



**HAL**  
open science

## Rôle du domaine N-terminal de la PrP dans la pathogenèse des maladies à prions

Paul Erlich

► **To cite this version:**

Paul Erlich. Rôle du domaine N-terminal de la PrP dans la pathogenèse des maladies à prions. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00433136

**HAL Id: tel-00433136**

**<https://theses.hal.science/tel-00433136>**

Submitted on 18 Nov 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*Université Joseph Fourier - Grenoble 1*  
*Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant*

Thèse

Pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences

**Discipline : Biologie**

**Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Présentée par

**Paul ERLICH**

**Rôle du domaine N-terminal de la PrP dans la  
pathogénèse des maladies à prions**

Soutenue publiquement le 20 Octobre 2009, devant le jury composé de :

Pr. Julian Garcia	Président
Pr. Sylvain Lehmann	Rapporteur
Dr. Robert B. Sim	Rapporteur
Dr. Human Rezaei	Examineur
Pr. Jean-Yves Cesbron	Directeur de Thèse

Thèse préparée au Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes  
CNRS UMR 5163

## REMERCIEMENTS

*J'exprime ma profonde reconnaissance aux membres du jury, Julian Garcia, Sylvain Lehmann, Robert Sim et Human Rezaei, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. En particulier, merci à Robert Sim et Sylvain Lehmann de tenir le rôle de rapporteurs de ce manuscrit.*

*Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, Jean-Yves Cesbron. Vous m'avez toujours considéré au-delà de mon simple rang de thésard et accordé toute votre confiance pour la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir rendu plus responsable, de m'avoir soutenu et d'avoir supporté mon caractère pendant tout ce temps ! Merci également à Marie-France Cesbron-Delauw de m'avoir accueilli au sein de l'unité LAPM.*

*Merci aux différents collaborateurs de ce projet pour leur aide et leur gentillesse : Gérard Arlaud, Nicole Thielens et Wai li Ling à l'IBS, et bien sûr Guy Schoehn et Marc Jamin à l'UVHCI. Grâce à ces personnes, j'ai pu m'ouvrir à d'autres connaissances et compétences.*

*Ces quatre années au sein de l'équipe prion m'ont beaucoup apporté, tant d'un point de vue personnel que scientifique, et il est évident que les personnes que j'ai côtoyées ont chacune une signification particulière pour moi... Catherine « Cat Ze Great », merci d'avoir toujours été là pour me motiver et m'aider, et pour tout ce que tu m'as transmis... Chantal « Chantalou », merci de ton soutien tout au long de ces années et de ton énergie de tous les jours (dont j'aimerais bien avoir ne serait-ce que la moitié)! Corinne « Coco », ma collègue élèveuse de rongeurs, la confidente de mes râleries, un grand merci pour ton aide, tes conseils et ton soutien, j'espère que l'avenir t'apportera beaucoup de bonnes choses... Salima « Mama », merci pour ta bonne humeur quotidienne quasi inébranlable et à tes talents de cuisinière que tu as bien voulu partager avec nous ! Jean, my squash nightmare, there are no words to say thank you enough for everything you have shared with me... So say we all !*

*Une pensée pour toutes les personnes dont j'ai croisé le chemin. Bertrand, Babeth, Aude, Manu, Marie, Kristell, Camille, Yolande, l'ensemble des animaliers de la PHTA...*

*Un grand merci pour votre aide et votre soutien ! Merci à l'ensemble des membres du LAPM pour votre gentillesse et votre disponibilité quand j'avais besoin de quelque chose, j'ai passé avec vous 4 super années !*

*Je ne peux pas oublier tous mes compagnons de formation, Alex, Julien, Jeanfi, Julie et tous les autres rescapés de notre promotion de M2. Je suis certain que notre réussite est en partie due à la solidarité et à l'amitié que nous avons développées au cours des années... Que votre route soit pleine de réussite et de bonheur ! Un grand merci à mes amis les plus proches, Thomas, Yos, Marion, pour votre soutien durant toutes ces années, même si ce que je fais vous semble encore flou... En tout cas, je vais enfin payer le ciné au tarif normal comme vous !*

*Un énorme merci à mes parents, pour leur soutien inconditionnel, pendant toutes ces années... Avec toute mon affection malgré les difficultés...*

*Enfin, merci à ma moitié, Marion, d'avoir choisi de faire un semestre en Immunologie au cours de son cursus... Le hasard fait parfois bien les choses... Merci d'être là en toutes circonstances... Avec tout mon amour.*

*"And above all things, never think that you're not good enough yourself. A man should never think that. My belief is that in life people will take you at your own reckoning."*

