence d'un consensus dans l'orientation de l'expression de gènes communs intervenant dans le métabolisme des GAGs entre les différents clones, une constante se dessine au niveau moléculaire, avec l'augmentation du ratio de chondroïtines sulfates par rapport au glycosaminoglycannes totaux. En revanche, l'expression d'autres gènes intervenant dans des processus d'adhésion cellulaire est altérée dans tous les clones notamment *St8sia2* responsable de la modulation des propriétés adhésives de NCAM1 via la synthèse d'acide polysyalique (Angata *et al.*, 2000). Il serait néanmoins important de compléter la caractérisation des différents clones par la localisation de l'insertion des séquences contenant l'ARNsh. Ceci aurait pour but d'affiner l'analyse des résultats d'expression des gènes et d'expliquer les variations inter clones. Pour cela des techniques telles que le southern-blot, la FISH (Fluorescente *In Situ* Hybridation) et la PCR vectorette pourraient être réalisés.

L'analyse de l'infectibilité des cellules MOv, transformées pour diminuer la quantité de transcrite, montre que la nature de l'environnement glycanique de la protéine prion, par le biais des glycosaminoglycannes, est une condition importante à la transconformation de la PrP^C en PrP^{Sc}. Alors que la quantité de chondroïtines sulfates, le ratio CS/GAGs totaux et la répartition des différents types de chondroïtines sulfates (non, mono ou disulfatés) ne semblent pas influencer sur l'expression de PrP^{Sc} suite à un contact avec l'agent infectieux, la position des sulfates sur la chaîne de chondroïtine (Figure 79), quant à elle, présente un rapprochement. Nous observons nettement une corrélation entre l'augmentation de la sulfatation des chondroïtines sur le carbone en position 4 des résidus GalNAc et la diminution de sensibilité des cellules MOv sous exprimant le transcrite *Chst8* à exprimer chroniquement de la PrPres. La PrP^{Sc} ayant une conformation thermodynamiquement plus stable que la PrP^C (Baskakov *et al.*, 2001), un changement dans la composition des glycosaminoglycannes en contact avec la protéine prion pourrait alors, par l'intermédiaire de changements électrostatiques liés à la sulfatation, modifier la valeur de la barrière énergétique favorisant ou au contraire inhibant l'apparition de PrP^{Sc}. Nos résultats confortent le fait que la formation de PrP^{Sc} est un phénomène diphasique avec une phase d'apparition de la PrPres dépendante de la conformation initiale de la PrP^C et une seconde phase de chronicité dépendante de l'environnement glycanique de la protéine prion.

Contrairement à ce que les études précédemment menées dans notre laboratoire laissaient entrevoir, les travaux réalisés au cours de cette thèse montrent un phénomène inverse, soit l'augmentation de la résistance à l'infection par l'agent de la tremblante de la lignée cellulaire « ovinisée » MOv lorsque le gène *Chst8* est sous exprimé. Il serait intéressant de remettre en contact les cellules MOv sous exprimant *Chst8* avec une quantité supérieure d'agent infectieux afin de vérifier si cette résistance est totale ou partielle et dose dépendante. En effet, il n'est pas impossible d'imaginer que malgré un environnement glycanique défavorable, une quantité plus importante que celle testée puisse engendrer une infection chronique.

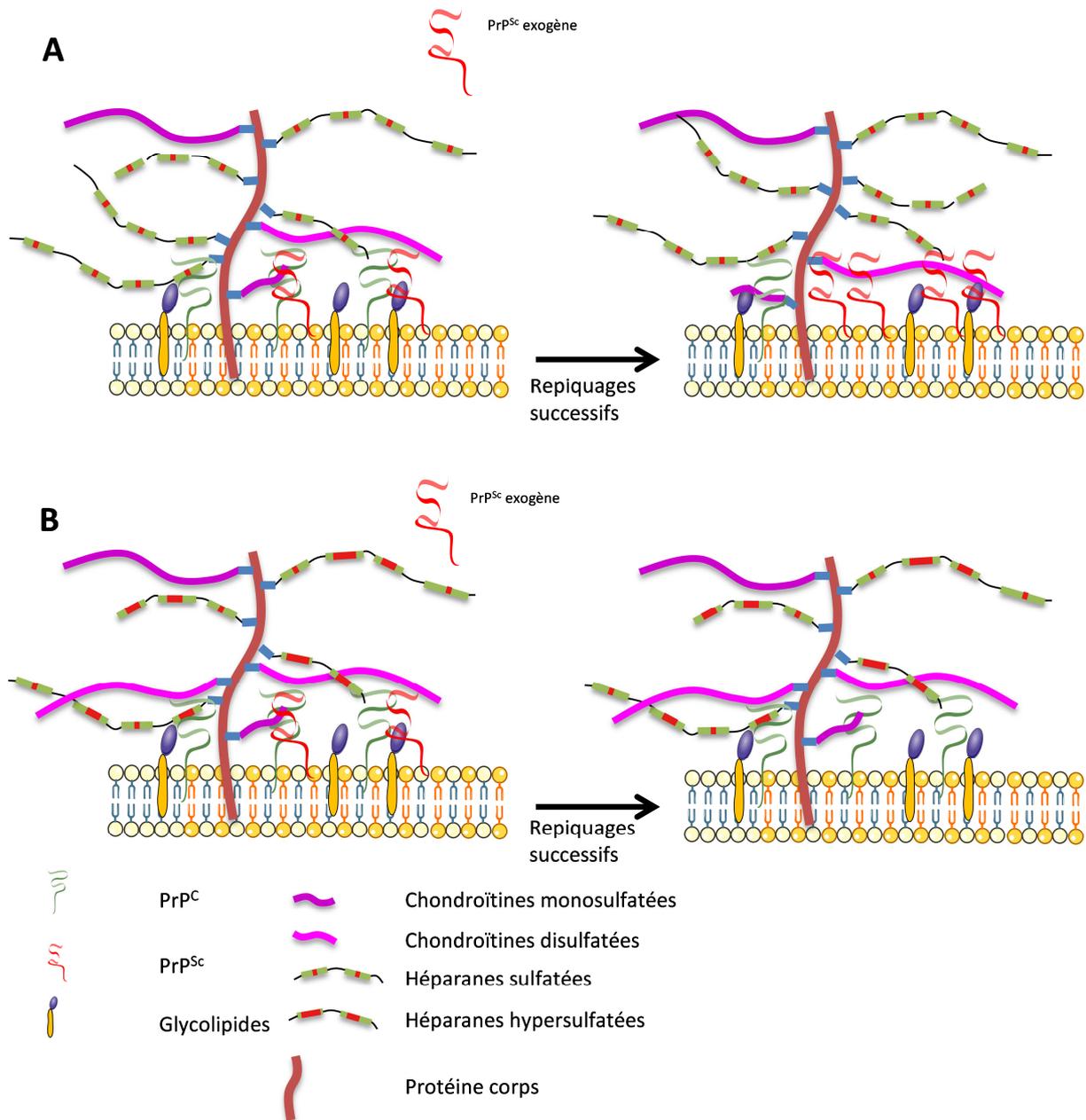


Figure 79 : Illustration d'une hypothèse de relation entre des modifications environnementales portant sur les glycosaminoglycannes et du processus de transonformation de la PrP^C. (A) Dans le cas d'un environnement normal, le ratio CS/GAGs totaux et la sulfatation des CS et de HS autorise la néo formation de PrP^{Sc} ainsi que son autoréplication au cours des passages successifs. La nature et/ou la sulfatation des glycosaminoglycannes sont modifiés aux vues des modifications d'expression des gènes intervenant dans le métabolismes des GAGs (Barret *et al.*, 2005, Guillaume-Bosselut *et al.*, 2009). (B) Dans le cas des clones MOv.Chst8⁻, la nature et la sulfatation des glycosaminoglycannes sont modifiés avec une modification du ratio CS/GAGs totaux ainsi qu'une probable augmentation de la sulfatation des HS diminuant très fortement la néo formation de PrP^{Sc} et ne permettant pas son autoréplication.

Nous avons analysé uniquement la sulfatation du carbone en position 4 des résidus GalNAc des chondroïtines dans cette étude. Il serait intéressant de faire de même avec la sulfatation du carbone en position 6 des résidus GalNAc car cela pourrait donner des informations importantes quant au profil de sulfatation des chondroïtines formant le code de sulfatation. Pour cela il faudrait invalider le gène *Chst3*, en utilisant un protocole expérimental similaire à celui réalisé pour *Chst8*. Cela permettrait de comprendre un peu mieux comment la répartition des charges négatives le long des chaînes de chondroïtines joue sur le processus de transconformation.

De plus, seul le profil de sulfatation des chondroïtines sulfates a été analysé, mais comme nous pouvons le constater, dans le modèle cellulaire d'étude, les héparanes sulfates sont en quantité supérieure. Il serait donc important d'analyser également le profil de sulfatation des héparanes sulfates afin de déterminer quel rôle celui-ci pourrait également jouer dans la transconformation de la protéine prion. En effet parmi les gènes modifiés, une sulfotransférase spécifique des héparanes sulfates est surexprimée dans les cinq clones (*HS3st3A1*) et la modification d'expression générale des différentes sulfotransférases oriente vers l'augmentation de la sulfatation de ces derniers associée à la résistance à l'infection par l'agent de la tremblante des cellules MOv.

La composition en glycosaminoglycannes de la MEC dépendant également des corps protéiques qui sont synthétisés. Une étude approfondie de l'expression des gènes codant ces différents corps protéiques au cours de l'infection pourrait nous apporter des informations sur la composition générale en glycosaminoglycannes de la MEC.

La modification de l'expression de gènes impliqués dans les métabolismes de glycosylation au cours de la pathologie, confirme l'interconnexion des phénomènes de transconformation et de modification de l'environnement glycanique. Seulement la nature de cette interconnexion n'est pas encore précisée. Quel processus influe sur l'autre ? Est-ce la présence de PrP^{Sc} exogène qui engendre une modification de l'expression des gènes entraînant une modification de l'environnement favorable au processus de transconformation ? Ou alors est-ce la « primo-conversion » de la PrP^C qui provoque par une modification de la signalisation cellulaire la modification de l'expression des gènes. Pour répondre à cela, il serait intéressant d'analyser l'impact de la PrP^{Sc} exogène sur l'évolution de l'expression de ces gènes dans une lignée cellulaire invalidée pour le gène *Prnp*. Si les modifications d'expression du « glycogénome » persistent, cela indiquerait que ces modifications résulteraient d'une cascade de signalisation engendrée par la reconnaissance de la PrP^{Sc} exogène par un récepteur membranaire. Dans le cas contraire, il s'agirait alors d'une modification de la signalisation cellulaire lors de la transconformation de la PrP^C endogène.

Les résultats de ces travaux associés à ceux obtenus par Ermonval *et coll*, mettant en évidence une dérégulation de nombreux gènes impliqués dans métabolisme des GAGs associée à une modification du profil électrophorétique de la PrP^C au cours d'une différenciation neuronale (Ermonval *et al.*, 2009), suggèrent l'implication d'un code de sulfatation que ceux soit pour la PrP^C ou la PrP^{Sc}. La compréhension de ce code pourrait avoir une importance capitale dans l'élaboration de diagnostic précoce et également de traitement non seulement dans les maladies à prion, mais également d'autres maladies conformationnelles comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson dans lesquelles les GAGs sont retrouvés impliqués dans l'agrégation des protéines responsables (PrP, protéine τ , peptide β -amyloïde et α -synucléine).

ANNEXE

Tableau 23 : Liste des contrôles et des genes de la glycosylation analyse par RT-PCR semi quantitative avec la technologie Taq Man Low Density Array (TLDA).

| Category | Group | Gene Symbol | Gene Name | Cytogenetic Band | NCBI Gene Reference | Assay ID |
|-----------------|--------------------------------|--------------------|--|--------------------|---------------------|---------------|
| Carrier protein | Carbohydrate transporter | Slc2a1 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 | 4 D2.1;4 52.0 cM | NM_011400.1 | Mm00441473_m1 |
| | | Slc2a10 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10 | 2 H3;2 98.0 cM | NM_130451.1 | Mm00453716_m1 |
| | | Slc2a2 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 | 3 A3;3 14.4 cM | NM_031197.1 | Mm00446224_m1 |
| | | Slc2a3 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 | 6 F2;6 59.0 cM | NM_011401.2 | Mm00441483_m1 |
| | | Slc2a4 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 | 11 C-E1;11 40.0 cM | NM_009204.1 | Mm00436615_m1 |
| | | Slc2a5 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5 | 4 E2 | NM_019741.2 | Mm00600311_m1 |
| | | Slc2a6 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 | 2 A3 | NM_172659.1 | Mm00554217_m1 |
| | | Slc2a8 | solute carrier family 2, (facilitated glucose transporter), member 8 | 2 B;2 24.0 cM | NM_019488.3 | Mm00444634_m1 |
| | | Slc2a9 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9 | 5 B3 | NM_145559.1 | Mm00455116_m1 |
| | | Slc5a1 | solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1 | N/A | NM_019810.2 | Mm00451203_m1 |
| | | Slc5a11 | solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11 | 7 F3 | NM_146198.1 | Mm00461435_m1 |
| | | Slc5a2 | solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2 | 7 F4 | NM_133254.2 | Mm00453831_m1 |
| | | Slc5a3 | solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3 | 16 C4 | NM_017391.1 | Mm00444330_s1 |
| | | Slc5a4a | solute carrier family 5, member 4a | 10 C1 | NM_133184.1 | Mm00446582_m1 |
| | | Slc5a4b | solute carrier family 5 (neutral amino acid transporters, system A), member 4b | 10 C1 | NM_023219.1 | Mm00452283_m1 |
| | Miscellaneous function | Slc35d1 | solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter), member D1 | 4 C6 | NM_177732.2 | Mm00624959_m1 |
| | Other transfer/carrier protein | Pitpna | phosphatidylinositol transfer protein, alpha | 11 B5;11 44.11 cM | NM_008850.1 | Mm00476856_m1 |
| | | Pitpnb | phosphatidylinositol transfer protein, beta | N/A | NM_019640.2 | Mm00451003_m1 |
| | | Pitpnm1 | phosphatidylinositol membrane-associated 1 | 19 B1;19 2.0 cM | NM_008851.1 | Mm00476876_m1 |
| | | Pitpnm2 | phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2 | 5 F;5 68.0 cM | NM_011256.1 | Mm00487991_m1 |
| | | Slc35a1 | solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member 1 | 4 A5 | NM_011895.2 | Mm00442341_m1 |
| | | Slc35a2 | solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member 2 | X A2;X 2.0 cM | NM_078484.1 | Mm00446504_m1 |
| | | Slc35a3 | solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member 3 | 3 G1 | NM_144902.2 | Mm00523288_m1 |
| | | Slc35b1 | solute carrier family 35, member B1 | 11 D;11 55.5 cM | NM_016752.1 | Mm00450258_m1 |
| | | Slc35b4 | solute carrier family 35, member B4 | 6 B1 | NM_021435.1 | Mm00480588_m1 |
| | | Slc35c1 | solute carrier family 35, member C1 | 2 E1 | NM_211358.2 | Mm00461182_m1 |
| Glycosidase | Deacetylase | Amy1 | amylase 1, salivary | 3 F3;3 50.0 cM | NM_007446.1 | Mm00651524_m1 |
| | Fucosidase | Fuca1 | fucosidase, alpha-L- 1, tissue | 4 D3;4 65.7 cM | NM_024243.2 | Mm00502778_m1 |
| | Fucosidase | Fuca2 | fucosidase, alpha-L- 2, plasma | 10 A2 | NM_025799.2 | Mm00482088_m1 |
| | Glucosidase | Gaa | glucosidase, alpha, acid | 11 D-E;11 74.0 cM | NM_008064.2 | Mm00484581_m1 |
| | | Ganab | alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit | 19 A | NM_008060.1 | Mm00484541_m1 |
| | | Ganc | glucosidase, alpha; neutral C | 2 F1 | BC075687.1 | Mm00554389_m1 |
| | | Gba | glucosidase, beta, acid | 3 F1;3 44.05 cM | NM_008094.3 | Mm00484700_m1 |
| | Gba2 | glucosidase beta 2 | 4 B1 | NM_172692.1 | Mm00554547_m1 | |
| | Glycosidase | Chi3l3 | chitinase 3-like 3 | 3 F2.3;3 50.5 cM | NM_009892.1 | Mm00657889_mH |