*Isaac Asimov*



## ABBREVIATIONS

<b>ATNC :</b>	Agent Transmissible Non Conventionnel
<b>CC :</b>	Cluster Chargé positivement
<b>Chi :</b>	Protéine chimérique PrP/Dpl
<b>CWD :</b>	Dépérissement chronique des cervidés
<b>Dpl :</b>	Protéine Doppel
<b>ESB :</b>	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
<b>EST :</b>	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
<b>FDC :</b>	Cellules folliculaires dendritiques
<b>GPI :</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>HD :</b>	Domaine Hydrophobe
<b>IFF :</b>	Insomnie Fatale Familiale
<b>iMCJ</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène
<b>MCJ :</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>OR :</b>	Région d'octapeptides
<b>PMCA :</b>	Protein Misfolding Cyclic Amplification
<b>PRNP :</b>	Gène codant la protéine prion humaine
<b>Prnp :</b>	Gène codant la protéine prion murine
<b>PrP* :</b>	Conformation amyloïdogène de la PrP
<b>PrP<sup>c</sup> :</b>	Forme cellulaire de la protéine prion
<b>PrP<sup>Res</sup> :</b>	Protéine prion résistante à la protéolyse
<b>PrP<sup>Sc</sup> :</b>	Forme Scrapie de la protéine prion
<b>PrP<sup>Sens</sup> :</b>	Protéine prion sensible à la protéolyse
<b>RMN :</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SEC :</b>	Chromatographie d'exclusion de taille
<b>Sho :</b>	Protéine Shadoo
<b>sMCJ :</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
<b>SNC :</b>	Système nerveux central
<b>Sprn :</b>	Gène codant la protéine Shadoo murine
<b>vMCJ</b>	Variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>ABBREVIATIONS</b> .....	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>5</b>
<b>1) INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b> .....	<b>8</b>
<b>2) PRESENTATION GENERALE DES MALADIES A PRIONS</b> .....	<b>12</b>
2.1) HISTORIQUE, CONCEPT DE LA PROTEINE INFECTIEUSE ET FORMES PATHOLOGIQUES .....	12
2.1.1) <i>Une protéine infectieuse : un concept évolutif</i> .....	12
2.1.2) <i>Formes mammifères des EST</i> .....	13
2.1.3) <i>Formes animales</i> .....	17
2.2) LA PRP <sup>C</sup> ET SES PROTEINES HOMOLOGUES : GENETIQUE, STRUCTURE ET EXPRESSION TISSULAIRE .....	19
2.2.1) <i>La PrP<sup>c</sup></i> .....	19
2.2.2) <i>Doppel</i> .....	26
2.2.3) <i>Shadoo</i> .....	29
2.3) LA PRP <sup>Sc</sup> : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET MECANISMES DE CONVERSION .....	30
2.3.1) <i>Caractéristiques biochimiques et structurales</i> .....	30
2.3.2) <i>Mécanismes de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup></i> .....	31
<b>3) AGREGATION DE LA PRP IN VITRO ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES</b> .....	<b>37</b>
3.1) LES MODELES D'AGREGATION DE LA PROTEINE PRION IN VITRO.....	37
3.1.1) <i>Les facteurs favorisant l'agrégation</i> .....	37
3.1.2) <i>Formation de fibres amyloïdes et intermédiaires amyloïdogéniques</i> .....	39
3.1.3) <i>L'influence de la partie N-terminale sur l'agrégation de la PrP</i> .....	41
3.2) PARTIE 1 DES RESULTATS: GRACE AU DOMAINE N-TERMINAL DE LA PRP, DOPPEL S'AGREGE D'UNE MANIERE SIMILAIRE A LA PRP <sup>Sc</sup> .....	42
3.2.1) <i>Avant-propos</i> .....	42
<u>ARTICLE 1</u> : « PRP N-TERMINAL DOMAIN TRIGGERS PRP <sup>Sc</sup> -LIKE AGGREGATION OF DPL » ..	43
3.2.2) <i>Résultats complémentaires et conclusion</i> .....	44
3.3) PRP <sup>C</sup> , PRP <sup>Sc</sup> ET COMPLEMENT .....	52
3.3.1) <i>Expression et fonction de la PrP<sup>c</sup> dans les cellules immunes</i> .....	52
3.3.2) <i>Fonction de la PrP<sup>c</sup> dans le système immunitaire</i> .....	52

3.3.3) <i>Rôle du système immunitaire dans la propagation des prions de la périphérie au système nerveux central</i> .....	54
3.3.4) <i>Interaction entre les protéines du complément et les isoformes de PrP</i> .....	62
3.4) PARTIE 2 DES RESULTATS : INTERACTION ENTRE C1Q ET LES FORMES OLIGOMERIQUE DE PRP ET CHIMERE .....	65
3.4.1) <i>Avant-propos</i> .....	65
<u>ARTICLE 2</u> : « COMPLEMENT PROTEIN C1Q FORMS A COMPLEX WITH CYTOTOXIC PRION PROTEIN OLIGOMERS ».....	66
3.4.2) <i>Résultats complémentaires et conclusion</i> .....	67
<b>4) DOMAINES FONCTIONNELS DE LA PRP ET AGREGATION IN VIVO.....</b>	<b>74</b>
4.1) MODELES D'ANIMAUX TRANSGENIQUES POUR L'ETUDE DE LA FONCTION DE LA PRP <sup>C</sup> ...	74
4.1.1) <i>Souris déficientes pour la PrP</i> .....	74
4.1.2) <i>Mutants pour les délétions amino-terminales</i> .....	76
4.2) DEUX EXEMPLES DE FONCTIONS POUR LA PRP <sup>C</sup> : ANTI-APOPTOTIQUE ET ANTI-OXYDANTE .....	80
4.2.1) <i>Fonction anti-apoptotique</i> .....	80
4.2.2) <i>Rôle de la PrP<sup>c</sup> dans l'homéostasie oxydative</i> .....	80
4.3) PARTIE 3 DES RESULTATS : FONCTION ET AGREGATION D'UN PRION SYNTHETIQUE N <sup>TER</sup> PRP/C <sup>TER</sup> DPL .....	81
4.3.1) <i>Avant-propos</i> .....	81
<u>ARTICLE 3</u> : « CHARACTERIZATION OF A SYNTHETIC PRION N <sup>TER</sup> PRP/C <sup>TER</sup> DOPPEL IN MICE » .....	82
4.3.2) <i>Résultats complémentaires et conclusion</i> .....	83
<b>5) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>87</b>
<b>6) REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>91</b>

# CHAPITRE 1

-

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

# 1) INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST), ou maladies à prions, constituent un ensemble de maladies neuro-dégénératives rares dont l'issue est toujours fatale. Elles sont à ce jour le seul exemple bien établi de maladies conformationnelles infectieuses. Ces maladies touchent aussi bien l'homme que l'animal. La transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) à l'homme par consommation de viande bovine contaminée a démontré le caractère transmissible de la maladie à travers les espèces mammifères, et montre à quel point les EST demeurent un sujet de préoccupation de santé publique.

L'évènement moléculaire clé des EST est la conversion d'une protéine ubiquitaire de l'hôte, la protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>), en une isoforme anormale, la PrP<sup>Sc</sup> (Sc pour Scrapie). Ces deux protéines diffèrent dans leur conformation, mais sont codées par un seul et même gène, *Prnp*. Contrairement à la PrP<sup>c</sup>, la PrP<sup>Sc</sup> présente une structure secondaire riche en feuillet  $\beta$  qui lui confère une résistance partielle à la dégradation par les protéases. La PrP<sup>Sc</sup> s'accumule principalement dans le système nerveux central sous forme d'agrégats protéiques et constitue le composant principal des fibres amyloïdes présentes dans le cerveau des sujets malades.

L'hypothèse du "tout protéique" proposée par Stanley Prusiner en 1982, postule que la conformation "anormale" de la PrP est l'unique constituant de l'agent infectieux des EST : la réaction de conversion PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est un processus autocatalytique, la PrP étant le seul constituant protéique impliqué. Cependant, la génération de l'infectiosité *in vitro* (c'est-à-dire dans un tube à essai à partir de constituants purifiés) n'a pas encore été complètement établie pour valider l'hypothèse du tout protéique. Pourtant, des avancées importantes ont été faites dans ce domaine au cours des dernières années, notamment concernant les mécanismes moléculaires de changement conformationnel à l'origine de l'agrégation de la PrP.

Jusque récemment, la majorité des travaux portant sur ce sujet se sont intéressés à caractériser les voies de repliements et d'agrégation de formes tronquées de la PrP, plutôt que de la protéine entière. Or, la PrP est composée de deux parties distinctes : une région C-terminale structurée majoritairement sous forme d'hélices  $\alpha$ , et une partie N-terminale flexible, dépourvue de structure secondaire, et qui possède des régions répétées riches en glycines. De nombreux travaux ont cherché à déterminer les régions d'intérêt dans les propriétés transmissibles de la PrP. Néanmoins, la synthèse de ces travaux est difficile à exploiter, car les résultats sont souvent contradictoires. Si la portion C-terminale de la PrP semble suffisante pour s'agréger en une isoforme infectieuse et neurotoxique, plusieurs travaux

ont mis en avant le fait que la partie N-terminale puisse jouer un rôle très important dans le processus d'agrégation. Divers résultats *in vitro* et *in vivo* tendent à montrer que les résidus de la cette région peuvent influencer sur l'état d'oligomérisation de la protéine PrP, mais également sur son potentiel neurotoxique.