| | | | | | | | |
|---------------|-------------|------------------------|--------------------------------|--|-------------------|---------------|---------------|
| | | Chi3l4 | chitinase 3-like 4 | 3 F2.3 | NM_145126.1 | Mm00840870_m1 | |
| Glycosidase | Glycosidase | Chia | chitinase, acidic | 3 F3 | NM_023186.3 | Mm00458221_m1 | |
| | | Hyal3 | hyaluronoglucosaminidase 3 | 9 F1-F2;9 60.12 cM | NM_178020.2 | Mm00662097_m1 | |
| | | Klb | klotho beta | 5 C3.1 | NM_031180.1 | Mm00473122_m1 | |
| | | LctI | lactase-like | 9 C | NM_145835.1 | Mm00461195_m1 | |
| | | Hyaluronidase | Mgea5 | meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase) | 19 D1;19 45.1 cM | NM_023799.2 | Mm00452409_m1 |
| | | Iduronidase | Idua | iduronidase, alpha-L- | 5 E5;5 57.0 cM | NM_008325.1 | Mm00515143_m1 |
| | | Mannosidase | Edem1 | ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1 | N/A | NM_138677.1 | Mm00551797_m1 |
| | | | Edem2 | ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2 | 2 H1 | NM_145537.1 | Mm00467468_m1 |
| | | | Man1a | mannosidase 1, alpha | 10 B3 | NM_008548.2 | Mm00484754_m1 |
| | | | Man2a1 | mannosidase 2, alpha 1 | 17 E1.2 | NM_008549.1 | Mm00484780_m1 |
| | | | Man2b2 | mannosidase 2, alpha B2 | 5 B2 | NM_008550.1 | Mm00484796_m1 |
| | | | Man2c1 | mannosidase, alpha, class 2C, member 1 | 9 C | NM_028636.1 | Mm00661170_m1 |
| | | Miscellaneous function | Cmah | cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase | 13 A3.2 | D21826.1 | Mm00456846_m1 |
| | | Neuraminidase | Neu1 | neuraminidase 1 | 17 B1;17 18.93 cM | NM_010893.2 | Mm00456846_m1 |
| | | | Neu2 | neuraminidase 2 | N/A | NM_015750.1 | Mm00479238_m1 |
| | | | Neu3 | neuraminidase 3 | N/A | NM_016720.1 | Mm00479378_m1 |
| | | | Neu4 | sialidase 4 | 1 D | NM_173772.3 | Mm00620597_m1 |
| | | Other hydrolase | Ngly1 | N-glycanase 1 | 14 A2;14 4.0 cM | NM_021504.2 | Mm00451878_m1 |
| | | Phosphodiesterase | Nagpa | N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase | N/A | NM_013796.1 | Mm00660275_m1 |
| | Hydrolase | Galactosaminidase | Naga | N-acetyl galactosaminidase, alpha | 15 E;15 46.0 cM | NM_008669.2 | Mm00476274_m1 |
| Galactosidase | | Galc | galactosylceramidase | 12 E;12 48.0 cM | NM_008079.3 | Mm00484646_m1 | |
| | | Gla | galactosidase, alpha | X E-F1;X 53.0 cM | NM_013463.1 | Mm00516323_m1 | |
| | | Glb1 | galactosidase, beta 1 | 9 F3;9 66.0 cM | NM_009752.1 | Mm00515342_m1 | |
| | | Gusb | glucuronidase, beta | 5 G1.3 | NM_010368.1 | Mm00446953_m1 | |
| | | Glucosaminidase | Naglu | alpha-N-acetylglucosaminidase (Sanfilippo disease IIIB) | 11 D | NM_013792.1 | Mm00479175_m1 |
| Glucosidase | | Gcs1 | glucosidase 1 | 6 D1 | NM_020619.2 | Mm00498596_g1 | |
| | | Chi3l1 | chitinase 3-like 1 | 1 E4;1 72.3 cM | NM_007695.1 | Mm00801477_m1 | |
| | | Hexa | hexosaminidase A | 9 B;9 29.0 cM | NM_010421.3 | Mm00599877_m1 | |
| | | Hexb | hexosaminidase B | 13 D1;13 46.0 cM | NM_010422.1 | Mm00599880_m1 | |
| | | Hpse | heparanase | 5 E4 | NM_152803.3 | Mm00461768_m1 | |
| | | Hyal1 | hyaluronoglucosaminidase 1 | 9 F1-F2;9 60.1 cM | NM_008317.2 | Mm00476206_m1 | |
| | | Hyal2 | hyaluronoglucosaminidase 2 | 9 F1;9 60.0 cM | NM_010489.2 | Mm00477731_m1 | |
| | | Kl | klotho | 5 G3 | NM_013823.1 | Mm00502002_m1 | |
| | | Hydrolase | Gpaa1 | GPI anchor attachment protein 1 | 15 E | NM_010331.2 | Mm00494721_g1 |
| | | Mannosidase | Man1a2 | mannosidase, alpha, class 1A, member 2 | 3 F2.2 | NM_010763.1 | Mm00487564_m1 |
| Man2a2 | | | mannosidase 2, alpha 2 | 7 D2 | NM_172903.1 | Mm00556618_m1 | |
| Man2b1 | | | mannosidase 2, alpha B1 | 8 C2;8 37.0 cM | NM_010764.2 | Mm00487585_m1 | |
| Manba | | | mannosidase, beta A, lysosomal | 3 H2;3 71.2 cM | NM_027288.2 | Mm00466160_m1 | |
| Manea | | | mannosidase, endo-alpha | 4 A3 | NM_172865.2 | Mm00556249_m1 | |

| | | | | | | | |
|-----------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| | Miscellaneous function | Ctbs | chitobiase, di-N-acetyl- | 3 H3 | NM_028836.1 | Mm00547006_m1 | |
| Isomerase | Epimerase/racemase | Tsta3 | tissue specific transplanted antigen P35B | 15 D3;15 47.4 cM | NM_031201.1 | Mm00453191_m1 | |
| | Mutase | Pgm1 | phosphoglucomutase 1 | 5 C3.3;5 38.0 cM | NM_025700.1 | Mm00804141_m1 | |
| | | Pgm2 | phosphoglucomutase 2 | 4 C6;4 45.8 cM | NM_028132.2 | Mm00728285_s1 | |
| Isomerase | Mutase | Pgm3 | phosphoglucomutase 3 | 9 E3.2;9 48.0 cM | NM_028352.2 | Mm00459270_m1 | |
| | | Pmm1 | phosphomannomutase 1 | 15 E1 | NM_013872.1 | Mm00803816_m1 | |
| | | Pmm2 | phosphomannomutase 2 | 16 A1 | NM_016881.1 | Mm00450349_m1 | |
| | Other isomerase | Pdia3 | protein disulfide isomerase associated 3 | 2 E5;2 69.0 cM | NM_007952.2 | Mm00433130_m1 | |
| Kinase | Anion channel | Galk1 | galactokinase 1 | 11 E2;11 78.0 cM | NM_016905.2 | Mm00444182_m1 | |
| | | Gne | glucosamine | 4 B1 | NM_015828.2 | Mm00450174_m1 | |
| | | Nagk | N-acetylglucosamine kinase | 6 D1 | NM_019542.1 | Mm00479878_m1 | |
| Lectin | Antibacterial response protein | Fcna | ficolin A | 2 A3 | NM_007995.2 | Mm00484287_m1 | |
| | Carbohydrate kinase | Itgb3 | integrin beta 3 | 11 E1;11 68.0 cM | NM_016780.1 | Mm00443980_m1 | |
| | Growth factor | Clec11a | C-type lectin domain family 11, member a | 7 B3-B5 | NM_009131.1 | Mm00612354_g1 | |
| | Immunoglobulin | Cd83 | CD83 antigen | 13 A4-5;13 24.0 cM | NM_009856.1 | Mm00486868_m1 | |
| | Immunoglobulin receptor family member | Cd8b1 | CD8 antigen, beta chain 1 | 6 C1;6 30.5 cM | NM_009858.1 | Mm00438116_m1 | |
| | Kinase modulator | Cd22 | CD22 antigen | 7 B1;7 9.0 cM | NM_001043317.1 | Mm00515432_m1 | |
| | | Glycam1 | glycosylation dependent cell adhesion molecule 1 | 15 F3;15 63.0 cM | NM_008134.1 | Mm00801716_m1 | |
| | | Icam2 | intercellular adhesion molecule 2 | 11 E1;11 63.0 cM | NM_010494.1 | Mm00494862_m1 | |
| | | L1cam | L1 cell adhesion molecule | X A6-B;X 29.51 cM | NM_008478.3 | Mm00493049_m1 | |
| | | Mag | myelin-associated glycoprotein | 7 B1 | NM_010758.1 | Mm00487538_m1 | |
| | | Mcam | melanoma cell adhesion molecule | 9 A5.1 | NM_023061.1 | Mm00522397_m1 | |
| | | Ncam1 | neural cell adhesion molecule 1 | 9 A5.3;9 28.0 cM | NM_010875.2 | Mm00456815_m1 | |
| | | Ncam2 | neural cell adhesion molecule 2 | 16 56.0 cM | NM_010954.2 | Mm00448056_m1 | |
| | | Vcam1 | vascular cell adhesion molecule 1 | 3 G1;3 50.8 cM | NM_011693.2 | Mm00449197_m1 | |
| | | Membrane-bound signaling molecule | Siglece | sialic acid binding Ig-like lectin E | 7 B2 | NM_031181.1 | Mm00473131_m1 |
| | | | Siglecf | sialic acid binding Ig-like lectin F | 7 B3 | NM_145581.1 | Mm00523987_m1 |
| | Siglecg | | sialic acid binding Ig-like lectin G | 7 B3 | NM_172900.1 | Mm00556586_m1 | |
| | Miscellaneous function | Itgb1bp1 | integrin beta 1 binding protein 1 | 12 A1.3 | NM_008403.2 | Mm00492707_m1 | |
| | | Itgb1bp2 | integrin beta 1 binding protein 2 | X D | NM_013712.1 | Mm00516450_m1 | |
| | | Itgb8 | integrin beta 8 | 12 F2 | AK029281.1 | Mm00623991_m1 | |
| | Other cell adhesion molecule | Itga11 | integrin, alpha 11 | 9 B | NM_176922.4 | Mm00723741_m1 | |
| | | Itga2 | integrin alpha 2 | 13 D2.2;13 64.0 cM | NM_008396.2 | Mm00434371_m1 | |
| | | Itga2b | integrin alpha 2b | 11 D-E1;11 68.0 cM | NM_010575.1 | Mm00439768_m1 | |
| Itga3 | | integrin alpha 3 | 11 D;11 56.0 cM | NM_013565.2 | Mm00442890_m1 | | |
| Itga4 | | integrin alpha 4 | 2 C3;2 46.0 cM | NM_010576.2 | Mm00439770_m1 | | |
| | | Itga5 | integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha) | 15 F3;15 57.4 cM | NM_010577.2 | Mm00439797_m1 | |

| | | | | | | |
|--------|--------------------------------|---------|---|------------------|----------------|---------------|
| | | Itga6 | integrin alpha 6 | 2 C2;2 38.0 cM | NM_008397.2 | Mm00434375_m1 |
| | | Itga7 | integrin alpha 7 | 10 D3;10 72.0 cM | NM_008398.2 | Mm00434400_m1 |
| | | Itga9 | integrin alpha 9 | 9 F3;9 67.0 cM | NM_133721.1 | Mm00519293_m1 |
| | | Itgal | integrin alpha L | 7 F3;7 60.0 cM | NM_008400.1 | Mm00801807_m1 |
| | | Itgam | integrin alpha M | 7 F4 | NM_008401.1 | Mm00434455_m1 |
| | | Itgax | integrin alpha X | 7 F3 | NM_021334.1 | Mm00498698_m1 |
| | | Pecam1 | platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 | 11 E1 | NM_001032378.1 | Mm00476702_m1 |
| | | Sele | selectin, endothelial cell | 1 H2.2;1 86.6 cM | NM_011345.1 | Mm00441278_m1 |
| | | Sell | selectin, lymphocyte | 1 H2.2;1 86.6 cM | NM_011346.1 | Mm00441291_m1 |
| Lectin | Other cell adhesion molecule | Selp | selectin, platelet | 1 H2.2;1 86.6 cM | NM_011347.1 | Mm00441295_m1 |
| | | Siglec1 | sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin | 2 F-H1;2 73.9 cM | NM_011426.1 | Mm00488332_m1 |
| | Other membrane traffic protein | Lman2 | lectin, mannose-binding 2 | 13 B1 | NM_025828.2 | Mm00482188_m1 |
| | Other receptor | Cd248 | CD248 antigen, endosialin | 19 A | NM_054042.2 | Mm00547485_s1 |
| | | Clec1b | C-type lectin domain family 1, member b | 6 F3 | NM_019985.2 | Mm00490925_m1 |
| | | Clec2d | C-type lectin domain family 2, member d | 6 F3 | NM_053109.1 | Mm00474134_m1 |
| | | Clec2e | C-type lectin domain family 2, member e | 6 F3 | NM_153506.2 | Mm00663447_m1 |
| | | Clec2g | C-type lectin domain family 2, member g | 6 F3 | NM_027562.1 | Mm00471984_m1 |
| | | Clec2h | C-type lectin domain family 2, member h | 6 F3 | NM_053165.2 | Mm00662955_m1 |
| | | Clec2i | C-type lectin domain family 2, member i | 6 F3 | NM_020257.1 | Mm00777071_g1 |
| | | Clec4a2 | C-type lectin domain family 4, member a2 | 6 F3;6 54.0 cM | NM_011999.2 | Mm00488795_m1 |
| | | Clec4b1 | C-type lectin domain family 4, member b1 | 6 F2 | NM_027218.1 | Mm00651312_m1 |
| | | Clec4d | C-type lectin domain family 4, member d | 6 F3;6 56.5 cM | NM_010819.2 | Mm00501738_m1 |
| | | Clec4e | C-type lectin domain family 4, member e | 6 F3;6 59.6 cM | NM_019948.1 | Mm00490873_m1 |
| | | Clec4n | C-type lectin domain family 4, member n | 6 F3;6 55.0 cM | NM_020001.1 | Mm00490931_m1 |
| | | Clec5a | C-type lectin domain family 5, member a | 6 B2 | NM_021364.2 | Mm00517524_m1 |
| | | Clec7a | C-type lectin domain family 7, member a | N/A | NM_020008.1 | Mm00490960_m1 |
| | | Klra10 | killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 10 | 6 F3;6 62.7 cM | NM_008459.2 | Mm00841907_m1 |
| | | Klra2 | killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2 | 6 F3;6 63.14 cM | NM_008462.3 | Mm00434675_m1 |
| | | Klra5 | killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 5 | 6 F3;6 62.62 cM | NM_008463.1 | Mm00656828_m1 |
| | | Klra6 | killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 6 | 6 F3;6 62.68 cM | NM_008464.1 | Mm00776306_mH |
| | | Klrb1a | killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1A | 6 F3;6 62.1 cM | NM_010737.2 | Mm00726548_s1 |
| | | Klrb1c | killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C | 6 F3;6 62.1 cM | NM_008527.1 | Mm00824341_m1 |
| | | Klrc1 | killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1 | 6 G1-2 | NM_010652.1 | Mm00516111_m1 |
| | | Klrc2 | killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2 | 6 F3 | NM_010653.1 | Mm00839765_g1 |
| | | Klrc3 | killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3 | 6 F3 | NM_021378.1 | Mm00650941_m1 |
| | | Klrd1 | killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1 | 6 F3;6 62.52 cM | NM_010654.1 | Mm00495182_m1 |
| | | Klre1 | killer cell lectin-like receptor family E member 1 | 6 F3 | NM_153590.2 | Mm00769480_m1 |
| | | Klrg1 | killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1 | 6 F1;6 59.2 cM | NM_016970.1 | Mm00516879_m1 |
| | | Klrk1 | killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 | 6 F3;6 62.53 cM | NM_033078.2 | Mm00473603_m1 |

| | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|---------------|---|--------------------|----------------|---------------|
| | | Lgals3bp | lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein | 11 E | NM_011150.1 | Mm00478303_m1 |
| | | Mgl1 | macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1 | 11 B3;11 37.0 cM | NM_010796.1 | Mm00546124_m1 |
| | | Mgl2 | macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2 | 11 B3 | NM_145137.1 | Mm00460844_m1 |
| | Other select calcium binding proteins | Calr | calreticulin | 8 C3;8 37.0 cM | NM_007591.2 | Mm00482936_m1 |
| | | Calr3 | calreticulin 3 | 8 C1 | NM_028500.1 | Mm00511716_m1 |
| | | Canx | calnexin | 11 B1.3;11 30.0 cM | NM_007597.2 | Mm00500330_m1 |
| | | Clgn | calmegin | 8 C2;8 38.0 cM | NM_009904.2 | Mm00515517_m1 |
| | Other signaling molecule | Lgals1 | lectin, galactose binding, soluble 1 | 15 E;15 44.9 cM | NM_008495.2 | Mm00839408_g1 |
| | | Lgals12 | lectin, galactose binding, soluble 12 | 19 A | NM_019516.2 | Mm00497902_m1 |
| | | Lgals2 | lectin, galactose-binding, soluble 2 | 15 E1 | NM_025622.1 | Mm00840285_m1 |
| | | Lgals3 | lectin, galactose binding, soluble 3 | 14 C1 | NM_010705.1 | Mm00802901_m1 |
| | | Lgals7 | lectin, galactose binding, soluble 7 | 7 A3 | NM_008496.4 | Mm00456135_m1 |
| Lectin | Other signaling molecule | Lgals8 | lectin, galactose binding, soluble 8 | 13 A1;13 8.0 cM | NM_018886.2 | Mm00497776_m1 |
| | | Lgals9 | lectin, galactose binding, soluble 9 | 11 B5 | NM_010708.1 | Mm00495295_m1 |
| | Protein kinase | Clec3b | C-type lectin domain family 3, member b | 9 F1-F3;9 71.0 cM | NM_011606.1 | Mm00495657_m1 |
| | Select regulatory molecule | Itgbl1 | integrin, beta-like 1 | 14 E5 | NM_145467.1 | Mm00520942_m1 |
| | Serine protease | Masp1 | mannan-binding lectin serine peptidase 1 | 16 B2-B3 | NM_008555.1 | Mm00434830_m1 |
| | | Masp2 | mannan-binding lectin serine peptidase 2 | 4 E1 | NM_001003893.2 | Mm00521963_m1 |
| | Translation factor | Itgb4bp | integrin beta 4 binding protein | 2 H1 | NM_010579.1 | Mm00550245_m1 |
| Lyase | Dehydratase | Gmgs | GDP-mannose 4, 6-dehydratase | 13 A3.2 | NM_146041.1 | Mm00461343_m1 |
| Membrane traffic protein | Other membrane traffic protein | Wdfy3 | WD repeat and FYVE domain containing 3 | 5 E5;5 54.0 cM | NM_172882.2 | Mm00556380_m1 |
| Molecular function unclassified | Miscellaneous function | 2010209O12Rik | RIKEN cDNA 2010209O12 gene | 5 A3 | BC047275.1 | Mm00659795_m1 |
| | | 3110023E09Rik | RIKEN cDNA 3110023E09 gene | 7 F5 | NM_026522.2 | Mm00471522_m1 |
| | | Ath11 | ATH1, acid trehalase-like 1 (yeast) | 7 F5 | NM_145387.2 | Mm00520360_m1 |
| | | Bclp2 | chitinase like protein 2 | 3 F2.2 | AB081756.1 | Mm00464336_m1 |
| | | Cplx3 | complexin 3 | 9 B | NM_146223.2 | Mm00461513_m1 |
| | | Dad1 | defender against cell death 1 | 14 C2;14 24.0 cM | U83628.1 | Mm00515629_m1 |
| | | Fuk | fucokinase | 8 E1 | NM_181666.1 | Mm00552206_m1 |
| | | Mpdu1 | mannose-P-dolichol utilization defect 1 | 11 B3;11 39.0 cM | NM_011900.2 | Mm00839971_m1 |
| | | Pign | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class N | 1 D | NM_013784.1 | Mm00449904_m1 |
| | | Pigo | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O | 4 B1 | NM_020035.1 | Mm00480317_m1 |
| | | Pigt | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T | 2 H3 | NM_133779.1 | Mm00460162_m1 |
| | | Rft1 | RFT1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | 14 A3 | NM_177815.3 | Mm00625517_m1 |
| Oxidoreductase | Dehydrogenase | Ugdh | UDP-glucose dehydrogenase | 5 C3.1;5 38.0 cM | NM_009466.2 | Mm00447643_m1 |
| Phosphatase | Homeotic transcription factor | G6pc | glucose-6-phosphatase, catalytic | 11 D | NM_008061.2 | Mm00839363_m1 |
| Protease | Serine protease | Ppgb | protective protein for beta-galactosidase | 2 H3;2 96.0 cM | NM_001038492.1 | Mm00447201_m1 |
| | Other receptor | Asgr1 | asialoglycoprotein receptor 1 | 11 B3;11 37.0 cM | NM_009714.1 | Mm00437595_m1 |

| | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|----------|--|---------------------|----------------|---------------|
| | | Asgr2 | asialoglycoprotein receptor 2 | 11 B3;11 37.0 cM | NM_007493.2 | Mm00431863_m1 |
| | | Cd207 | CD 207 antigen | 6 D1-D2 | NM_144943.2 | Mm00523545_m1 |
| | | Itgb2 | integrin beta 2 | 10 C1;10 41.5 cM | NM_008404.2 | Mm00434513_m1 |
| | | Itgb2l | integrin beta 2-like | 16 C4 | NM_008405.1 | Mm00492710_m1 |
| | | Mfi2 | antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5 | 16 B3 | NM_013900.1 | Mm00600237_m1 |
| | | Mrc2 | mannose receptor, C type 2 | 11 E1 | NM_008626.2 | Mm00485184_m1 |
| | | Olr1 | oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1 | 6 F3 | NM_138648.1 | Mm00454586_m1 |
| | | Thbd | thrombomodulin | 2 G3;2 84.0 cM | NM_009378.1 | Mm00437014_s1 |
| | Receptor | Dgcr2 | DiGeorge syndrome critical region gene 2 | 16 A-B1;16 10.37 cM | NM_010048.2 | Mm00438417_m1 |
| | | Itgb5 | integrin beta 5 | 16 B3 | NM_010580.1 | Mm00439825_m1 |
| | | Itgb7 | integrin beta 7 | 15 F3;15 61.1 cM | NM_013566.1 | Mm00442916_m1 |
| Control | Actin cytoskeletal protein | Actb | actin, beta, cytoplasmic | 5 G2;5 80.0 cM | NM_007393.1 | Mm00607939_s1 |
| | Basal transcription factor | Tbp | TATA box binding protein | 17 A2;17 8.25 cM | NM_013684.2 | Mm00446973_m1 |
| | | Tcea1 | transcription elongation factor A (SII) 1 | 1 A1 | NM_011541.3 | Mm00815387_s1 |
| | Dehydrogenase | G6pdx | glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked | X A2-A3;X 30.02 cM | NM_008062.2 | Mm00656735_g1 |
| | | Gapdh | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 6 C | NM_001001303.1 | Mm99999915_g1 |
| Reference | Molecular function unclassified | 18S | Eukaryotic 18S rRNA | N/A | N/A | Hs99999901_s1 |
| Select calcium binding protein | Chaperonin | Prkcsh | protein kinase C substrate 80K-H | 9 A3;9 6.0 cM | NM_008925.1 | Mm00447244_m1 |
| Select regulatory molecule | Dna glycosylase | Renbp | renin binding protein | X A7.3;X 29.53 cM | NM_023132.2 | Mm00491720_m1 |
| | G-protein modulator | Cd47 | CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer) | 16 B5 | NM_010581.3 | Mm00495005_m1 |
| Signaling molecule | Membrane-bound signaling molecule | Cd33 | CD33 antigen | 7 B3;7 23.0 cM | NM_021293.1 | Mm00491152_m1 |
| | Other signaling molecule | Atrn | attractin | 2 F1;2 73.9 cM | NM_009730.2 | Mm00437746_m1 |
| | | Glg1 | golgi apparatus protein 1 | 8 E1;8 53.5 cM | NM_009149.1 | Mm00486029_m1 |
| Sulfotransferase | Miscellaneous function | Hs6st2 | heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 | X A3.3 | AB024565.1 | Mm00479296_m1 |
| Synthase and synthetase | Synthase | Has1 | hyaluronan synthase1 | 17 A3.2;17 10.0 cM | NM_008215.1 | Mm00468496_m1 |
| | | Has2 | hyaluronan synthase 2 | 15 D1;15 31.2 cM | NM_008216.2 | Mm00515089_m1 |
| | | Has3 | hyaluronan synthase 3 | 8 D3;8 53.3 cM | NM_008217.2 | Mm00515091_m1 |
| | | Nans | N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase) | 4 B2 | NM_053179.2 | Mm00474697_m1 |
| Transferase | Acetyltransferase | Gnpnat1 | glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 | 14 C1 | NM_019425.1 | Mm00834602_mH |
| | Cadherin | Hs3st3a1 | heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1 | 11 B3;11 33.0 cM | NM_178870.2 | Mm00780907_s1 |
| | | Hs3st3b1 | heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1 | 11 B3;11 33.0 cM | NM_018805.2 | Mm00479621_m1 |
| | | Ndst1 | N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1 | 18 D2 | NM_008306.2 | Mm00447005_m1 |
| | | Ndst2 | N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 2 | 14 B | NM_010811.2 | Mm00447818_m1 |
| | | Ndst3 | N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3 | 3 G3 | NM_031186.2 | Mm00453178_m1 |
| | | Ndst4 | N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparin glucosaminyl) 4 | N/A | NM_022565.1 | Mm00480767_m1 |

| | | | | | | |
|-------------|---------------------|---------------|--|--------------------|-------------|---------------|
| | Glycosyltransferase | 4732435N03Rik | RIKEN cDNA 4732435N03 gene | 8 B3.3 | NM_172753.3 | Mm00555164_m1 |
| | | 4930431L04Rik | RIKEN cDNA 4930431L04 gene | 8 B3.1 | NM_175032.1 | Mm00723493_m1 |
| | | 4933434I20Rik | RIKEN cDNA 4933434I20 gene | 8 C2 | NM_026233.1 | Mm00470889_m1 |
| | Abo | | ABO blood group (transferase A, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase, transferase B, alpha 1-3-galactosyltransferase) | 2 A3 | NM_030718.2 | Mm00472868_m1 |
| | Alg1 | | asparagine-linked glycosylation 1 homolog (yeast, beta-1,4-mannosyltransferase) | 16 A1 | NM_145362.1 | Mm00520253_m1 |
| | Alg11 | | asparagine-linked glycosylation 11 homolog (yeast, alpha-1,2-mannosyltransferase) | 8 A2 | NM_183142.1 | Mm00805803_m1 |
| | Alg12 | | asparagine-linked glycosylation 12 homolog (yeast, alpha-1,6-mannosyltransferase) | 15 E3 | NM_145477.1 | Mm00461062_m1 |
| | Alg2 | | asparagine-linked glycosylation 2 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase) | 4 B2 | NM_019998.2 | Mm00480245_m1 |
| | Alg5 | | asparagine-linked glycosylation 5 homolog (yeast, dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase) | 3 D | NM_025442.1 | Mm00508324_m1 |
| | Art2b | | ADP-ribosyltransferase 2b | 7 E2;7 49.0 cM | NM_019915.2 | Mm00840153_m1 |
| | Art4 | | ADP-ribosyltransferase 4 | 6 G1;6 66.5 cM | NM_026639.1 | Mm00466071_m1 |
| | B3galnt1 | | UDP-GalNAc:betaGlcNAc beta 1,3-galactosaminyltransferase, polypeptide 1 | 3 E1 | NM_020026.2 | Mm00480272_s1 |
| | B3galt1 | | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1 | 2 C3 | NM_020283.2 | Mm00480352_s1 |
| | B3galt2 | | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 | 1 F | NM_020025.2 | Mm00480271_s1 |
| | B3galt4 | | UDP-Gal:betaGalNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4 | 17 B1 | NM_019420.1 | Mm00546324_s1 |
| | B3galt5 | | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5 | 16 C4 | NM_033149 | Mm00473621_s1 |
| Transferase | Glycosyltransferase | B3galt6 | UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6 | N/A | NM_080445.2 | Mm00504458_s1 |
| | | B3gat1 | beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P) | 9 A4 | NM_029792.1 | Mm00661499_m1 |
| | | B3gat2 | beta-1,3-glucuronyltransferase 2 (glucuronosyltransferase S) | 1 A4-B | NM_172124.2 | Mm00549042_m1 |
| | | B3gat3 | beta-1,3-glucuronyltransferase 3 (glucuronosyltransferase I) | 19 A | NM_024256.2 | Mm00470389_m1 |
| | | B3gnt1 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 | 19 A | NM_175383.2 | Mm00723578_m1 |
| | | B3gnt2 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 | 11 A3.2;11 12.0 cM | NM_016888.4 | Mm00479497_s1 |
| | | B3gnt3 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3 | 8 C1 | NM_028189.2 | Mm00472247_g1 |
| | | B3gnt7 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7 | 1 C5-D | NM_145222.1 | Mm00507533_m1 |
| | | B4galnt1 | beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1 | 10 D3;10 69.25 cM | NM_008080.3 | Mm00484653_m1 |
| | | B4galnt2 | beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2 | 11 D;11 55.7 cM | NM_008081.1 | Mm00484661_m1 |
| | | B4galt1 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 | 4 A5;4 18.6 cM | NM_022305.2 | Mm00480752_m1 |
| | | B4galt2 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2 | 4 D1 | NM_017377.4 | Mm00479556_m1 |
| | | B4galt3 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 3 | 1 H3;1 92.6 cM | NM_020579.1 | Mm00480426_m1 |
| | | B4galt4 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4 | 16 B4 | NM_019804.1 | Mm00480087_m1 |
| | | B4galt5 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5 | 2 H3 | NM_019835.1 | Mm00480147_m1 |
| | | B4galt6 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6 | 18 A2 | NM_019737.1 | Mm00480045_m1 |
| | | B4galt7 | xylosylprotein beta1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I) | 13 B1 | NM_146045.1 | Mm00461357_m1 |

| | | | | | | |
|-------------|---------------------|-----------|---|------------------|-------------|---------------|
| | | C1galt1 | core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 1,3-galactosyltransferase | 6 A1 | NM_052993.2 | Mm00473986_m1 |
| | | C1galt1c1 | C1GALT1-specific chaperone 1 | X A2 | NM_021550.2 | Mm00480676_m1 |
| | | C76566 | expressed sequence C76566 | 8 D3 | NM_178879.3 | Mm00619054_s1 |
| | | Ddost | dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase | 4 D3 | NM_007838.2 | Mm00492100_m1 |
| | | Dpagt1 | dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase) | 9 A5.2 | NM_007875.2 | Mm00492236_m1 |
| | | Dpm2 | dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 2 | 2 B | NM_010073.2 | Mm00494529_m1 |
| | | Ext1 | exostoses (multiple) 1 | 15 C;15 26.55 cM | NM_010162.2 | Mm00468769_m1 |
| | | Ext2 | exostoses (multiple) 2 | 2 E1;2 51.0 cM | NM_010163.1 | Mm00468775_m1 |
| | | Extl1 | exostoses (multiple)-like 1 | 4 D3;4 60.0 cM | NM_019578.1 | Mm00517158_m1 |
| | | Extl2 | exostoses (multiple)-like 2 | 3 G1 | NM_021388.2 | Mm00469621_m1 |
| | | Extl3 | exostoses (multiple)-like 3 | 14 D1 | NM_018788.2 | Mm00516994_m1 |
| | | Fut1 | fucosyltransferase 1 | 7 B3;7 23.2 cM | NM_008051.3 | Mm00484518_s1 |
| | | Fut2 | fucosyltransferase 2 | 7 B3;7 23.2 cM | NM_018876.2 | Mm00490152_s1 |
| | | Fut4 | fucosyltransferase 4 | 9 A2;9 3.0 cM | NM_010242.2 | Mm00487448_s1 |
| | | Fut8 | fucosyltransferase 8 | 12 C3 | NM_016893.2 | Mm00489789_m1 |
| | | Galnact2 | chondroitin sulfate GalNAcT-2 | 6 F1 | NM_030165.3 | Mm00513340_m1 |
| | | Galnt1 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 | 18 B1 | NM_013814.2 | Mm00489148_m1 |
| | | Galnt10 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10 | 11 B1.3 | NM_134189.2 | Mm00506628_m1 |
| | | Galnt11 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 | 5 A3 | NM_144908.1 | Mm00520058_m1 |
| | | Galnt12 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 | 4 B1 | NM_172693.2 | Mm00554567_m1 |
| | | Galnt13 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 | 2 C1.1 | NM_173030.2 | Mm00557266_m1 |
| Transferase | Glycosyltransferase | Galnt2 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 | 8 E2 | NM_139272.2 | Mm00519810_m1 |
| | | Galnt3 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 | 2 C3 | NM_015736.1 | Mm00489348_m1 |
| | | Galnt4 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 | 10 C3 | NM_015737.3 | Mm00489357_s1 |
| | | Galnt5 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 | 2 C1.1 | NM_172855.1 | Mm00556158_m1 |
| | | Galnt6 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 | 15 F3 | NM_172451.1 | Mm00552578_m1 |
| | | Galnt7 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 | 8 B3.2 | NM_144731.2 | Mm00519998_m1 |
| | | Galntl5 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 5 | 5 A3 | NM_026449.1 | Mm00471398_m1 |
| | | Gbgt1 | globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 | 2 A3 | NM_139197.1 | Mm00507367_m1 |

| | | | | | | |
|-------------|---------------------|--|---|------------------|---------------|---------------|
| | Gcnt2 | glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, l-branching enzyme | 13 A5;13 17.0 cM | NM_023887.3 | Mm00727680_s1 | |
| | Gcnt3 | glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type | 9 D | NM_028087.1 | Mm00511233_m1 | |
| | Ggta1 | glycoprotein galactosyltransferase alpha 1, 3 | 2 B;2 25.0 cM | NM_010283.1 | Mm00494600_m1 | |
| | Glt8d1 | glycosyltransferase 8 domain containing 1 | 14 B | NM_029626.1 | Mm00512950_m1 | |
| | Gyltl1b | glycosyltransferase-like 1B | 2 E1 | NM_172670.1 | Mm00554376_m1 | |
| | Large | like-glycosyltransferase | 8 C1;8 34.0 cM | NM_010687.1 | Mm00521885_m1 | |
| | Mgat2 | mannoside acetylglucosaminyltransferase 2 | 12 C2 | NM_146035.1 | Mm00524700_s1 | |
| | Mgat3 | mannoside acetylglucosaminyltransferase 3 | 15 E;15 46.2 cM | NM_010795.3 | Mm00447798_s1 | |
| | Mgat4a | mannoside acetylglucosaminyltransferase 4, isoenzyme A | 1 B | NM_173870.1 | Mm00723369_m1 | |
| | Mgat4b | mannoside acetylglucosaminyltransferase 4, isoenzyme B | 11 B1.3 | NM_145926.2 | Mm00521482_m1 | |
| | Mgat4c | mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative) | 10 D1 | NM_026243.2 | Mm00470905_m1 | |
| | Mgat5b | mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B | 11 E2 | NM_172948.3 | Mm00556891_m1 | |
| | Ogt | O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) | X D | NM_139144.2 | Mm00507317_m1 | |
| | Parp1 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 | 1 H5;1 98.6 cM | NM_007415.2 | Mm00500154_m1 | |
| | Parp2 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 2 | 14 C1;14 19.5 cM | NM_009632.2 | Mm00456462_m1 | |
| | Parp3 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3 | 9 F1 | NM_145619.2 | Mm00467486_m1 | |
| | Pigb | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class B | 9 D | NM_018889.1 | Mm00450809_m1 | |
| | Pigc | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class C | 1 H2.1 | NM_026078.2 | Mm00546525_m1 | |
| | Pigf | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F | 17 E4-E5;17 54.3 cM | NM_008838.1 | Mm00447031_m1 | |
| | Pigm | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M | 1 H3;1 94.0 cM | NM_026234.2 | Mm00452712_s1 | |
| | Pigq | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q | 17 B | NM_011822.2 | Mm00457172_m1 | |
| | Pomgnt1 | protein O-linked mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase | 4 C7 | NM_026651.1 | Mm00509812_m1 | |
| | Pomt1 | protein-O-mannosyltransferase 1 | 2 B | NM_145145.1 | Mm00520170_m1 | |
| | Pomt2 | protein-O-mannosyltransferase 2 | 12 D2 | NM_153415.2 | Mm00463075_m1 | |
| | Rpn1 | ribophorin I | 6 D1;6 38.0 cM | NM_133933.2 | Mm00505837_m1 | |
| | Rpn2 | ribophorin II | 2 H1;2 91.0 cM | NM_019642.3 | Mm00451018_m1 | |
| | Sec1 | secretory blood group 1 | 7 B3;7 23.2 cM | NM_019934.1 | Mm00457789_s1 | |
| | St3gal1 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1 | 15 D2 | NM_009177.3 | Mm00501493_m1 | |
| | St3gal2 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2 | 8 E1 | NM_178048.2 | Mm00486123_m1 | |
| | St3gal3 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3 | 4 D1 | NM_009176.2 | Mm00493353_m1 | |
| Transferase | Glycosyltransferase | St3gal4 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4 | 9 A5.3 | NM_009178.2 | Mm00501503_m1 |
| | | St3gal5 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5 | 6 C3 | NM_011375.2 | Mm00488232_m1 |
| | | St3gal6 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 | 16 C1.2 | NM_018784.1 | Mm00450665_m1 |
| | | St6gal1 | beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1 | 16 B1;16 15.5 cM | NM_145933.3 | Mm00486119_m1 |
| | | St6gal2 | beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 2 | 17 C | NM_172829.1 | Mm00555908_m1 |
| | | St6galnac1 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1 | 11 E2 | NM_011371.1 | Mm00488218_m1 |
| | | St6galnac2 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2 | 11 E2 | NM_009180.2 | Mm00486130_m1 |