Au cours de mon projet de thèse, nous avons cherché à apporter des éléments nouveaux pour comprendre le rôle de la partie N-terminale de la PrP dans les mécanismes d'agrégation, d'infectiosité et de neurotoxicité de la PrP. Contrairement aux approches par troncature de la PrP, notre stratégie a visé l'établissement de construction aussi similaires que possible à la protéine PrP originale.

Pour ce faire, nous avons utilisé la protéine Doppel, qui fait partie d'une famille de deux protéines homologues à la PrP. Doppel ne participe pas au processus pathologique des EST et son absence ne prévient pas l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup>, ni l'apparition des phénomènes histopathologiques associés aux maladies à prions. Malgré le peu d'homologie de séquence en acides aminés entre le domaine C-terminal de la PrP et Doppel, ceux-ci présentent de grandes similarités dans leur structure secondaire. Cette singularité est à l'origine d'une hypothèse, reprise par de nombreux groupes, qui stipule que Doppel puisse être convertie dans une isoforme protease-résistante "Dpl<sup>Sc</sup>".

Doppel ne possède pas de partie N-terminale non structurée. Nous avons cherché à rendre Doppel aussi proche que possible à la PrP d'un point de vue structurel. Dans ce dessein, nous avons construit des protéines chimériques composées de la partie flexible N-terminale de la PrP et de la partie C-terminale structurée de la Doppel, avec différentes jonctions. Pendant ma thèse, j'ai cherché à caractériser différentes propriétés de ces protéines, et à savoir si ces dernières pouvaient remplacer la PrP à la fois dans sa fonction, mais aussi dans sa capacité à être transconformée en un isoforme infectieux. Pour cela, j'ai utilisé deux approches complémentaires :

- *In vitro*, où les protéines chimériques ont été produites et étudiées sous forme recombinante. Cette approche s'articule autour de deux thèmes d'investigation. Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité de ces protéines chimériques à adopter des conformations et des propriétés biochimiques similaires à celles de la PrP<sup>Sc</sup>. Nous avons montré en particulier que lorsque la partie N-terminale de la PrP est greffée à Doppel, celle-ci est capable de former des formes oligomériques semblables à celles de la PrP<sup>Sc</sup>. Ces oligomères de chimère ont toutes les caractéristiques de la PrP<sup>Sc</sup> (riches en feuillets  $\beta$ ,

résistants à la protéolyse, capacité à former des formes fibrillaires matures). Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mieux comprendre les propriétés biochimiques des oligomères de chimère précédemment obtenus. Nous avons utilisé une propriété particulière de la PrP<sup>Sc</sup>, à savoir sa capacité à interagir avec la protéine C1q du système du complément et à déclencher son activation par la voie classique. Ces investigations nous ont conduits à explorer en détail la relation qui existe entre C1q et la PrP et à proposer un nouveau rôle pour C1q dans la pathogenèse des maladies à prions. Toutefois, lorsque nous avons étendu ces travaux aux protéines chimériques, nous avons pu établir que leur comportement vis-à-vis de l'activité de C1q différait de celui de la PrP<sup>Sc</sup>.

- *In vivo*, où nous avons établi et caractérisé des lignées de souris transgéniques exprimant les différentes protéines chimériques sous le promoteur endogène de la PrP. Dans cette approche, nous avons tout d'abord cherché à caractériser le potentiel des chimères à mimer la PrP<sup>c</sup> dans certaines de ses fonctions biologiques. Nous avons également testé leur capacité à être transconformées en un isoforme infectieux, en les inoculant avec une souche de tremblante de mouton adaptée à la souris. Nous avons pu montrer que les différentes protéines chimériques étaient exprimées de façon similaire à la PrP mais nous n'avons pas pu montrer qu'elles étaient capables de s'accumuler sous un isoforme de type « Dpl<sup>Sc</sup> ».

L'ensemble de nos données tend à montrer que partie N-terminale ne suffit pas à transformer Doppel en un prion synthétique. Cependant, une partie nos travaux apporte une vision nouvelle quant au rôle de la protéine C1q vis-à-vis d'intermédiaires oligomériques dans les pathologies neurodégénératives, et ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude d'autres maladies amyloïdogéniques.

# CHAPITRE 2

-

## PRESENTATION GENERALE DES MALADIES A PRION



## **2) PRESENTATION GENERALE DES MALADIES A PRIONS**

### **2.1) Historique, concept de la protéine infectieuse et formes pathologiques**

#### 2.1.1) Une protéine infectieuse : un concept évolutif

Les premières descriptions de moutons et chèvres atteints de tremblante remontent au milieu du 18<sup>ème</sup> siècle. La transmission expérimentale de la tremblante aux chèvres a par la suite été établie en 1939 par Cuille et Chelle. En 1920 et 1921, les docteurs Creutzfeldt et Jakob décrivent chez l'Homme une maladie du système nerveux central qui provoque des signes cliniques particuliers. Vingt ans plus tard, Carleton Gajdusek étudie le Kuru, une maladie décimant les aborigènes de la tribu des Fore en Papouasie-Nouvelle-Guinée. Les similitudes neuropathologiques existant entre le Kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) ont amené à penser qu'elles étaient peut-être dues au même agent pathogène (Gajdusek & Zigas, 1957). En 1966, Gajdusek démontre le caractère transmissible des EST humaines en transmettant le Kuru puis la MCJ à des chimpanzés (Gajdusek et al, 1966; Gibbs et al, 1968).

La période d'incubation des EST étant exceptionnellement longue, l'agent infectieux a initialement été considéré comme un virus lent (Cho, 1976). L'absence d'observation de particules virales ainsi que les propriétés de résistance très particulières aux agents de décontamination classiques (destruction des acides nucléiques par des rayonnements ionisants) ont induit la notion d'agent transmissible non conventionnel (ATNC) pour caractériser l'agent infectieux (Alper et al, 1967; Alper et al, 1966). L'étape clé dans l'historique de la recherche sur les EST a sans aucun doute été l'isolation, à partir de cerveaux de hamster infectés par une souche de Scrapie, de fractions contenant essentiellement des protéines (Bolton et al, 1982). Cette fraction, qui s'accumule de façon proportionnelle au titre infectieux, est alors nommée prion pour « protéine infectieuse » et correspond pour l'auteur à l'agent pathogène (Prusiner, 1982). C'est l'hypothèse du tout protéique. L'analyse de ces fractions permet la découverte d'une propriété cruciale du prion : sa remarquable résistance à la dégradation protéolytique qui lui permet de garder un titre infectieux identique après traitement enzymatique (McKinley et al, 1983).

Par la suite, le prion est identifié comme étant une protéine de l'hôte, présente non seulement dans le cerveau des animaux malades, mais aussi chez les animaux sains (Chesebro et al, 1985). Pour expliquer ce paradoxe, Prusiner émet l'hypothèse que cette protéine prion, ou PrP, codée par un gène unique, est présente sous deux conformations alternatives : la forme cellulaire normale ou PrP<sup>c</sup> et la forme associée à la pathologie ou PrP<sup>Sc</sup> (Basler et al, 1986). La théorie de Prusiner est par la suite confortée par un résultat décrit dans les années

90. Les souris dont le gène de la PrP a été invalidé ne sont pas sensibles à la pathologie lorsqu'elles sont infectées par des homogénats de cerveaux de souris atteintes de Scrapie (Bueler et al, 1993).

Depuis ces découvertes et malgré l'établissement de nombreux systèmes de conversion, la reproduction du caractère infectieux *in vitro* dans un système synthétique n'a pas clairement été établi et reproduit pour valider l'hypothèse de la protéine infectieuse (Kocisko et al, 1994; Saborio et al, 2001).

## 2.1.2) Formes mammifères des EST

### 2.1.2.1) Formes humaines

Les EST humaines se présentent sous trois formes: familiales, sporadiques et acquises. Les formes familiales ou génétiques sont associées à des mutations du gène codant la protéine prion alors que la cause de la maladie est inconnue pour les formes sporadiques. Les formes infectieuses surviennent suite à une exposition à l'agent infectieux. Quelle que soit leur origine, toutes les EST sont transmissibles à l'animal et à l'homme.

#### a) Les formes sporadiques

La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (sMCJ) représente 85% des cas des EST humaines, avec une prévalence de 1,5 cas par million par an. Son incidence est similaire entre homme et femme (Brown et al, 1987). Elle affecte principalement des individus âgés de 45 à 75 ans (60 ans en moyenne). Une fois la maladie déclarée, la mort de l'individu survient rapidement, dans un délai de 3 à 6 mois. Le gène *PRNP* présente un polymorphisme fréquent sur le codon 129 qui conduit à la traduction d'une méthionine ou d'une valine. Au sein de la population caucasienne, 52% des individus sont homozygotes en «méthionine» (M129M), 12% sont homozygotes en «valine» (V129V) et 36% sont hétérozygotes (M129V) (Collinge et al, 1991). Plus de 80% des cas de sMCJ sont homozygotes M129M (Palmer et al, 1991).