| | | | | | | |
|------------------------|------------------------|---|---|----------------|---------------|---------------|
| | St6galnac3 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3 | 3 H4 | NM_011372.1 | Mm00488223_m1 | |
| | St6galnac4 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4 | 2 B | NM_011373.2 | Mm00488228_m1 | |
| | St6galnac5 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5 | 3 H3 | NM_012028.2 | Mm00488855_m1 | |
| | St6galnac6 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6 | 2 B | NM_001025311.1 | Mm00489927_m1 | |
| | St8sia1 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1 | 6 G3;6 60.0 cM | NM_011374.2 | Mm00456915_m1 | |
| | St8sia2 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 | 7 D1 | NM_009181.1 | Mm00456289_m1 | |
| | St8sia3 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3 | 18 E1 | NM_009182.2 | Mm00456295_m1 | |
| | St8sia4 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4 | 1 D | NM_009183.1 | Mm00456300_m1 | |
| | St8sia5 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5 | 18 E3 | NM_153124.1 | Mm00457285_m1 | |
| | St8sia6 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6 | 2 A1 | NM_145838.1 | Mm00461200_m1 | |
| | Stt3a | STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A (S. cerevisiae) | 9 A4;9 20.0 cM | NM_008408.2 | Mm00492725_m1 | |
| | Ugcg | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase | 4 B3;4 32.0 cM | NM_011673.2 | Mm00495925_m1 | |
| | Ugt2a1;Ugt2a2 | UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1;UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A2 | 5 E1 | NM_053184.1 | Mm00650630_m1 | |
| | Ugt2a3 | UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A3 | 5 E2 | NM_028094.1 | Mm00472170_m1 | |
| | Ugt2b1 | UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1 | 5 E1 | NM_152811.1 | Mm00514184_m1 | |
| | Ugt2b34 | UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34 | 5 E1 | NM_153598.1 | Mm00655373_m1 | |
| | Ugt3a2 | UDP glycosyltransferases 3 family, polypeptide A2 | 15 A1 | NM_144845.2 | Mm00522913_m1 | |
| | Ugt8a | UDP galactosyltransferase 8A | 3 E3-F1 | NM_011674.3 | Mm00495930_m1 | |
| | Wbscr17 | Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 homolog (human) | 5 G2 | NM_145218.3 | Mm00507480_m1 | |
| | Xylt1 | xylosyltransferase 1 | 7 F1 | NM_175645.2 | Mm00558690_m1 | |
| | Xylt2 | xylosyltransferase II | 11 D | NM_145828.1 | Mm00461181_m1 | |
| Miscellaneous function | Alg3 | asparagine-linked glycosylation 3 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase) | 16 A3;16 14.0 cM | NM_145939.1 | Mm00524089_m1 | |
| | Alg6 | asparagine-linked glycosylation 6 homolog (yeast, alpha-1,3,-glucosyltransferase) | 4 C6 | BC080867.1 | Mm00618877_m1 | |
| | Alg9 | asparagine-linked glycosylation 9 homolog (yeast, alpha 1,2 mannosyltransferase) | 9 A5.3 | NM_133981.1 | Mm00513609_m1 | |
| | Art1 | ADP-ribosyltransferase 1 | 7 E2;7 50.0 cM | AK009902.1 | Mm00507844_m1 | |
| | B3gnt5 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 | 16 B1 | AY029203.1 | Mm00475226_m1 | |
| | Fut10 | fucosyltransferase 10 | 8 A3 | NM_001012517.2 | Mm00804889_m1 | |
| | Galnt1 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1 | 12 D1 | AB045325.1 | Mm00506257_m1 | |
| | Mgat5 | mannoside acetylglucosaminyltransferase 5 | 1 E3 | AF474155.1 | Mm00455024_m1 | |
| Transferase | Miscellaneous function | Pofut1 | protein O-fucosyltransferase 1 | 2 H2 | NM_080463.3 | Mm00475567_m1 |
| | | Pofut2 | protein O-fucosyltransferase 2 | 10 C1 | NM_030262.3 | Mm00518821_m1 |
| | | Stt3b | STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (S. cerevisiae) | 9 F3 | BC013054.1 | Mm00458503_m1 |

| | | | | | |
|--------------------------|--------------|---|--------------------|-------------|---------------|
| | Ugcgl2 | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2 | 14 E4 | AK033708.1 | Mm00481578_m1 |
| Nucleotidyltransferase | Amigo3;Gmppb | adhesion molecule with Ig like domain 3;GDP-mannose pyrophosphorylase B | 9 F2 | NM_177910.3 | Mm00626032_g1 |
| | Cmas | cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid synthetase | 6 G3;6 74.0 cM | NM_009908.1 | Mm00515534_m1 |
| | Galt | galactose-1-phosphate uridyl transferase | 4 A5;4 19.9 cM | NM_016658.1 | Mm00489459_g1 |
| | Gmppa | GDP-mannose pyrophosphorylase A | 1 C3 | NM_133708.1 | Mm00505084_m1 |
| | Uap1 | UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 | 1 H3 | NM_133806.2 | Mm00769477_m1 |
| | Ugp2 | UDP-glucose pyrophosphorylase 2 | 11 A3.1;11 12.0 cM | NM_139297.2 | Mm00454826_m1 |
| Other signaling molecule | Lfng | lunatic fringe gene homolog (Drosophila) | 5 G2;5 80.0 cM | NM_008494.2 | Mm00456128_m1 |
| | Mfng | manic fringe homolog (Drosophila) | 15 E1;15 44.8 cM | NM_008595.1 | Mm00434941_m1 |
| | Rfng | radical fringe gene homolog (Drosophila) | 11 E2;11 75.0 cM | NM_009053.2 | Mm00485703_m1 |
| Other transferase | Chst1 | carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1 | N/A | NM_023850.1 | Mm00517855_m1 |
| | Chst10 | carbohydrate sulfotransferase 10 | 1 B | NM_145142.2 | Mm00460868_m1 |
| | Chst11 | carbohydrate sulfotransferase 11 | 10 C1 | NM_021439.2 | Mm00517563_m1 |
| | Chst12 | carbohydrate sulfotransferase 12 | 5 G2 | NM_021528.2 | Mm00546416_s1 |
| | Chst2 | carbohydrate sulfotransferase 2 | N/A | NM_018763.1 | Mm00490018_g1 |
| | Chst3 | carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 3 | 10 B4 | NM_016803.2 | Mm00489736_m1 |
| | Chst4 | carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 4 | N/A | NM_011998.3 | Mm00488783_s1 |
| | Chst5 | carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5 | N/A | NM_019950.2 | Mm00517342_m1 |
| | Chst7 | carbohydrate (N-acetylglucosamine) sulfotransferase 7 | X A3.1-A3.2 | NM_021715.1 | Mm00491466_m1 |
| | Chst8 | carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8 | 7 B3-B5 | NM_175140.3 | Mm00558321_m1 |
| | D4st1 | dermatan 4 sulfotransferase 1 | 2 E5 | NM_028117.2 | Mm00511291_s1 |
| | Hs2st1 | heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1 | 3 H2 | NM_011828.2 | Mm00478684_m1 |
| | Hs6st3 | heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3 | 14 E4 | NM_015820.1 | Mm00479297_m1 |
| | Ust | uronyl-2-sulfotransferase | 10 A1 | NM_177387.3 | Mm00616790_m1 |
| Transferase | Dpm1 | dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1 | 2 H3 | NM_010072.2 | Mm00494520_m1 |
| | Gal3st1 | galactose-3-O-sulfotransferase 1 | 11 A1 | NM_016922.2 | Mm00516830_m1 |
| | Pigk | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K | 3 H4 | NM_025662.4 | Mm00712364_m1 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kascsak, R., Rubenstein, R. and 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. and Bremer, J.(2008)."The prion's elusive reason for being".*Annu Rev Neurosci* **31**(439-77
- Aguzzi, A. and Polymenidou, M.(2004)."Mammalian prion biology: one century of evolving concepts".*Cell* **116**(2):313-27
- Aguzzi, A. and Sigurdson, C.J.(2004)."Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate?".*Nat Rev Immunol* **4**(9):725-36
- Akama, T.O., Misra, A.K., Hindsgaul, O. and Fukuda, M.N.(2002)."Enzymatic synthesis in vitro of the disulfated disaccharide unit of corneal keratan sulfate".*J Biol Chem* **277**(45):42505-13
- Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T. and Clausen, H.(1999)."Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions".*Biochim Biophys Acta* **1473**(1):35-53
- Americo, T.A., Chiarini, L.B. and Linden, R.(2007)."Signaling induced by hop/STI-1 depends on endocytosis".*Biochem Biophys Res Commun* **358**(2):620-5
- Ancsin, J.B.(2003)."Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit".*Amyloid* **10**(2):67-79
- Ancsin, J.B. and Kisilevsky, R.(1999)."The heparin/heparan sulfate-binding site on aposerum amyloid A. Implications for the therapeutic intervention of amyloidosis".*J Biol Chem* **274**(11):7172-81
- Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R. and Wells, G.A.(1996)."Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle".*Nature* **382**(6594):779-88
- Andreoletti, O., Simon, S., Lacroux, C., Morel, N., Tabouret, G., Chabert, A., Lukan, S., Corbiere, F., Ferre, P., Foucras, G., Laude, H., Eychenne, F., Grassi, J. and Schelcher, F.(2004)."PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie".*Nat Med* **10**(6):591-3
- Angata, K., Suzuki, M., McAuliffe, J., Ding, Y., Hindsgaul, O. and Fukuda, M.(2000)."Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III".*J Biol Chem* **275**(24):18594-601
- Aono, S. and Oohira, A.(2006)."Chondroitin sulfate proteoglycans in the brain".*Adv Pharmacol* **53**(323-36
- Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J.L. and Laude, H.(2004)."Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection".*J Virol* **78**(1):482-90
- Arjona, A., Simarro, L., Islinger, F., Nishida, N. and Manuelidis, L.(2004)."Two Creutzfeldt-Jakob disease agents reproduce prion protein-independent identities in cell cultures".*Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23):8768-73
- 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. and 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):6358-66
- Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G.P., Meeker, H.C., Kascsak, R., Carp, R.I. and Wisniewski, T.(2001)."Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie".*J Clin Invest* **108**(5):703-8

Azzalin, A., Ferrara, V., Arias, A., Cerri, S., Avella, D., Pisu, M.B., Nano, R., Bernocchi, G., Ferretti, L. and Comincini, S.(2006)."Interaction between the cellular prion (PrP^C) and the 2P domain K⁺ channel TREK-1 protein".*Biochem Biophys Res Commun* **346**(1):108-15

B

Bachy, V. and Aucouturier, P.(2010)."[Prion diseases: what is the role of dendritic cells in the pathogenesis of transmissible prion diseases?]" .*Med Sci (Paris)* **26**(6-7):615-20

Baenziger, J.U. and Green, E.D.(1988)."Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin".*Biochim Biophys Acta* **947**(2):287-306

Bailly, Y., Haeberle, A.M., Blanquet-Grossard, F., Chasserot-Golaz, S., Grant, N., Schulze, T., Bombarde, G., Grassi, J., Cesbron, J.Y. and Lemaire-Vieille, C.(2004)."Prion protein (PrP^C) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain".*J Comp Neurol* **473**(2):244-69

Bakker, H., Friedmann, I., Oka, S., Kawasaki, T., Nifant'ev, N., Schachner, M. and Mantei, N.(1997)."Expression cloning of a cDNA encoding a sulfotransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope".*J Biol Chem* **272**(47):29942-6

Barducci, A., Chelli, R., Procacci, P. and Schettino, V.(2005)."Misfolding pathways of the prion protein probed by molecular dynamics simulations".*Biophys J* **88**(2):1334-43

Barmada, S., Piccardo, P., Yamaguchi, K., Ghetti, B. and Harris, D.A.(2004)."GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice".*Neurobiol Dis* **16**(3):527-37

Barnewitz, K., Maringer, M., Mitteregger, G., Giese, A., Bertsch, U. and Kretzschmar, H.A.(2006)."Unaltered prion protein cleavage in plasminogen-deficient mice".*Neuroreport* **17**(5):527-30

Baron, G.S., Wehrly, K., Dorward, D.W., Chesebro, B. and 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):1031-40

Barrairon, E.(1990)."J. Cuillé et P-L Chelle "invente" dans les années trente la notion de maladies à évolution lente.". *Revue de médecine vétérinaire* **7**(141):575-579

Barret, A., Forestier, L., Deslys, J.P., Julien, R. and 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):10516-23

Baskakov, I.V., Legname, G., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E.(2001)."Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control".*J Biol Chem* **276**(23):19687-90

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C.(1986)."Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene".*Cell* **46**(3):417-28

Baybutt, H. and Manson, J.(1997)."Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells".*Gene* **184**(1):125-31

Bazar, E., Sheynis, T., Dorosz, J. and Jelinek, R.(2011)."Heparin inhibits membrane interactions and lipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant".*ChemBiochem* **12**(5):761-7

Beck, K.E., Kay, J.G. and Braun, J.E.(2006)."Rdj2, a J protein family member, interacts with cellular prion PrP^C".*Biochem Biophys Res Commun* **346**(3):866-71

- Beekes, M. and 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):181-4
- Beekes, M. and 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. and Maness, P.F.(1994)."NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice".*J Cell Biol* **127**(3):825-33
- Behrens, A.(2003)."Physiological and pathological functions of the prion protein homologue Dpl".*Br Med Bull* **66**(35-42)
- Belichenko, P.V., Miklossy, J., Belser, B., Budka, H. and Celio, M.R.(1999)."Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease".*Neurobiol Dis* **6**(4):269-79
- Ben-Zaken, O., Tzaban, S., Tal, Y., Horonchik, L., Esko, J.D., Vlodavsky, I. and Taraboulos, A.(2003)."Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions".*J Biol Chem* **278**(41):40041-9
- Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascsak, R.J., Cashman, N.R. and Bolton, D.C.(1992)."Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein".*Neurology* **42**(1):149-56
- Benvegnu, S., Roncaglia, P., Agostini, F., Casalone, C., Corona, C., Gustincich, S. and Legname, G.(2011)."Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus".*Physiol Genomics*
- Bera, A., Roche, A.C. and Nandi, P.K.(2007)."Bending and unwinding of nucleic acid by prion protein".*Biochemistry* **46**(5):1320-8
- Beranger, F., Mange, A., Goud, B. and 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):38972-7
- Beringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T.L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A.G., Baron, T., Vilotte, J.L. and 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. and Laude, H.(2008a)."Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD".*PLoS One* **3**(1):e1419
- Beringue, V., Mallinson, G., Kaiser, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J. and Hawke, S.(2003)."Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain".*Brain* **126**(Pt 9):2065-73
- Beringue, V., Vilotte, J.L. and Laude, H.(2008b)."Prion agent diversity and species barrier".*Vet Res* **39**(4):47
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J. and Zako, M.(1999)."Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans".*Annu Rev Biochem* **68**:729-77
- Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A.J., Klein, M.A., Voigtlander, T., Weissmann, C. and Aguzzi, A.(1997)."PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain".*Nature* **389**(6646):69-73
- Bone, I., Belton, L., Walker, A.S. and Darbyshire, J.(2008)."Intraventricular pentosan polysulphate in human prion diseases: an observational study in the UK".*Eur J Neurol* **15**(5):458-64
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A. and Prusiner, S.B.(1992)."Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway".*J Biol Chem* **267**(23):16188-99

Boregowda, R.K., Mi, Y., Bu, H. and Baenziger, J.U.(2005)."Differential expression and enzymatic properties of GalNAc-4-sulfotransferase-1 and GalNAc-4-sulfotransferase-2".*Glycobiology* **15**(12):1349-58

Bosque, P.J., Ryou, C., Telling, G., Peretz, D., Legname, G., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B.(2002)."Prions in skeletal muscle".*Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6):3812-7

Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G. and LeBlanc, A.(2001)."Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis".*J Biol Chem* **276**(42):39145-9

Bradford, M.M.(1976)."A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding".*Anal Biochem* **72**:248-54

Bragason, B.T. and Palsdottir, A.(2005)."Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis".*Mol Cell Neurosci* **29**(2):232-44

Brimacombe, D.B., Bennett, A.D., Wusteman, F.S., Gill, A.C., Dann, J.C. and Bostock, C.J.(1999)."Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein".*Biochem J* **342 Pt 3**(605-13

Brown, D.A. and London, E.(1998)."Functions of lipid rafts in biological membranes".*Annu Rev Cell Dev Biol* **14**(111-36

Brown, D.R. and Besinger, A.(1998)."Prion protein expression and superoxide dismutase activity".*Biochem J* **334 (Pt 2)**(423-9

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. and Kretzschmar, H.(1997a)."The cellular prion protein binds copper in vivo".*Nature* **390**(6661):684-7

Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A.(1997b)."Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity".*Exp Neurol* **146**(1):104-12

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguett, M. and Weissmann, C.(1993)."Mice devoid of PrP are resistant to scrapie".*Cell* **73**(7):1339-47

Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S. and 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):1894-906

Buschmann, A. and 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):934-42

Busse, M. and Kusche-Gullberg, M.(2003)."In vitro polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins".*J Biol Chem* **278**(42):41333-7

Butler, D.A., Scott, M.R., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T. and Prusiner, S.B.(1988)."Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins".*J Virol* **62**(5):1558-64

C

Cabral, A.L., Lee, K.S. and Martins, V.R.(2002)."Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation".*J Biol Chem* **277**(7):5675-82

Campana, V., Sarnataro, D. and Zurzolo, C.(2005)."The highways and byways of prion protein trafficking".*Trends Cell Biol* **15**(2):102-11

Canas, N., Gorina, R., Planas, A.M., Verges, J., Montell, E., Garcia, A.G. and Lopez, M.G.(2010)."Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation".*Neuroscience* **167**(3):872-9

Capellari, S., Cardone, F., Notari, S., Schinina, M.E., Maras, B., Sita, D., Baruzzi, A., Pocchiari, M. and Parchi, P.(2005)."Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene".*Neurology* **64**(5):905-7