#### b) Les formes génétiques

Environ 15% des EST humaines sont familiales. Elles se caractérisent par une transmission autosomique dominante et sont toutes liées à des mutations dans le gène *PRNP*, situé sur le chromosome 20. Historiquement, les formes génétiques étaient classées selon les syndromes cliniques initiaux et consistaient en trois catégories : le syndrome de Gerstman –

Straussler – Sheinker (GSS), l’Insomnie Familiale Fatale (IFF) et la MCJ familiale. Le **Tableau 1** résume les principales caractéristiques de ces désordres ainsi que les mutations qui en sont responsables.

Syndrome	Principales mutations	Age d'apparition moyen	Durée d'incubation moyenne	Signes neuropathologiques et cliniques	référence
GSS	P102L G131V A117V	50 ans	40 mois	Ataxie cérébelleuse, syndrome pyramidal, démence tardive. Plaques amyloïdes	(Masters et al, 1981)
IFF	D178N	50 ans	12 mois	Insomnies, troubles moteurs, altérations cognitives	(Montagna et al, 2003)
fMCJ	E200K	60 ans	5 mois	Troubles cognitifs, ataxie, syndrome cérébelleux	(Capellari et al, 2005)

**Tableau 1 : Principales caractéristiques des formes génétiques des EST (adapté de (Kovacs et al, 2002; Kovacs et al, 2005).**

#### 2.1.2.2) Les formes acquises ou infectieuses

##### a) Le kuru

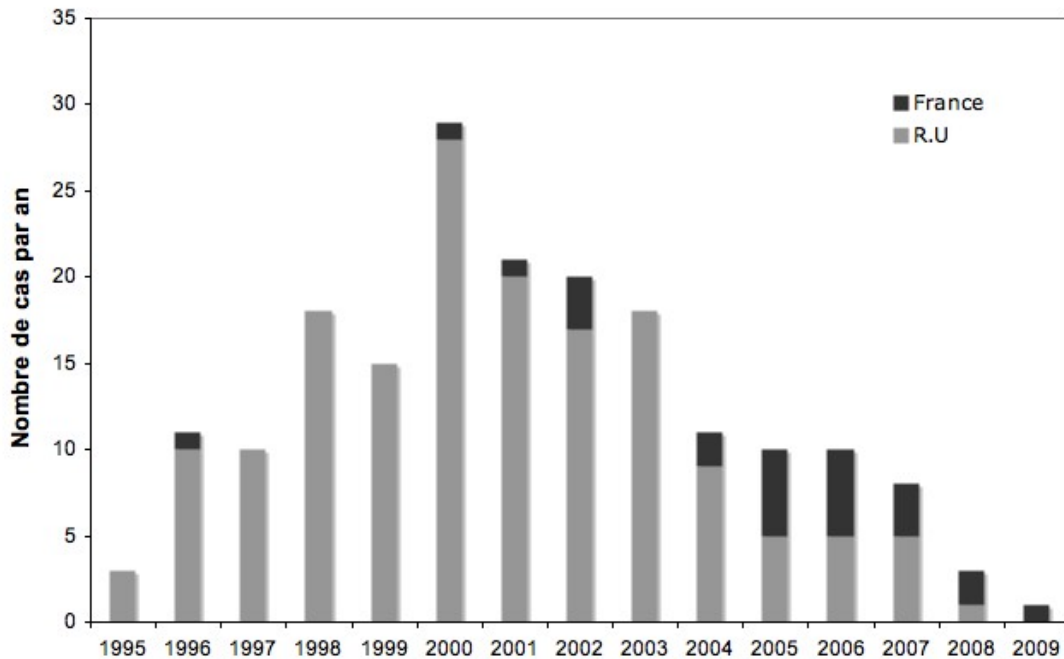
La maladie du kuru a été découverte par des observations épidémiologiques au milieu des années 1950 en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Gajdusek & Zigas, 1957). La maladie touchait principalement les femmes et les enfants des deux sexes. À l’occasion de rites funéraires cannibales, les individus consommaient des organes et des tissus de leurs proches décédés. Les hommes mangeaient généralement les parties considérées « nobles » (le cœur ou les muscles), tandis que les femmes et les enfants mangeaient essentiellement le cerveau et la rate, organes hautement infectieux. Le principal symptôme du Kuru est une ataxie cérébelleuse. Les autorités australiennes ont interdit le cannibalisme dans les années 50, ce qui a permis l’arrêt de la transmission du Kuru. La période d'incubation moyenne est d’environ 12 ans, mais elle peut dépasser 50 ans (Collinge et al, 2006). Le codon 129 du gène *PRNP* joue également un rôle important dans la période d’incubation du Kuru et la susceptibilité des individus à cette maladie.

### b) Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ)

Il s'agit d'une forme récente de MCJ décrite pour la première fois en 1996 au Royaume-Uni (Will et al, 1996). Dès la notification des premiers cas, un lien causal avec l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) a été évoqué (Will et al, 1996). Cette hypothèse sera confirmée par un ensemble de résultats expérimentaux. En effet, en Western blot, les profils de migration électrophorétique de PrP<sup>Sc</sup> issus de tissus infectés de vMCJ ou d'ESB sont tout à fait comparables (Collinge et al, 1996; Hill et al, 1997). De plus, la transmission expérimentale de l'ESB et du vMCJ à des souris montre que ces deux agents possèdent des propriétés biologiques indiscernables (Bruce et al, 1997).

Au 3 août 2009, on dénombre 164 cas confirmés au Royaume-Uni et 24 en France (**Figure1**). Sur le plan épidémiologique, cette forme touche des sujets plus jeunes, âgés de 26 ans en moyenne, avec une durée d'évolution plus longue (moyenne de 14 mois) que pour la forme sporadique (Knight, 2006). La symptomatologie débute par des troubles psychiatriques et du comportement avec dépression, anxiété, repli social, trouble de la mémoire associés à des douleurs persistantes. La survenue de troubles neurologiques (ataxie, mouvements anormaux) se produit à 2 mois environ (Knight, 2006).

Tous les cas confirmés sont actuellement homozygotes en méthionine pour le codon 129. Cependant, par analogie avec les autres formes acquises, des cas porteurs des génotypes Methionine-Valine et Valine-Valine peuvent apparaître, avec un phénotype plus ou moins conservé et un délai d'apparition de la maladie plus long. Le polymorphisme représenterait donc un facteur de susceptibilité à l'infection ou un facteur influençant la durée du temps d'incubation. Des souris transgéniques humanisées et hétérozygotes M129V développent la maladie (après infection par une souche adaptée de vMCJ) (Asante et al, 2006). Le génotype M129V est le plus courant chez l'Homme et ce travail montre que même les individus hétérozygotes pourraient à terme développer une maladie.



**Figure 1 : Incidence des cas fatals de vCJD au Royaume-Uni et en France.** Les données sont datées du 3 août 2009, et proviennent de l'unité nationale de surveillance MCJ à Edimbourg (NCJDSU, <http://www.cjd.ed.ac.uk/>).

### c) Les formes iatrogènes de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (iMCJ)

On désigne par MCJ **iatrogènes** les différents cas de MCJ contractés accidentellement à l'occasion d'interventions médicales. Elles ne représentent que 1% des cas de MCJ.

En 1977 ont été rapportés deux cas de MCJ contractés par des patients, 2 ans après des enregistrements d'électroencéphalogrammes utilisant l'implantation d'électrodes profondes (Bernoulli et al, 1977) qui avaient été utilisées chez un patient diagnostiqué de MCJ post mortem. Plusieurs cas de MCJ provoquée à la suite d'une greffe de cornée ont été décrits, parfois avec un délai de 30 ans entre la greffe et le développement de la maladie (Heckmann et al, 1997). Ces cas sont dus aux traitements inadaptés de décontamination du matériel chirurgical. Sans décontamination comprenant un traitement à la soude (1M) et un autoclavage à haute température, l'agent infectieux peut subsister pendant plusieurs années sur du matériel chirurgical (Weissmann et al, 2002).

Cent trente six cas de MCJ liés à des greffes de duremère ont été identifiés dans le monde (Hoshi et al, 2000). Le temps de latence entre la greffe et le début des signes cliniques est en moyenne de 7 ans. Les traitements à base d'hormone de croissance ont été initiés dans les années 1950, pour plus plusieurs dizaine de millier d'enfants souffrant d'une insuffisance

de synthèse de cette hormone. L'hormone était purifiée à partir d'hypophyses prélevées sur des cadavres de patients décédés dans les hôpitaux. Plus de 160 cas ont été décrits à l'échelle mondiale, notamment en France, aux Etats-Unis, au Royaume-Uni, et en Nouvelle-Zélande. La période d'incubation moyenne de ces cas s'étend de 4,5 à 25 ans. Dans la grande majorité de cas, on constate un syndrome cérébelleux progressif suivi de démence.