- Capellari, S., Zaidi, S.I., Urig, C.B., Perry, G., Smith, M.A. and Petersen, R.B.(1999)."Prion protein glycosylation is sensitive to redox change".*J Biol Chem* **274**(49):34846-50
- Carleton, A., Tremblay, P., Vincent, J.D. and Lledo, P.M.(2001)."Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus".*Pflugers Arch* **442**(2):223-9
- Carlson, G.A., Ebeling, C., Torchia, M., Westaway, D. and Prusiner, S.B.(1993)."Delimiting the location of the scrapie prion incubation time gene on chromosome 2 of the mouse".*Genetics* **133**(4):979-88
- Carlson, G.A., Kingsbury, D.T., Goodman, P.A., Coleman, S., Marshall, S.T., DeArmond, S., Westaway, D. and Prusiner, S.B.(1986)."Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes".*Cell* **46**(4):503-11
- 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. and Torres, J.M.(2005)."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):6237-46
- 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. and Torres, J.M.(2003)."Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice".*Arch Virol* **148**(4):677-91
- Castillo, G.M., Cummings, J.A., Yang, W., Judge, M.E., Sheardown, M.J., Rimvall, K., Hansen, J.B. and Snow, A.D.(1998)."Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation".*Diabetes* **47**(4):612-20
- Castillo, G.M., Lukito, W., Wight, T.N. and Snow, A.D.(1999)."The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation".*J Neurochem* **72**(4):1681-7
- Caughey, B. and Baron, G.S.(2006)."Prions and their partners in crime".*Nature* **443**(7113):803-10
- Caughey, B., Brown, K., Raymond, G.J., Katzenstein, G.E. and Thresher, W.(1994)."Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]".*J Virol* **68**(4):2135-41
- Caughey, B., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J. and Chesebro, B.(1989)."Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells".*J Virol* **63**(1):175-81
- Caughey, B. and Raymond, G.J.(1991)."The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive".*J Biol Chem* **266**(27):18217-23
- Caughey, B. and Raymond, G.J.(1993)."Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells".*J Virol* **67**(2):643-50
- Cervia, J.S., Sowemimo-Coker, S.O., Ortolano, G.A., Wilkins, K., Schaffer, J. and Wortham, S.T.(2006)."An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease".*Transfus Med Rev* **20**(3):190-206
- Chakrabarti, O., Ashok, A. and Hegde, R.S.(2009)."Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration".*Trends Biochem Sci* **34**(6):287-95
- Chandler, R.L.(1961)."Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material".*Lancet* **1**(7191):1378-9
- Chen, P.Y., Lin, C.C., Chang, Y.T., Lin, S.C. and Chan, S.I.(2002)."One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide".*Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20):12633-8

- Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S. and Schachner, M.(2003)."Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival".*Mol Cell Neurosci* **22**(2):227-33
- Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P. and Autilio-Gambetti, L.(1995)."Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases".*J Biol Chem* **270**(32):19173-80
- Chernousov, M.A., Rothblum, K., Stahl, R.C., Evans, A., Prentiss, L. and Carey, D.J.(2006)."Glypican-1 and alpha4(V) collagen are required for Schwann cell myelination".*J Neurosci* **26**(2):508-17
- Cherr, G.N., Yudin, A.I. and Overstreet, J.W.(2001)."The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling".*Matrix Biol* **20**(8):515-25
- Chiarini, L.B., Freitas, A.R., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R. and Linden, R.(2002)."Cellular prion protein transduces neuroprotective signals".*EMBO J* **21**(13):3317-26
- Cohlberg, J.A., Li, J., Uversky, V.N. and Fink, A.L.(2002)."Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro".*Biochemistry* **41**(5):1502-11
- Coitinho, A.S., Lopes, M.H., Hajj, G.N., Rossato, J.I., Freitas, A.R., Castro, C.C., Cammarota, M., Brentani, R.R., Izquierdo, I. and Martins, V.R.(2007)."Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1".*Neurobiol Dis* **26**(1):282-90
- Cole, R.N. and Hart, G.W.(2001)."Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals".*J Neurochem* **79**(5):1080-9
- Colley, K.J.(1997)."Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers".*Glycobiology* **7**(1):1-13
- Colling, S.B., Collinge, J. and Jefferys, J.G.(1996)."Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K+ currents".*Neurosci Lett* **209**(1):49-52
- Colling, S.B., Khana, M., Collinge, J. and Jefferys, J.G.(1997)."Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice".*Brain Res* **755**(1):28-35
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. and Jefferys, J.G.(1994)."Prion protein is necessary for normal synaptic function".*Nature* **370**(6487):295-7
- Collins, S.J., Sanchez-Juan, P., Masters, C.L., Klug, G.M., van Duijn, C., Poggi, A., Pocchiari, M., Almonti, S., Cuadrado-Corrales, N., de Pedro-Cuesta, J., Budka, H., Gelpi, E., Glatzel, M., Tolnay, M., Hewer, E., Zerr, I., Heinemann, U., Kretschmar, H.A., Jansen, G.H., Olsen, E., Mitrova, E., Alperovitch, A., Brandel, J.P., Mackenzie, J., Murray, K. and Will, R.G.(2006)."Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease".*Brain* **129**(Pt 9):2278-87
- Cortijo-Arellano, M., Ponce, J., Durany, N. and Cladera, J.(2008)."Amyloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185-208): comparison with Alzheimer's peptide Aβ(1-28), influence of heparin and cell toxicity".*Biochem Biophys Res Commun* **368**(2):238-42
- Costa, C., Tortosa, R., Vidal, E., Padilla, D., Torres, J.M., Ferrer, I., Pumarola, M. and Bassols, A.(2009)."Central nervous system extracellular matrix changes in a transgenic mouse model of bovine spongiform encephalopathy".*Vet J* **182**(2):306-14
- Cotto, E., Andre, M., Fogue, J., Fleury, H.J. and Babin, P.J.(2005)."Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*)".*FEBS J* **272**(2):500-13
- Criado, J.R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J.L., Wills, D.N., Henriksen, S.J., Race, R., Manson, J.C., Chesebro, B. and Oldstone, M.B.(2005)."Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons".*Neurobiol Dis* **19**(1-2):255-65

Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. and Baron, T.(2001)."Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene".*J Virol* **75**(11):5328-34

Csoka, A.B., Frost, G.I. and Stern, R.(2001)."The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes".*Matrix Biol* **20**(8):499-508

Cuccioloni, M., Amici, M., Eleuteri, A.M., Biagetti, M., Barocci, S. and Angeletti, M.(2005)."Binding of recombinant PrPc to human plasminogen: kinetic and thermodynamic study using a resonant mirror biosensor".*Proteins* **58**(3):728-34

Cuillé, J. and Chelle, P.L.(1939)."Transmission expérimentale de la tremblante de la chèvre".*C R Acad Sci Paris* **208**(1058-1060

D

Daude, N.(2004)."Prion diseases and the spleen".*Viral Immunol* **17**(3):334-49

de Waard, P., Vliegthart, J.F., Harada, T. and Sugahara, K.(1992)."Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. II. Seven compounds containing 2 or 3 sulfate residues".*J Biol Chem* **267**(9):6036-43

DeArmond, S.J., Kristensson, K. and Bowler, R.P.(1992)."PrPSc causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox".*Prog Brain Res* **94**(437-46

Deleault, N.R., Geoghegan, J.C., Nishina, K., Kascsak, R., Williamson, R.A. and Supattapone, S.(2005)."Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions".*J Biol Chem* **280**(29):26873-9

Deleault, N.R., Lucassen, R.W. and Supattapone, S.(2003)."RNA molecules stimulate prion protein conversion".*Nature* **425**(6959):717-20

Della-Bianca, V., Rossi, F., Armato, U., Dal-Pra, I., Costantini, C., Perini, G., Politi, V. and Della Valle, G.(2001)."Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126)".*J Biol Chem* **276**(42):38929-33

Dempsey, L.A., Plummer, T.B., Coombes, S.L. and Platt, J.L.(2000)."Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage".*Glycobiology* **10**(5):467-75

Deslys, J.P. and Picot, A.(2001)."La vache folle, les risques pour l'homme".Flammarion.2-080300261

Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Pietu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D. and Chouaib, S.(2004)."Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death".*Cancer Res* **64**(2):719-27

Diaz-Nido, J., Wandosell, F. and Avila, J.(2002)."Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases".*Peptides* **23**(7):1323-32

Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R. and Iwaki, T.(2004)."Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models".*J Virol* **78**(10):4999-5006

Drisaldi, B., Coomaraswamy, J., Mastrangelo, P., Strome, B., Yang, J., Watts, J.C., Chishti, M.A., Marvi, M., Windl, O., Ahrens, R., Major, F., Sy, M.S., Kretzschmar, H., Fraser, P.E., Mount, H.T. and Westaway, D.(2004)."Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins: N-terminal modules in PrPC offset pro-apoptotic activity of the Doppel helix B/B' region".*J Biol Chem* **279**(53):55443-54

E

- Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. and Winnacker, E.L.(1996)."Prion protein PrP^c interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family".*J Virol* **70**(7):4724-8
- Edgren, G., Havsmark, B., Jonsson, M. and Fransson, L.A.(1997)."Glypican (heparan sulfate proteoglycan) is palmitoylated, deglycanated and reglycanated during recycling in skin fibroblasts".*Glycobiology* **7**(1):103-12
- Egea, J., Garcia, A.G., Verges, J., Montell, E. and Lopez, M.G.(2010)."Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans".*Osteoarthritis Cartilage* **18 Suppl 1**(S24-7
- Ehlers, B. and Diringer, H.(1984)."Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen".*J Gen Virol* **65 (Pt 8)**(1325-30
- El-Agnaf, O.M., Jakes, R., Curran, M.D. and 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
- Ellis, V., Daniels, M., Misra, R. and Brown, D.R.(2002)."Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner".*Biochemistry* **41**(22):6891-6
- Epple, G., Schleuning, W.D., Kettelgerdes, G., Kottgen, E., Gessner, R. and Praus, M.(2004)."Prion protein stimulates tissue-type plasminogen activator-mediated plasmin generation via a lysine-binding site on kringle 2".*J Thromb Haemost* **2**(6):962-8
- Ermonval, M., Petit, D., Le Duc, A., Kellermann, O. and 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):477-93
- Esko, J.D. and Lindahl, U.(2001)."Molecular diversity of heparan sulfate".*J Clin Invest* **108**(2):169-73
- Esko, J.D. and Selleck, S.B.(2002)."Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate".*Annu Rev Biochem* **71**(435-71
- Esko, J.D. and Zhang, L.(1996)."Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly".*Curr Opin Struct Biol* **6**(5):663-70
- Evers, M.R., Xia, G., Kang, H.G., Schachner, M. and Baenziger, J.U.(2001)."Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase".*J Biol Chem* **276**(39):36344-53

F

- Fawcett, J.(2009)."Molecular control of brain plasticity and repair".*Prog Brain Res* **175**(501-9
- Fevrier, B., Vilette, D., Laude, H. and Raposo, G.(2005)."Exosomes: a bubble ride for prions?".*Traffic* **6**(1):10-7
- Filous, A.R., Miller, J.H., Coulson-Thomas, Y.M., Horn, K.P., Alilain, W.J. and Silver, J.(2010)."Immature astrocytes promote CNS axonal regeneration when combined with chondroitinase ABC".*Dev Neurobiol* **70**(12):826-41
- Fischer, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P. and Aguzzi, A.(2000)."Binding of disease-associated prion protein to plasminogen".*Nature* **408**(6811):479-83
- Fiumara, F., Fioriti, L., Kandel, E.R. and Hendrickson, W.A.(2011)."Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins".*Cell* **143**(7):1121-35
- Fivaz, M., Vilbois, F., Thurnheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P.E., Parton, R.G. and van der Goot, F.G.(2002)."Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins".*EMBO J* **21**(15):3989-4000
- Flores-Langarica, A., Sebti, Y., Mitchell, D.A., Sim, R.B. and MacPherson, G.G.(2009)."Scrapie pathogenesis: the role of complement C1q in scrapie agent uptake by conventional dendritic cells".*J Immunol* **182**(3):1305-13

Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, S., Chauvin, J.P., Decavel, J.P., Varea, R., Grassi, J., Fontes, M. and Cesbron, J.Y.(2002)."PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading".*J Virol* **76**(5):2434-9

Ford, M.J., Burton, L.J., Li, H., Graham, C.H., Frobert, Y., Grassi, J., Hall, S.M. and Morris, R.J.(2002a)."A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS".*Neuroscience* **111**(3):533-51

Ford, M.J., Burton, L.J., Morris, R.J. and Hall, S.M.(2002b)."Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse".*Neuroscience* **113**(1):177-92

Foster, N. and Macpherson, G.G.(2010)."Murine cecal patch M cells transport infectious prions in vivo".*J Infect Dis* **202**(12):1916-9

Fournier, J.G., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T. and Robain, O.(1995)."Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus".*C R Acad Sci III* **318**(3):339-44

Fraser, H.(1982)."Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway".*Nature* **295**(5845):149-50

Freeman, C. and Parish, C.R.(1998)."Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity".*Biochem J* **330** (Pt 3)(1341-50

Fukuchi, K., Hart, M. and Li, L.(1998)."Alzheimer's disease and heparan sulfate proteoglycan".*Front Biosci* **3**(d327-37

Fuller, M., Chau, A., Nowak, R.C., Hopwood, J.J. and Meikle, P.J.(2006)."A defect in exodegradative pathways provides insight into endodegradation of heparan and dermatan sulfates".*Glycobiology* **16**(4):318-25

Funderburgh, J.L.(2002)."Keratan sulfate biosynthesis".*IUBMB Life* **54**(4):187-94

G

Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M. and Ben-Sasson, S.A.(1993)."Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate".*J Cell Physiol* **157**(2):319-25

Gabriel, J.M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. and Prusiner, S.B.(1992)."Molecular cloning of a candidate chicken prion protein".*Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19):9097-101

Gadotti, V.M., Bonfield, S.P. and Zamponi, G.W.(2011)."Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein".*Behav Brain Res*

Gajdusek, D.C. and Zigas, V.(1957)."Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population".*N Engl J Med* **257**(20):974-8

Gallagher, J.T.(2001)."Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu".*J Clin Invest* **108**(3):357-61

Gao, C., Lei, Y.J., Han, J., Shi, Q., Chen, L., Guo, Y., Gao, Y.J., Chen, J.M., Jiang, H.Y., Zhou, W. and Dong, X.P.(2006)."Recombinant neural protein PrP can bind with both recombinant and native apolipoprotein E in vitro".*Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**(9):593-601

Gauczynski, S., Nikles, D., El-Gogo, S., Papy-Garcia, D., Rey, C., Alban, S., Barritault, D., Lasmezas, C.I. and 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):702-9

Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and 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):5863-75

Glatzel, M. and Aguzzi, A.(2000)."Peripheral pathogenesis of prion diseases".*Microbes Infect* **2**(6):613-9

- Glatzel, M. and Aguzzi, A.(2001)."The shifting biology of prions".*Brain Res Brain Res Rev* **36**(2-3):241-8
- Glatzel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Luhrs, T. and Aguzzi, A.(2005)."Human prion diseases: molecular and clinical aspects".*Arch Neurol* **62**(4):545-52
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J. and Crowther, R.A.(1996)."Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans".*Nature* **383**(6600):550-3
- 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. and Hunter, N.(1999)."PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA".*J Gen Virol* **80 (Pt 8)**(2275-83
- Gomes, M.P., Cordeiro, Y. and Silva, J.L.(2008)."The peculiar interaction between mammalian prion protein and RNA".*Prion* **2**(2):64-6
- Gousset, K. and Zurzolo, C.(2009)."Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading?".*Prion* **3**(2):94-8
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E.(2004)."Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers".*Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22):8342-7
- 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. and Brentani, R.R.(2000)."Cellular prion protein binds laminin and mediates neurogenesis".*Brain Res Mol Brain Res* **76**(1):85-92
- Greiling, H.(1994)."Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans".*EXS* **70**(101-22
- Grewal, S.I. and Moazed, D.(2003)."Heterochromatin and epigenetic control of gene expression".*Science* **301**(5634):798-802
- Griffith, J.S.(1967)."Self-replication and scrapie".*Nature* **215**(5105):1043-4
- Gu, W.L., Fu, S.L., Wang, Y.X., Li, Y., Lu, H.Z., Xu, X.M. and Lu, P.H.(2009)."Chondroitin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway".*BMC Neurosci* **10**(128
- Gu, Y., Hinnerwisch, J., Fredricks, R., Kalepu, S., Mishra, R.S. and Singh, N.(2003)."Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein".*Neurobiol Dis* **12**(2):133-49
- Guillerme-Bosselut, F., Forestier, L., Jayat-Vignoles, C., Vilotte, J.L., Popa, I., Portoukalian, J., Le Dur, A., Laude, H., Julien, R. and Gallet, P.F.(2009)."Glycosylation-related gene expression profiling in the brain and spleen of scrapie-affected mouse".*Glycobiology* **19**(8):879-89
- Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J.C. and Lefebvre, T.(2005)."O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?".*Int J Biochem Cell Biol* **37**(4):765-74
- Guiroy, D.C., Yanagihara, R. and Gajdusek, D.C.(1991)."Localization of amyloidogenic proteins and sulfated glycosaminoglycans in nontransmissible and transmissible cerebral amyloidoses".*Acta Neuropathol* **82**(2):87-92
- ## H
- Habuchi, H., Habuchi, O. and Kimata, K.(2004)."Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code?".*Glycoconj J* **21**(1-2):47-52
- Haigh, C.L., Wright, J.A. and Brown, D.R.(2007)."Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the Prnp gene".*J Mol Biol* **368**(4):915-27
- Haik, S., Faucheux, B.A., Sazdovitch, V., Privat, N., Kemeny, J.L., Perret-Liaudet, A. and Hauw, J.J.(2003)."The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease".*Nat Med* **9**(9):1121-3

- Hajj, G.N., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Santos, T.G., Ribeiro, K.C., Juliano, M.A., Jacchieri, S.G., Zanata, S.M. and Martins, V.R.(2007)."Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins".*J Cell Sci* **120**(Pt 11):1915-26
- Hammarstrom, P.(2007)."The bloody path of amyloids and prions".*J Thromb Haemost* **5**(6):1136-8
- Hammond, S.M., Caudy, A.A. and Hannon, G.J.(2001)."Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA".*Nat Rev Genet* **2**(2):110-9
- Harmey, J.H., Doyle, D., Brown, V. and Rogers, M.S.(1995)."The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells".*Biochem Biophys Res Commun* **210**(3):753-9
- Harris, D.A., Falls, D.L., Johnson, F.A. and Fischbach, G.D.(1991)."A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity".*Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17):7664-8
- 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. and Laegreid, W.W.(2003)."Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer".*Mamm Genome* **14**(11):765-77
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R.(1998)."A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease".*Science* **279**(5352):827-34
- Hegde, R.S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R.(1999)."Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration".*Nature* **402**(6763):822-6
- Heggebo, R., Gonzalez, L., Press, C.M., Gunnes, G., Espenes, A. and Jeffrey, M.(2003)."Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep".*J Gen Virol* **84**(Pt 5):1327-38
- Heikenwalder, M., Julius, C. and Aguzzi, A.(2007)."Prions and peripheral nerves: a deadly rendezvous".*J Neurosci Res* **85**(12):2714-25
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N. and Kretzschmar, H.(1999)."Evidence of presynaptic location and function of the prion protein".*J Neurosci* **19**(20):8866-75
- Herms, J.W., Tings, T., Dunker, S. and Kretzschmar, H.A.(2001)."Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells".*Neurobiol Dis* **8**(2):324-30
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell, K., Castilla, J. and Soto, C.(2005)."The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity".*J Neurosci* **25**(11):2793-802
- Hijazi, N., Kariv-Inbal, Z., Gasset, M. and Gabizon, R.(2005)."PrP^{Sc} incorporation to cells requires endogenous glycosaminoglycan expression".*J Biol Chem* **280**(17):17057-61
- Hikino, M., Mikami, T., Faissner, A., Vilela-Silva, A.C., Pavao, M.S. and Sugahara, K.(2003)."Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain".*J Biol Chem* **278**(44):43744-54
- Hill, A.F., Butterworth, R.J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M.N., Thomas, D.J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J.E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J.W., Lantos, P.L. and Collinge, J.(1999)."Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples".*Lancet* **353**(9148):183-9
- Hilton, D.A., Sutak, J., Smith, M.E., Penney, M., Conyers, L., Edwards, P., McCardle, L., Ritchie, D., Head, M.W., Wiley, C.A. and Ironside, J.W.(2004)."Specificity of lymphoreticular accumulation of prion protein for variant Creutzfeldt-Jakob disease".*J Clin Pathol* **57**(3):300-2

- Hiraoka, N., Misra, A., Belot, F., Hindsgaul, O. and Fukuda, M.(2001)."Molecular cloning and expression of two distinct human N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases that transfer sulfate to GalNAc beta 1-->4GlcNAc beta 1-->R in both N- and O-glycans".*Glycobiology* **11**(6):495-504
- Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T.O., Fukuda, M.N. and 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):20188-96
- Hirschfield, G.M. and Hawkins, P.N.(2003)."Amyloidosis: new strategies for treatment".*Int J Biochem Cell Biol* **35**(12):1608-13
- Hodak, M. and Bernholc, J.(2010)."Insights into prion protein function from atomistic simulations".*Prion* **4**(1):13-9
- Hooper, N.M.(2011)."Glypican-1 facilitates prion conversion in lipid rafts".*J Neurochem* **116**(5):721-5
- Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y. and Shinagawa, M.(1997)."Alternative usage of exon 1 of bovine PrP mRNA".*Biochem Biophys Res Commun* **233**(3):650-4
- Hornemann, S., Schorn, C. and Wuthrich, K.(2004)."NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains".*EMBO Rep* **5**(12):1159-64
- Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodaysky, I. and Taraboulos, A.(2005)."Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions".*J Biol Chem* **280**(17):17062-7
- Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S.(2001)."Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor".*EMBO J* **20**(21):5876-86
- Ichijo, H.(2006)."Restricted distribution of D-unit-rich chondroitin sulfate carbohydrate chains in the neuropil encircling the optic tract and on a subset of retinal axons in chick embryos".*J Comp Neurol* **495**(4):470-9
- Inatani, M., Irie, F., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M. and Yamaguchi, Y.(2003)."Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate".*Science* **302**(5647):1044-6
- Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and 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):175-83
- Iozzo, R.V.(1998)."Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function".*Annu Rev Biochem* **67**(609-52
- Ishii, M. and Maeda, N.(2008)."Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex".*J Biol Chem* **283**(47):32610-20
- Itano, N. and Kimata, K.(2002)."Mammalian hyaluronan synthases".*IUBMB Life* **54**(4):195-9
- Izumikawa, T., Okuura, Y., Koike, T., Sakoda, N. and Kitagawa, H.(2011)."Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in co-operation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2".*Biochem J* **434**(2):321-31
- Izumikawa, T., Uyama, T., Okuura, Y., Sugahara, K. and Kitagawa, H.(2007)."Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor".*Biochem J* **403**(3):545-52

J

- Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R. and Collinge, J.(2001)."Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein".*Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15):8531-5
- Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T., Jr.(1993)."Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?".*Cell* **73**(6):1055-8
- Jedrzejewski, M.J. and Stern, R.(2005)."Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis".*Proteins* **61**(2):227-38
- Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C.M., Brown, K.L. and Bruce, M.E.(2000)."Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy".*J Pathol* **191**(3):323-32
- Ji, H.F. and Zhang, H.Y.(2010)."beta-sheet constitution of prion proteins".*Trends Biochem Sci* **35**(3):129-34
- Jiang, X. and Couchman, J.R.(2003)."Perlecan and tumor angiogenesis".*J Histochem Cytochem* **51**(11):1393-410
- Jimenez-Huete, A., Lievens, P.M., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. and Prelli, F.(1998)."Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues".*Am J Pathol* **153**(5):1561-72
- Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, M., Gambetti, P. and Singh, N.(2000)."The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome".*J Biol Chem* **275**(49):38699-704
- Jing, Y.Y., Li, X.L., Shi, Q., Wang, Z.Y., Guo, Y., Pan, M.M., Tian, C., Zhu, S.Y., Chen, C., Gong, H.S., Han, J., Gao, C. and Dong, X.P.(2011)."A Novel PrP Partner HS-1 Associated Protein X-1 (HAX-1) Protected the Cultured Cells Against the Challenge of H₂O₂".*J Mol Neurosci*
- Johnson, R.T.(2005)."Prion diseases".*Lancet Neurol* **4**(10):635-42
- Jones, C.E., Abdelraheim, S.R., Brown, D.R. and Viles, J.H.(2004)."Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein".*J Biol Chem* **279**(31):32018-27
- Jones, L.L. and Tuszynski, M.H.(2002)."Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors".*J Neurosci* **22**(11):4611-24
- Jouvin-Marche, E., Attuil-Audenis, V., Aude-Garcia, C., Rachidi, W., Zabel, M., Podevin-Dimster, V., Siret, C., Huber, C., Martinic, M., Riondel, J., Villiers, C.L., Favier, A., Naquet, P., Cesbron, J.Y. and Marche, P.N.(2006)."Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus".*J Immunol* **176**(6):3490-7

K

- Kalus, I., Salmen, B., Viebahn, C., von Figura, K., Schmitz, D., D'Hooge, R. and Dierks, T.(2009)."Differential involvement of the extracellular 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 in brain development and neuronal and behavioural plasticity".*J Cell Mol Med* **13**(11-12):4505-21
- Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Sugahara, K. and Yamada, S.(2010)."Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence".*Glycobiology* **20**(3):300-9
- Kang, H.G., Evers, M.R., Xia, G., Baenziger, J.U. and Schachner, M.(2001)."Molecular cloning and expression of an N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase that transfers sulfate to terminal and non-terminal beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine".*J Biol Chem* **276**(14):10861-9

- Kang, H.G., Evers, M.R., Xia, G., Baenziger, J.U. and Schachner, M.(2002)."Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases".*J Biol Chem* **277**(38):34766-72
- Karamanos, N.K., Syrokou, A., Vanky, P., Nurminen, M. and Hjerpe, A.(1994)."Determination of 24 variously sulfated galactosaminoglycan- and hyaluronan-derived disaccharides by high-performance liquid chromatography".*Anal Biochem* **221**(1):189-99
- Kato, Y., Hayatsu, N., Kaneko, M.K., Ogasawara, S., Hamano, T., Takahashi, S., Nishikawa, R., Matsutani, M., Mishima, K. and Narimatsu, H.(2008)."Increased expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in malignant astrocytic tumors".*Biochem Biophys Res Commun* **369**(4):1041-6
- Keshet, G.I., Bar-Peled, O., Yaffe, D., Nudel, U. and Gabizon, R.(2000)."The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain".*J Neurochem* **75**(5):1889-97
- Kim, B.T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and 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):7176-81
- Kimberlin, R.H. and Walker, C.A.(1978)."Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves".*J Comp Pathol* **88**(1):39-47
- Kimberlin, R.H. and Walker, C.A.(1989)."The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice".*Virus Res* **12**(3):201-11
- Kitagawa, H., Izumikawa, T., Uyama, T. and Sugahara, K.(2003)."Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization".*J Biol Chem* **278**(26):23666-71
- Kitagawa, H., Kinoshita, A. and Sugahara, K.(1995)."Microanalysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography".*Anal Biochem* **232**(1):114-21
- Kitagawa, H., Uyama, T. and Sugahara, K.(2001)."Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase".*J Biol Chem* **276**(42):38721-6
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. and Tateishi, J.(1991)."Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease".*J Virol* **65**(11):6292-5
- Kitayama, K., Hayashida, Y., Nishida, K. and Akama, T.O.(2007)."Enzymes responsible for synthesis of corneal keratan sulfate glycosaminoglycans".*J Biol Chem* **282**(41):30085-96
- Kluppel, M., Wight, T.N., Chan, C., Hinek, A. and Wrana, J.L.(2005)."Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis".*Development* **132**(17):3989-4003
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T. and Caughey, B.(1994)."Cell-free formation of protease-resistant prion protein".*Nature* **370**(6489):471-4
- Kocisko, D.A., Vaillant, A., Lee, K.S., Arnold, K.M., Bertholet, N., Race, R.E., Olsen, E.A., Juteau, J.M. and Caughey, B.(2006)."Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides".*Antimicrob Agents Chemother* **50**(3):1034-44
- Kondo, Y., Shen, L., Ahmed, S., Bumber, Y., Sekido, Y., Haddad, B.R. and Issa, J.P.(2008)."Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells".*PLoS One* **3**(4):e2037

- 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. and Gambetti, P.(2005)."Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models".*J Neurosci* **25**(35):7944-9
- Kornblatt, J.A., Marchal, S., Rezaei, H., Kornblatt, M.J., Balny, C., Lange, R., Debey, M.P., Hui Bon Hoa, G., Marden, M.C. and Grosclaude, J.(2003)."The fate of the prion protein in the prion/plasminogen complex".*Biochem Biophys Res Commun* **305**(3):518-22
- Kourie, J.I. and Henry, C.L.(2001)."Protein aggregation and deposition: implications for ion channel formation and membrane damage".*Croat Med J* **42**(4):359-74
- Kretschmar, H.(2000)."[Interesting not only as differential Alzheimer dementia diagnosis. Bovine spongiform encephalopathy and other prion diseases]".*MMW Fortschr Med* **142**(39):34-8
- Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J.P. and Lindahl, U.(2006)."Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity".*J Cell Biol* **174**(3):323-7
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L. and Riess, O.(1998)."Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease".*Nat Genet* **18**(2):106-8
- Krusius, T., Viitala, J., Palo, J. and Maury, C.P.(1986)."Enrichment of high mannose-type glycans in nervous tissue glycoproteins in neuronal ceroid-lipofuscinosis".*J Neurol Sci* **72**(1):1-10
- Kurschner, C. and Morgan, J.I.(1995)."The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system".*Brain Res Mol Brain Res* **30**(1):165-8
- Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L.(2003)."Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis".*Curr Opin Struct Biol* **13**(5):605-11
- Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Yokoyama, T., Itohara, S. and Onodera, T.(1999)."Prions prevent neuronal cell-line death".*Nature* **400**(6741):225-6
- Kuwata, K., Matsumoto, T., Cheng, H., Nagayama, K., James, T.L. and Roder, H.(2003)."NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106-126".*Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25):14790-5
- ## L
- Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y.G., Masullo, C. and Pocchiari, M.(1992)."Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters".*J Gen Virol* **73** (Pt 3)(661-5
- Laffont-Proust, I., Faucheux, B.A., Hassig, R., Sazdovitch, V., Simon, S., Grassi, J., Hauw, J.J., Moya, K.L. and Haik, S.(2005)."The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain".*FEBS Lett* **579**(28):6333-7
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W. and Strittmatter, S.M.(2009)."Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers".*Nature* **457**(7233):1128-32
- Laws, D.D., Bitter, H.M., Liu, K., Ball, H.L., Kaneko, K., Wille, H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Pines, A. and Wemmer, D.E.(2001)."Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration".*Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20):11686-90
- Lawson, V.A., Collins, S.J., Masters, C.L. and Hill, A.F.(2005)."Prion protein glycosylation".*J Neurochem* **93**(4):793-801
- Lechauve, C., Rezaei, H., Celier, C., Kiger, L., Corral-Debrinski, M., Noinville, S., Chauvierre, C., Hamdane, D., Pato, C. and Marden, M.C.(2009)."Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction".*J Mol Biol* **388**(5):968-77

- Leclerc, E., Serban, H., Prusiner, S.B., Burton, D.R. and Williamson, R.A.(2006)."Copper induces conformational changes in the N-terminal part of cell-surface PrPC".*Arch Virol* **151**(11):2103-9
- Ledin, J., Staatz, W., Li, J.P., Gotte, M., Selleck, S., Kjellen, L. and Spillmann, D.(2004)."Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production".*J Biol Chem* **279**(41):42732-41
- 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. and Hood, L.E.(1998)."Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species".*Genome Res* **8**(10):1022-37
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Jr. and Trojanowski, J.Q.(1991)."A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau".*Science* **251**(4994):675-8
- Lefebvre, T., Guinez, C., Dehennaut, V., Beseme-Dekeyser, O., Morelle, W. and Michalski, J.C.(2005)."Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?".*Expert Rev Proteomics* **2**(2):265-75
- Lehmann, S., Milhaved, O. and Mange, A.(1999)."Trafficking of the cellular isoform of the prion protein".*Biomed Pharmacother* **53**(1):39-46
- Lemaire-Vieille, C., Schulze, T., Podevin-Dimster, V., Follet, J., Bailly, Y., Blanquet-Grossard, F., Decavel, J.P., Heinen, E. and Cesbron, J.Y.(2000)."Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice".*Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10):5422-7
- Leopoldt, J.G.(1759)."Nützliche und auf die Erfahrung Gegründete".*Einleitung zu der landwirthschaft, fünf Theile* 348
- Levavasseur, E., Metharom, P., Dorban, G., Nakano, H., Kakiuchi, T., Carnaud, C., Sarradin, P. and Aucouturier, P.(2007)."Experimental scrapie in 'plt' mice: an assessment of the role of dendritic-cell migration in the pathogenesis of prion diseases".*J Gen Virol* **88**(Pt 8):2353-60
- Lewis, V. and Collins, S.J.(2008)."Analysis of endogenous PrPC processing in neuronal and non-neuronal cell lines".*Methods Mol Biol* **459**(229-39
- Li, J., Uversky, V.N. and 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):11604-13
- 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. and Silva, J.L.(2006)."Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid".*Biochemistry* **45**(30):9180-7
- Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J.D., Wells, D.E. and Matzuk, M.M.(2000)."Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice".*Dev Biol* **224**(2):299-311
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L.(1998)."Regulated diversity of heparan sulfate".*J Biol Chem* **273**(39):24979-82
- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I. and 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. and Cole, G.J.(2005)."Agrin binds alpha-synuclein and modulates alpha-synuclein fibrillation".*Glycobiology* **15**(12):1320-31
- Liu, J., Chau, C.H., Liu, H., Jang, B.R., Li, X., Chan, Y.S. and Shum, D.K.(2006)."Upregulation of chondroitin 6-sulphotransferase-1 facilitates Schwann cell migration during axonal growth".*J Cell Sci* **119**(Pt 5):933-42
- Liu, J., Shriver, Z., Blaiklock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R. and Rosenberg, R.D.(1999)."Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues".*J Biol Chem* **274**(53):38155-62

Liu, T., Li, R., Pan, T., Liu, D., Petersen, R.B., Wong, B.S., Gambetti, P. and Sy, M.S.(2002)."Intercellular transfer of the cellular prion protein".*J Biol Chem* **277**(49):47671-8

Lopes, M.H., Hajj, G.N., Muras, A.G., Mancini, G.L., Castro, R.M., Ribeiro, K.C., Brentani, R.R., Linden, R. and Martins, V.R.(2005)."Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways".*J Neurosci* **25**(49):11330-9

Lysek, D.A., Schorn, C., Nivon, L.G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Guntert, P. and Wuthrich, K.(2005)."Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep".*Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3):640-5

M

Ma, J., Wollmann, R. and Lindquist, S.(2002)."Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol".*Science* **298**(5599):1781-5

Mabbott, N.A.(2004)."The complement system in prion diseases".*Curr Opin Immunol* **16**(5):587-93

Mabbott, N.A., Mackay, F., Minns, F. and Bruce, M.E.(2000)."Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie".*Nat Med* **6**(7):719-20

Mabbott, N.A. and MacPherson, G.G.(2006)."Prions and their lethal journey to the brain".*Nat Rev Microbiol* **4**(3):201-11

Mace, K., Saxod, R., Feuerstein, C., Sadoul, R. and 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

Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R.(1999)."Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface".*EMBO J* **18**(24):6917-26

Maeda, N.(2010)."Structural variation of chondroitin sulfate and its roles in the central nervous system".*Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**(1):22-31

Magalhaes, A.C., Silva, J.A., Lee, K.S., Martins, V.R., Prado, V.F., Ferguson, S.S., Gomez, M.V., Brentani, R.R. and Prado, M.A.(2002)."Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein".*J Biol Chem* **277**(36):33311-8

Mahal, S.P., Asante, E.A., Antoniou, M. and Collinge, J.(2001)."Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene".*Gene* **268**(1-2):105-14

Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. and Fantini, J.(2002)."Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins".*J Biol Chem* **277**(13):11292-6

Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G. and Collinge, J.(2002)."Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration".*EMBO J* **21**(3):202-10

Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y. and Lehmann, S.(2004)."Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein".*Biol Cell* **96**(2):125-32

Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H. and Hope, J.(1992)."The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?".*Development* **115**(1):117-22

Manson, J.C., Hope, J., Clarke, A.R., Johnston, A., Black, C. and MacLeod, N.(1995)."PrP gene dosage and long term potentiation".*Neurodegeneration* **4**(1):113-4

Marella, M. and Chabry, J.(2004)."Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment".*J Neurosci* **24**(3):620-7

- Marques, A.F., Cordeiro, Y., Silva, J.L. and Lima, L.M.(2009)."Enhanced prion protein stability coupled to DNA recognition and milieu acidification".*Biophys Chem* **141**(2-3):135-9
- Martin, R., Gallet, P.F., Rocha, D. and Petit, D.(2009)."Polymorphism of the prion protein in mammals: a phylogenetic approach".*Recent Pat DNA Gene Seq* **3**(1):63-71
- Mattei, V., Barenco, M.G., Tasciotti, V., Garofalo, T., Longo, A., Boller, K., Lower, J., Misasi, R., Montrasio, F. and Sorice, M.(2009)."Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles".*PLoS One* **4**(4):e5057
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A. and Sorice, M.(2004)."Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation".*FEBS Lett* **560**(1-3):14-8
- Mayer-Sonnenfeld, T., Avrahami, D., Friedman-Levi, Y. and Gabizon, R.(2008)."Chemically induced accumulation of GAGs delays PrP(Sc) clearance but prolongs prion disease incubation time".*Cell Mol Neurobiol* **28**(7):1005-15
- Mayer-Sonnenfeld, T., Zeigler, M., Halimi, M., Dayan, Y., Herzog, C., Lasmezas, C.I. and Gabizon, R.(2005)."The metabolism of glycosaminoglycans is impaired in prion diseases".*Neurobiol Dis* **20**(3):738-43
- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H.A. and 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):9320-7
- McBride, P.A., Wilson, M.I., Eikelenboom, P., Tunstall, A. and 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):447-54
- McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., Esford, L.E., Dyer, A.P. and Tufaro, F.(1998)."The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate".*Nat Genet* **19**(2):158-61
- McKenzie, E., Tyson, K., Stamps, A., Smith, P., Turner, P., Barry, R., Hircok, M., Patel, S., Barry, E., Stubberfield, C., Terrett, J. and Page, M.(2000)."Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member".*Biochem Biophys Res Commun* **276**(3):1170-7
- 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. and Bell, J.E.(2004)."Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage".*Am J Pathol* **165**(1):227-35
- Mead, S.(2006)."Prion disease genetics".*Eur J Hum Genet* **14**(3):273-81
- Meggio, F., Negro, A., Sarno, S., Ruzzene, M., Bertoli, A., Sorgato, M.C. and Pinna, L.A.(2000)."Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2".*Biochem J* **352 Pt 1**(191-6
- Meyer, K., Linker, A., Davidson, E.A. and Weissmann, B.(1953)."The mucopolysaccharides of bovine cornea".*J Biol Chem* **205**(2):611-6
- Miesbauer, M., Bamme, T., Riemer, C., Oidtmann, B., Winklhofer, K.F., Baier, M. and Tatzelt, J.(2006)."Prion protein-related proteins from zebrafish are complex glycosylated and contain a glycosylphosphatidylinositol anchor".*Biochem Biophys Res Commun* **341**(1):218-24
- Milhavet, O. and Lehmann, S.(2002)."Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies".*Brain Res Brain Res Rev* **38**(3):328-39

- Milhavet, O., McMahon, H.E., Rachidi, W., Nishida, N., Katamine, S., Mange, A., Arlotto, M., Casanova, D., Riondel, J., Favier, A. and Lehmann, S.(2000)."Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress".*Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25):13937-42
- Milhiet, P.E., Vacherot, F., Caruelle, J.P., Barritault, D., Caruelle, D. and Courty, J.(1998)."Upregulation of the angiogenic factor heparin affin regulatory peptide by progesterone in rat uterus".*J Endocrinol* **158**(3):389-99
- Mironov, A., Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Peters, P.J.(2003)."Cytosolic prion protein in neurons".*J Neurosci* **23**(18):7183-93
- Mishra, R.S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W.Q., Mishra, R., Li, R., Chen, S.G., Gambetti, P., Fujioka, H. and 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):11280-90
- Mitteregger, G., Vosko, M., Krebs, B., Xiang, W., Kohlmannsperger, V., Nolting, S., Hamann, G.F. and Kretzschmar, H.A.(2007)."The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein".*Brain Pathol* **17**(2):174-83
- Miura, T., Hori-i, A. and Takeuchi, H.(1996)."Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein".*FEBS Lett* **396**(2-3):248-52
- Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H. and Sugahara, K.(2009)."Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish".*Biochem J* **419**(2):387-99
- Monnet, C., Marthiens, V., Enslin, H., Frobert, Y., Sobel, A. and Mege, R.M.(2003)."Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines".*Eur J Neurosci* **18**(3):542-8
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M.A., Mackay, F., Aguzzi, A. and Weissmann, C.(2000)."Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells".*Science* **288**(5469):1257-9
- Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E. and Westaway, D.(1999)."Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel".*J Mol Biol* **292**(4):797-817
- Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J. and La Bonnardiere, C.(2001)."Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures".*J Gen Virol* **82**(Pt 8):2017-24
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. and Kellermann, O.(2000)."Signal transduction through prion protein".*Science* **289**(5486):1925-8
- Mouillet-Richard, S., Pietri, M., Schneider, B., Vidal, C., Mutel, V., Launay, J.M. and Kellermann, O.(2005)."Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein".*J Biol Chem* **280**(6):4592-601
- Moya, K.L., Hassig, R., Breen, K.C., Volland, H. and Di Giamberardino, L.(2005)."Axonal transport of the cellular prion protein is increased during axon regeneration".*J Neurochem* **92**(5):1044-53
- Moya, K.L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J. and Di Giamberardino, L.(2000)."Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain".*Microsc Res Tech* **50**(1):58-65
- Mulcahy, E.R., Bartz, J.C., Kincaid, A.E. and Bessen, R.A.(2004)."Prion infection of skeletal muscle cells and papillae in the tongue".*J Virol* **78**(13):6792-8

Muller, H., Strom, A., Hunsmann, G. and Stuke, A.W.(2005)."Separation of native prion protein (PrP) glycoforms by copper-binding using immobilized metal affinity chromatography (IMAC)".*Biochem J* **388**(Pt 1):371-8

N

Nadanaka, S. and Kitagawa, H.(2008)."Heparan sulphate biosynthesis and disease".*J Biochem* **144**(1):7-14

Nakahara, D.H., Lingappa, V.R. and Chuck, S.L.(1994)."Translocational pausing is a common step in the biogenesis of unconventional integral membrane and secretory proteins".*J Biol Chem* **269**(10):7617-22

Nandi, P.K.(1997)."Interaction of prion peptide HuPrP106-126 with nucleic acid".*Arch Virol* **142**(12):2537-45

Nandi, P.K. and Leclerc, E.(1999)."Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution".*Arch Virol* **144**(9):1751-63

Nandi, P.K. and Sizaret, P.Y.(2001)."Murine recombinant prion protein induces ordered aggregation of linear nucleic acids to condensed globular structures".*Arch Virol* **146**(2):327-45

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. and Citron, M.(1999)."Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation".*J Biol Chem* **274**(14):9843-6

Narindrasorasak, S., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Poorman, R.A., Greenberg, B. and 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):12878-83

Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. and Taraboulos, A.(1997)."Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform".*J Biol Chem* **272**(10):6324-31

Nguyen, H.D. and Hall, C.K.(2005)."Kinetics of fibril formation by polyalanine peptides".*J Biol Chem* **280**(10):9074-82

Nieznanski, K., Podlubnaya, Z.A. and Nieznanska, H.(2006)."Prion protein inhibits microtubule assembly by inducing tubulin oligomerization".*Biochem Biophys Res Commun* **349**(1):391-9

Nishida, N., Harris, D.A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavet, O. and 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):320-5

Nykanen, A., Haley, B. and Zamore, P.D.(2001)."ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway".*Cell* **107**(3):309-21

O

O'Neill, G.T., Cairns, D., Toovey, L., Goldmann, W. and Hunter, N.(2005)."New ovine PrP gene haplotypes as a result of single nucleotide polymorphisms in the PrP gene promoter".*J Anim Breed Genet* **122**(2):86-94

Oeben, M., Keller, R., Stuhlsatz, H.W. and Greiling, H.(1987)."Constant and variable domains of different disaccharide structure in corneal keratan sulphate chains".*Biochem J* **248**(1):85-93

Oesch, B., Westaway, D. and Prusiner, S.B.(1991)."Prion protein genes: evolutionary and functional aspects".*Curr Top Microbiol Immunol* **172**(109-24

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. and et al.(1985)."A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein".*Cell* **40**(4):735-46

Oglecka, K., Lundberg, P., Magzoub, M., Goran Eriksson, L.E., Langel, U. and Graslund, A.(2008)."Relevance of the N-terminal NLS-like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects".*Biochim Biophys Acta* **1778**(1):206-13

Oidtmann, B., Simon, D., Holtkamp, N., Hoffmann, R. and Baier, M.(2003)."Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins".*FEBS Lett* **538**(1-3):96-100

Okuda, T., Mita, S., Yamauchi, S., Fukuta, M., Nakano, H., Sawada, T. and Habuchi, O.(2000)."Molecular cloning and characterization of GalNAc 4-sulfotransferase expressed in human pituitary gland".*J Biol Chem* **275**(51):40605-13

Okuda, T., Sawada, T., Nakano, H., Matsubara, K., Matsuda, Y., Fukuta, M. and 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* **134**(1):111-20

Ong, E., Yeh, J.C., Ding, Y., Hindsgaul, O. and Fukuda, M.(1998)."Expression cloning of a human sulfotransferase that directs the synthesis of the HNK-1 glycan on the neural cell adhesion molecule and glycolipids".*J Biol Chem* **273**(9):5190-5

Ouidja, M.O., Petit, E., Kerros, M.E., Ikeda, Y., Morin, C., Carpentier, G., Barritault, D., Brugere-Picoux, J., Deslys, J.P., Adjou, K. and Papy-Garcia, D.(2007)."Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies".*Biochem Biophys Res Commun* **363**(1):95-100

P

Padilla, D., Beringue, V., Espinosa, J.C., Androletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Laude, H. and Torres, J.M.(2011)."Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice".*PLoS Pathog* **7**(3):e1001319

Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. and et al.(1993)."Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins".*Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23):10962-6

Pan, T., Wong, B.S., Liu, T., Li, R., Petersen, R.B. and Sy, M.S.(2002)."Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans".*Biochem J* **368**(Pt 1):81-90

Papakonstantinou, E., Karakiulakis, G., Roth, M., Verghese-Nikolakaki, S., Dawson, M., Papadopoulos, O. and Sklaviadis, T.(1999)."Glycosaminoglycan analysis in brain stems from animals infected with the bovine spongiform encephalopathy agent".*Arch Biochem Biophys* **370**(2):250-7

Parish, C.R., Hindmarsh, E.J., Bartlett, M.R., Staykova, M.A., Cowden, W.B. and Willenborg, D.O.(1998)."Treatment of central nervous system inflammation with inhibitors of basement membrane degradation".*Immunol Cell Biol* **76**(1):104-13

Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A. and Raeber, A.J.(2001)."Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells".*J Biol Chem* **276**(48):44627-32

Parkyn, C.J., Vermeulen, E.G., Mootosamy, R.C., Sunyach, C., Jacobsen, C., Oxvig, C., Moestrup, S., Liu, Q., Bu, G., Jen, A. and Morris, R.J.(2008)."LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein".*J Cell Sci* **121**(Pt 6):773-83

Pauly, P.C. and Harris, D.A.(1998)."Copper stimulates endocytosis of the prion protein".*J Biol Chem* **273**(50):33107-10

Perez, M., Wandosell, F., Colaco, C. and Avila, J.(1998)."Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment".*Biochem J* **335** (Pt 2)(369-74

Perini, F., Frangione, B. and Prelli, F.(1996)."Prion protein released by platelets".*Lancet* **347**(9015):1635-6

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. and et al.(1991)."Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease".*J Neurosci* **11**(11):3679-83

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. and Prusiner, S.B.(2003)."Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway".*J Cell Biol* **162**(4):703-17

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. and Nussbaum, R.L.(1997)."Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease".*Science* **276**(5321):2045-7

Prabhakar, V. and Sasisekharan, R.(2006)."The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans".*Adv Pharmacol* **53**(69-115

Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F.L., Fu, Y.X., Lipp, M. and Aguzzi, A.(2003)."Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion".*Nature* **425**(6961):957-62

Proudfoot, A.E., Peitsch, M.C., Power, C.A., Allet, B., Mermod, J.J., Bacon, K. and Wells, T.N.(1997)."Structure and bioactivity of recombinant human CTAP-III and NAP-2".*J Protein Chem* **16**(1):37-49

Prusiner, S.B.(1991)."Molecular biology of prion diseases".*Science* **252**(5012):1515-22

Prusiner, S.B.(1998)."Prions".*Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23):13363-83

Q

Qin, K., Yang, D.S., Yang, Y., Chishti, M.A., Meng, L.J., Kretzschmar, H.A., Yip, C.M., Fraser, P.E. and 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):19121-31

R

Race, R.(1991)."The scrapie agent in vitro".*Curr Top Microbiol Immunol* **172**(181-93

Rajendran, K.S. and Nagy, P.D.(2003)."Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus".*J Virol* **77**(17):9244-58

Rambold, A.S., Miesbauer, M., Rapaport, D., Bartke, T., Baier, M., Winklhofer, K.F. and 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):3356-68

Rane, N.S., Kang, S.W., Chakrabarti, O., Feigenbaum, L. and Hegde, R.S.(2008)."Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration".*Dev Cell* **15**(3):359-70

Raymond, C.R., Aucouturier, P. and Mabbott, N.A.(2007)."In vivo depletion of CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine".*J Immunol* **179**(11):7758-66

Rees, M.D. and Davies, M.J.(2006)."Heparan sulfate degradation via reductive homolysis of its N-chloro derivatives".*J Am Chem Soc* **128**(9):3085-97

Rees, M.D., McNiven, T.N. and Davies, M.J.(2007)."Degradation of extracellular matrix and its components by hypobromous acid".*Biochem J* **401**(2):587-96

Requena, J.(2009)."Structure of mammalian prions".*Future Virol* **4**(3):295-307

- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. and Khvorova, A.(2004)."Rational siRNA design for RNA interference".*Nat Biotechnol* **22**(3):326-30
- Rhodes, K.E. and 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. and Weiss, S.(1997)."The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells".*Nat Med* **3**(12):1383-8
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wuthrich, K.(1996)."NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321)".*Nature* **382**(6587):180-2
- Riesner, D.(2003)."Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc)".*Br Med Bull* **66**(21-33)
- Robakis, N.K., Devine-Gage, E.A., Jenkins, E.C., Kascsak, R.J., Brown, W.T., Krawczun, M.S. and Silverman, W.P.(1986)."Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain".*Biochem Biophys Res Commun* **140**(2):758-65
- Robertson, C., Booth, S.A., Beniac, D.R., Coulthart, M.B., Booth, T.F. and McNicol, A.(2006)."Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets".*Blood* **107**(10):3907-11
- Rodolfo, K., Hassig, R., Moya, K.L., Frobert, Y., Grassi, J. and Di Giamberardino, L.(1999)."A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport".*Neuroreport* **10**(17):3639-44
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U. and Kusche-Gullberg, M.(2001)."Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase".*Biochemistry* **40**(18):5548-55
- Rosicarelli, B., Serafini, B., Sbriccoli, M., Lu, M., Cardone, F., Pocchiarri, M. and Aloisi, F.(2005)."Migration of dendritic cells into the brain in a mouse model of prion disease".*J Neuroimmunol* **165**(1-2):114-20
- Roucou, X., Gains, M. and LeBlanc, A.C.(2004)."Neuroprotective functions of prion protein".*J Neurosci Res* **75**(2):153-61
- Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G. and 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):783-95
- Rudd, P.M., Wormald, M.R., Wing, D.R., Prusiner, S.B. and Dwek, R.A.(2001)."Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars".*Biochemistry* **40**(13):3759-66
- Rybner, C., Finel-Szermanski, S., Felin, M., Sahraoui, T., Rousseau, C., Fournier, J.G., Seve, A.P. and Botti, J.(2002)."The cellular prion protein: a new partner of the lectin CBP70 in the nucleus of NB4 human promyelocytic leukemia cells".*J Cell Biochem* **84**(2):408-19
- Ryou, C., Prusiner, S.B. and Legname, G.(2003)."Cooperative binding of dominant-negative prion protein to kringle domains".*J Mol Biol* **329**(2):323-33

S

- Saborio, G.P., Permanne, B. and Soto, C.(2001)."Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding".*Nature* **411**(6839):810-3
- Saeki, K., Matsumoto, Y. and Onodera, T.(1996)."Identification of a promoter region in the rat prion protein gene".*Biochem Biophys Res Commun* **219**(1):47-52
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C. and Gibbs, C.J., Jr.(1993)."Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein".*J Biol Chem* **268**(27):20276-84
- Sakudo, A., Lee, D.C., Yoshimura, E., Nagasaka, S., Nitta, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., Lehmann, S., Itohara, S., Sakaguchi, S. and Onodera, T.(2004)."Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions".*Biochem Biophys Res Commun* **313**(4):850-5

- Sakurai-Yamashita, Y., Sakaguchi, S., Yoshikawa, D., Okimura, N., Masuda, Y., Katamine, S. and Niwa, M.(2005)."Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein".*Neuroscience* **136**(1):281-7
- Salamat, M.K., Dron, M., Chapuis, J., Langevin, C. and Laude, H.(2011)."Prion propagation in cells expressing PrP glycosylation mutants".*J Virol* **85**(7):3077-85
- Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di Giamberardino, L. and Moya, K.L.(1998)."Cellular prion protein localization in rodent and primate brain".*Eur J Neurosci* **10**(7):2464-71
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I. and 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):341-54
- Sarnataro, D., Paladino, S., Campana, V., Grassi, J., Nitsch, L. and Zurzolo, C.(2002)."PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts".*Traffic* **3**(11):810-21
- Sasisekharan, R., Raman, R. and Prabhakar, V.(2006)."Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans".*Annu Rev Biomed Eng* **8**(181-231
- Schmitt-Ulms, G., Hansen, K., Liu, J., Cowdrey, C., Yang, J., DeArmond, S.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Baldwin, M.A.(2004)."Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues".*Nat Biotechnol* **22**(6):724-31
- 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. and Prusiner, S.B.(2001)."Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein".*J Mol Biol* **314**(5):1209-25
- Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S. and 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):13326-31
- Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barritault, D. and Taraboulos, A.(2003)."Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis".*Biochem Biophys Res Commun* **312**(2):473-9
- Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S.L., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B.(1993)."Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes".*Cell* **73**(5):979-88
- Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B.(1999)."Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans".*Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26):15137-42
- Seko, A., Dohmae, N., Takio, K. and Yamashita, K.(2003)."Beta 1,4-galactosyltransferase (beta 4GalT)-IV is specific for GlcNAc 6-O-sulfate. Beta 4GalT-IV acts on keratan sulfate-related glycans and a precursor glycan of 6-sulfosialyl-Lewis X".*J Biol Chem* **278**(11):9150-8
- Sethi, S., Kerksiek, K.M., Brocker, T. and Kretzschmar, H.(2007)."Role of the CD8+ dendritic cell subset in transmission of prions".*J Virol* **81**(9):4877-80
- Shi, Y.(2003)."Mammalian RNAi for the masses".*Trends Genet* **19**(1):9-12
- Shyng, S.L., Heuser, J.E. and Harris, D.A.(1994)."A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits".*J Cell Biol* **125**(6):1239-50
- Shyng, S.L., Huber, M.T. and 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):15922-8

- Shyng, S.L., Lehmann, S., Moulder, K.L. and Harris, D.A.(1995)."Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells".*J Biol Chem* **270**(50):30221-9
- Shyu, W.C., Lin, S.Z., Chiang, M.F., Ding, D.C., Li, K.W., Chen, S.F., Yang, H.I. and Li, H.(2005)."Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model".*J Neurosci* **25**(39):8967-77
- Siciliano, R.A., Morris, H.R., Bennett, H.P. and Dell, A.(1994)."O-glycosylation mimics N-glycosylation in the 16-kDa fragment of bovine pro-opiomelanocortin. The major O-glycan attached to Thr-45 carries SO₄-4GalNAc beta 1-4GlcNAc beta 1-, which is the archetypal non-reducing epitope in the N-glycans of pituitary glyco hormones".*J Biol Chem* **269**(2):910-20
- Silbert, J.E. and Sugumaran, G.(2002)."Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate".*IUBMB Life* **54**(4):177-86
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F. and Caughey, B.(2005)."The most infectious prion protein particles".*Nature* **437**(7056):257-61
- Simonic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Cecilian, F. and Ronchi, S.(2000)."cDNA cloning of turtle prion protein".*FEBS Lett* **469**(1):33-8
- Simons, K. and Toomre, D.(2000)."Lipid rafts and signal transduction".*Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1):31-9
- Sipe, J.D.(1992)."Amyloidosis".*Annu Rev Biochem* **61**:947-75
- Skelton, T.P., Kumar, S., Smith, P.L., Beranek, M.C. and Baenziger, J.U.(1992)."Pro-opiomelanocortin synthesized by corticotrophs bears asparagine-linked oligosaccharides terminating with SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha".*J Biol Chem* **267**(18):12998-3006
- Snow, A.D., Kisilevsky, R., Stephens, C. and Anastassiades, T.(1987)."Characterization of tissue and plasma glycosaminoglycans during experimental AA amyloidosis and acute inflammation. Qualitative and quantitative analysis".*Lab Invest* **56**(6):665-75
- Snow, A.D., Mar, H., Nochlin, D., Sekiguchi, R.T., Kimata, K., Koike, Y. and Wight, T.N.(1990a)."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):1253-70
- Snow, A.D. and Wight, T.N.(1989)."Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses".*Neurobiol Aging* **10**(5):481-97
- Snow, A.D., Wight, T.N., Nochlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B.(1990b)."Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie".*Lab Invest* **63**(5):601-11
- Somerville, R.A., Birkett, C.R., Farquhar, C.F., Hunter, N., Goldmann, W., Dornan, J., Grover, D., Hennion, R.M., Percy, C., Foster, J. and Jeffrey, M.(1997)."Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows".*J Gen Virol* **78** (Pt 9)(2389-96
- Song, J., Giang, A., Lu, Y., Pang, S. and Chiu, R.(2008)."Multiple shRNA expressing vector enhances efficiency of gene silencing".*BMB Rep* **41**(5):358-62
- Soto, C.(2003)."Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases".*Nat Rev Neurosci* **4**(1):49-60
- Sperinde, G.V. and Nugent, M.A.(1998)."Heparan sulfate proteoglycans control intracellular processing of bFGF in vascular smooth muscle cells".*Biochemistry* **37**(38):13153-64
- Spielhaupter, C. and Schatzl, H.M.(2001)."PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways".*J Biol Chem* **276**(48):44604-12

Spudich, A., Frigg, R., Kilic, E., Kilic, U., Oesch, B., Raeber, A., Bassetti, C.L. and Hermann, D.M.(2005)."Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1".*Neurobiol Dis* **20**(2):442-9

Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. and Prusiner, S.B.(1987)."Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid".*Cell* **51**(2):229-40

Stahl, N. and Prusiner, S.B.(1991)."Prions and prion proteins".*FASEB J* **5**(13):2799-807

Stewart, R.S., Drisaldi, B. and Harris, D.A.(2001)."A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum".*Mol Biol Cell* **12**(4):881-9

Stewart, R.S. and Harris, D.A.(2003)."Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection".*J Biol Chem* **278**(46):45960-8

Strom, A., Wang, G.S., Picketts, D.J., Reimer, R., Stuke, A.W. and Scott, F.W.(2011a)."Cellular prion protein localizes to the nucleus of endocrine and neuronal cells and interacts with structural chromatin components".*Eur J Cell Biol*

Strom, A., Wang, G.S., Picketts, D.J., Reimer, R., Stuke, A.W. and Scott, F.W.(2011b)."Cellular prion protein localizes to the nucleus of endocrine and neuronal cells and interacts with structural chromatin components".*Eur J Cell Biol* **90**(5):414-9

Strumbo, B., Ronchi, S., Bolis, L.C. and Simonic, T.(2001)."Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein".*FEBS Lett* **508**(2):170-4

Sugahara, K.(1992)." [Structural heterogeneity in the carbohydrate-protein linkage region of proteoglycans: working hypothesis on glycosaminoglycan biosynthesis]".*Tanpakushitsu Kakusan Koso* **37**(11 Suppl):2002-7

Sugahara, K. and Kitagawa, H.(2000)."Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans".*Curr Opin Struct Biol* **10**(5):518-27

Sugahara, K. and Kitagawa, H.(2002)."Heparin and heparan sulfate biosynthesis".*IUBMB Life* **54**(4):163-75

Sugahara, K. and Mikami, T.(2007)."Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system".*Curr Opin Struct Biol* **17**(5):536-45

Sugahara, K., Yamashina, I., De Waard, P., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.(1988)."Structural studies on sulfated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 4-sulfate proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. Demonstration of the structure Gal(4-O-sulfate)beta 1-3Gal beta 1-4XYL beta 1-O-Ser".*J Biol Chem* **263**(21):10168-74

Sun, G., Guo, M., Shen, A., Mei, F., Peng, X., Gong, R., Guo, D., Wu, J., Tien, P. and Xiao, G.(2005)."Bovine PrPC directly interacts with alphaB-crystalline".*FEBS Lett* **579**(24):5419-24

Sunkesula, S.R., Luo, X., Das, D., Singh, A. and Singh, N.(2010)."Iron content of ferritin modulates its uptake by intestinal epithelium: implications for co-transport of prions".*Mol Brain* **3**(14)

Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M.W. and Morris, R.(2003)."The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein".*EMBO J* **22**(14):3591-601

Supattapone, S.(2004)."Prion protein conversion in vitro".*J Mol Med (Berl)* **82**(6):348-56

T

Tagliavini, F., Prelli, F., Porro, M., Rossi, G., Giaccone, G., Farlow, M.R., Dlouhy, S.R., Ghetti, B., Bugiani, O. and Frangione, B.(1994)."Amyloid fibrils in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (Indiana and Swedish kindreds) express only PrP peptides encoded by the mutant allele".*Cell* **79**(4):695-703

- Tanaka, M., Maeda, N., Noda, M. and Marunouchi, T.(2003)."A chondroitin sulfate proteoglycan PTPzeta /RPTPbeta regulates the morphogenesis of Purkinje cell dendrites in the developing cerebellum".*J Neurosci* **23**(7):2804-14
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. and 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):121-32
- Tateishi, J.(1996)."[Prion diseases]".*Nippon Naika Gakkai Zasshi* **85**(9):1605-7
- Taylor, D.R. and Hooper, N.M.(2007)."The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein".*Biochem J* **402**(1):17-23
- Taylor, D.R., Whitehouse, I.J. and Hooper, N.M.(2009)."Glypican-1 mediates both prion protein lipid raft association and disease isoform formation".*PLoS Pathog* **5**(11):e1000666
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and 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
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N. and Karamanos, N.K.(2010)."Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting".*FEBS J*
- Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Wrede, A., Wemheuer, W., Brenig, B., Kratzel, C., Lemmer, K. and Beekes, M.(2007)."Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie".*PLoS Pathog* **3**(5):e66
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C.(1996)."Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein".*Nature* **380**(6575):639-42
- Toida, T., Yoshida, H., Toyoda, H., Koshiishi, I., Imanari, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R. and Linhardt, R.J.(1997)."Structural differences and the presence of unsubstituted amino groups in heparan sulphates from different tissues and species".*Biochem J* **322** (Pt 2):499-506
- Tomasi, V.(2010)."Signal transduction in neurons: effects of cellular prion protein on fyn kinase and ERK1/2 kinase".*Immun Ageing* **7** Suppl 1(S5)
- Tremblay, P., Bouzamondo-Bernstein, E., Heinrich, C., Prusiner, S.B. and DeArmond, S.J.(2007)."Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo".*Brain Res* **1139**(60-7)
- Triantaphyllidou, I.E., Sklaviadis, T. and Vynios, D.H.(2006)."Detection, quantification, and glycotyping of prion protein in specifically activated enzyme-linked immunosorbent assay plates".*Anal Biochem* **359**(2):176-82
- Tumova, S., Hatch, B.A., Law, D.J. and Bame, K.J.(1999)."Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products".*Biochem J* **337** (Pt 3):471-81
- Turnbull, J., Powell, A. and Guimond, S.(2001)."Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator".*Trends Cell Biol* **11**(2):75-82
- Tuzi, N.L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R.M. and Manson, J.C.(2008)."Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection".*PLoS Biol* **6**(4):e100

U

Ullrich, S., Munch, A., Neumann, S., Kremmer, E., Tatzelt, J. and Lichtenthaler, S.F.(2010)."The novel membrane protein TMEM59 modulates complex glycosylation, cell surface expression, and secretion of the amyloid precursor protein".*J Biol Chem* **285**(27):20664-74

V

van Horssen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L.P., de Waal, R.M. and Verbeek, M.M.(2003)."Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders".*Lancet Neurol* **2**(8):482-92

Vana, K., Zuber, C., Nikles, D. and Weiss, S.(2007)."Novel aspects of prions, their receptor molecules, and innovative approaches for TSE therapy".*Cell Mol Neurobiol* **27**(1):107-28

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A. and Prusiner, S.B.(1996)."Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains".*Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25):14945-9

Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. and 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):2042-7

Vilette, D.(2008)."Cell models of prion infection".*Vet Res* **39**(4):10

Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M.F., Vilotte, J.L., Lehmann, S. and 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):4055-9

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. and Laude, H.(2001)."Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp".*J Virol* **75**(13):5977-84

Vlodavsky, I., Abboud-Jarrous, G., Elkin, M., Naggi, A., Casu, B., Sasisekharan, R. and Ilan, N.(2006)."The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis".*Pathophysiol Haemost Thromb* **35**(1-2):116-27

Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L. and Pecker, I.(1999)."Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis".*Nat Med* **5**(7):793-802

Vorberg, I., Raines, A. and Priola, S.A.(2004)."Acute formation of protease-resistant prion protein does not always lead to persistent scrapie infection in vitro".*J Biol Chem* **279**(28):29218-25

Vynios, D.H., Karamanos, N.K. and Tsiganos, C.P.(2002)."Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues".*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **781**(1-2):21-38

W

Wadsworth, J.D. and Collinge, J.(2007)."Update on human prion disease".*Biochim Biophys Acta* **1772**(6):598-609

Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J. and Collinge, J.(2001)."Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay".*Lancet* **358**(9277):171-80

Wang, H., Wan, J., Wang, W., Wang, D., Li, S., Liao, P., Hao, Z., Wu, S., Xu, J., Li, N., Ouyang, H. and Gao, H.(2011)."Overexpression of Shadoo protein in transgenic mice does not impact the pathogenesis of scrapie".*Neurosci Lett* **496**(1):1-4

Warner, R.G., Hundt, C., Weiss, S. and Turnbull, J.E.(2002)."Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein".*J Biol Chem* **277**(21):18421-30

Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A.B., Riek, R. and Meier, B.H.(2008)."Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core".*Science* **319**(5869):1523-6

Watson, D.J., Lander, A.D. and 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):31617-24

Watt, N.T., Taylor, D.R., Gillott, A., Thomas, D.A., Perera, W.S. and Hooper, N.M.(2005)."Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress".*J Biol Chem* **280**(43):35914-21

Watts, J.C., Huo, H., Bai, Y., Ehsani, S., Jeon, A.H., Shi, T., Daude, N., Lau, A., Young, R., Xu, L., Carlson, G.A., Williams, D., Westaway, D. and Schmitt-Ulms, G.(2009)."Interactome analyses identify ties of PrP and its mammalian paralogs to oligomannosidic N-glycans and endoplasmic reticulum-derived chaperones".*PLoS Pathog* **5**(10):e1000608

Watts, J.C. and Westaway, D.(2007)."The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction".*Biochim Biophys Acta* **1772**(6):654-72

Ween, M.P., Hummitzsch, K., Rodgers, R.J., Oehler, M.K. and Ricciardelli, C.(2011)."Versican induces a pro-metastatic ovarian cancer cell behavior which can be inhibited by small hyaluronan oligosaccharides".*Clin Exp Metastasis* **28**(2):113-25

Weigel, P.H., Hascall, V.C. and Tammi, M.(1997)."Hyaluronan synthases".*J Biol Chem* **272**(22):13997-4000

Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I. and 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):1296-300

Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M. and Winnacker, E.L.(1997)."RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP".*J Virol* **71**(11):8790-7

Westaway, D., DeArmond, S.J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S.L., Torchia, M., Carlson, G.A. and 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):117-29

Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A. and Prusiner, S.B.(2002)."Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography".*Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6):3563-8

Wong, B.S., Liu, T., Li, R., Pan, T., Petersen, R.B., Smith, M.A., Gambetti, P., Perry, G., Manson, J.C., Brown, D.R. and Sy, M.S.(2001)."Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein".*J Neurochem* **76**(2):565-72

X

Xia, G., Evers, M.R., Kang, H.G., Schachner, M. and Baenziger, J.U.(2000)."Molecular cloning and expression of the pituitary glycoprotein hormone N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase".*J Biol Chem* **275**(49):38402-9

Y

Yada, T., Gotoh, M., Sato, T., Shionyu, M., Go, M., Kaseyama, H., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y.D., Togayachi, A., Kudo, T., Watanabe, H., Narimatsu, H. and Kimata, K.(2003)."Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities".*J Biol Chem* **278**(32):30235-47

Yadavalli, R., Guttman, R.P., Seward, T., Centers, A.P., Williamson, R.A. and Telling, G.C.(2004)."Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrPSc modulates scrapie prion propagation".*J Biol Chem* **279**(21):21948-56

Yamaguchi, K., Matsumoto, T. and Kuwata, K.(2008)."Critical region for amyloid fibril formation of mouse prion protein: unusual amyloidogenic properties of the helix 2 peptide".*Biochemistry* **47**(50):13242-51

Yamauchi, S., Mita, S., Matsubara, T., Fukuta, M., Habuchi, H., Kimata, K. and Habuchi, O.(2000)."Molecular cloning and expression of chondroitin 4-sulfotransferase".*J Biol Chem* **275**(12):8975-81

Yap, Y.H. and Say, Y.H.(2011)."Resistance against apoptosis by the cellular prion protein is dependent on its glycosylation status in oral HSC-2 and colon LS 174T cancer cells".*Cancer Lett* **306**(1):111-9

Yehiely, F., Bamborough, P., Da Costa, M., Perry, B.J., Thinakaran, G., Cohen, F.E., Carlson, G.A. and Prusiner, S.B.(1997)."Identification of candidate proteins binding to prion protein".*Neurobiol Dis* **3**(4):339-55

Yin, X., Truty, J., Lawrence, R., Johns, S.C., Srinivasan, R.S., Handel, T.M. and Fuster, M.M.(2010)."A critical role for lymphatic endothelial heparan sulfate in lymph node metastasis".*Mol Cancer* **9**(316)

Yost, C.S., Lopez, C.D., Prusiner, S.B., Myers, R.M. and Lingappa, V.R.(1990)."Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein".*Nature* **343**(6259):669-72

Young, I.D., Willmer, J.P. and 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):202-9

Young, R., Passet, B., Vilotte, M., Crihiu, E.P., Beringue, V., Le Provost, F., Laude, H. and Vilotte, J.L.(2009)."The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis".*FEBS Lett* **583**(19):3296-300

Z

Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K.(2000)."NMR solution structure of the human prion protein".*Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1):145-50

Zamponi, G.W. and Stys, P.K.(2009)."Role of prions in neuroprotection and neurodegeneration: a mechanism involving glutamate receptors?".*Prion* **3**(4):187-9

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. and Martins, V.R.(2002)."Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection".*EMBO J* **21**(13):3307-16

Zhang, H., Muramatsu, T., Murase, A., Yuasa, S., Uchimura, K. and Kadomatsu, K.(2006a)."N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury".*Glycobiology* **16**(8):702-10

Zhang, H., Uchimura, K. and Kadomatsu, K.(2006b)."Brain keratan sulfate and glial scar formation".*Ann N Y Acad Sci* **1086**(81-90)

Zhang, X. and Li, J.P.(2010)."Heparan sulfate proteoglycans in amyloidosis".*Prog Mol Biol Transl Sci* **93**(309-34)

Zhao, H., Klingeborn, M., Simonsson, M. and Linne, T.(2006)."Proteolytic cleavage and shedding of the bovine prion protein in two cell culture systems".*Virus Res* **115**(1):43-55

Zocche Soprana, H., Canes Souza, L., Debbas, V. and Martins Laurindo, F.R.(2011)."Cellular prion protein (PrP(C)) and superoxide dismutase (SOD) in vascular cells under oxidative stress".*Exp Toxicol Pathol* **63**(3):229-36

Zomosa-Signoret, V., Mayoral, M., Limon, D., Espinosa, B., Calvillo, M., Zenteno, E., Martinez, V. and Guevara, J.(2011)."Sialylated and O-glycosidically linked glycans in prion protein deposits in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease".*Neuropathology* **31**(2):162-9

Zou, W.Q. and Gambetti, P.(2005)."From microbes to prions the final proof of the prion hypothesis".*Cell* **121**(2):155-7