Le risque lié à une contamination par transfusion sanguine n'est pas à écarter. En effet, différentes publications ont montré que l'agent infectieux de l'ESB pouvait être transmis à des moutons par transfusion sanguine (Houston et al, 2000; Hunter & Houston, 2002). Plus récemment, plusieurs études rapportent des cas de patients ayant développés une vMCJ après avoir été transfusé avec le sang d'un donneur décédé quelques années plus tard de vMCJ (Llewelyn et al, 2004; Peden et al, 2004; Wroe et al, 2006).

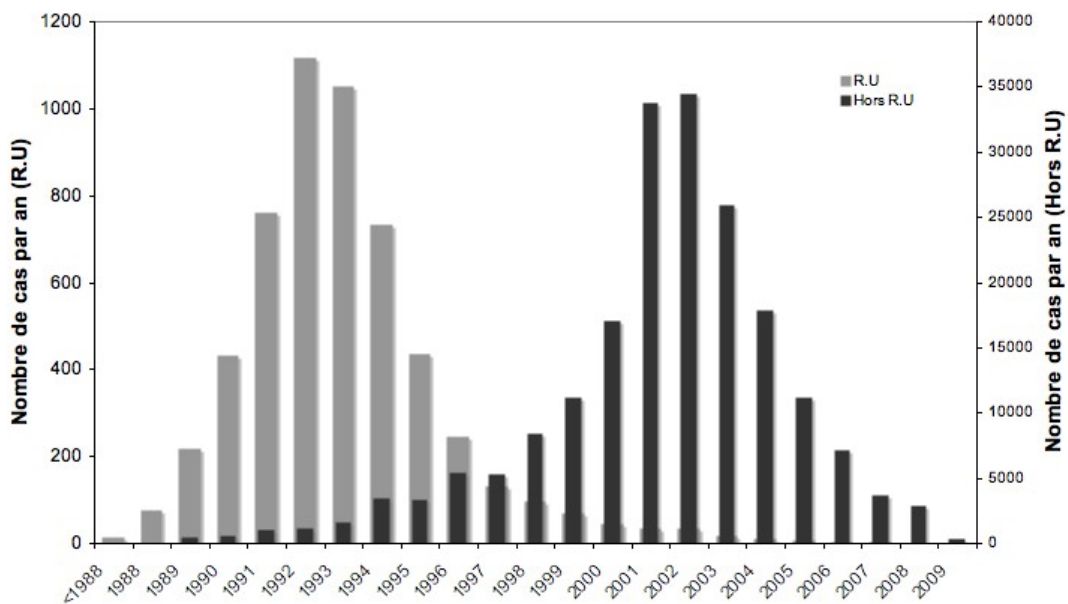
### 2.1.3) Formes animales

#### 2.1.3.1) La tremblante du mouton (Scrapie)

La Scrapie est une maladie qui affecte majoritairement les moutons et les chèvres, et dont les premiers cas ont été décrits dans les années 1730 dans divers pays d'Europe et du Moyen-Orient. Cette pathologie existe sous forme endémique dans toutes les régions du monde, sauf en Australie et en Nouvelle-Zélande. La durée de la phase clinique peut s'étendre de 2 semaines à 6 mois. Les premiers signes cliniques sont un comportement social inhabituel, suivi d'une ataxie. L'animal se gratte à cause de l'apparition d'un prurit dorsolombaire, conduisant à des écorchures caractéristiques. De nombreuses études ont mis en évidence une susceptibilité génétique à la tremblante associée au polymorphisme du gène PRNP. Dans ce gène, situé sur le chromosome 13 chez le mouton, 3 codons variables ont été identifiés comme étant particulièrement importants : ils sont situés en position 136 (alanine A ou valine V), 154 (arginine R ou histidine H) et 171 (R, H ou glutamine Q). A l'état homozygote, l'allèle A136R154R171 (ARR) confère une résistance à la maladie, cette résistance diminuant à l'état hétérozygote. Les allèles VRQ et ARQ sont considérés comme des allèles de susceptibilité à la tremblante (Hunter, 2007). La sélection génétique de l'allèle de résistance ARR, à travers un programme de la communauté, permet d'envisager l'éradication de la Scrapie.

### 2.1.3.2) L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

La maladie est apparue au Royaume-Uni en 1986. En 1988, l'ESB est classée dans la famille des encéphalopathies spongiformes. Ceci a été démontré à la fois par la présence des lésions neurodégénératives caractéristiques des EST, mais également par la mise en évidence de l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau des bovins malades (Hope et al, 1988). Les principaux symptômes décrits sont des troubles moteurs et comportementaux. L'animal développe une certaine agressivité, puis il est touché par une ataxie au niveau du train postérieur. L'utilisation des farines de viandes et d'os contaminés, distribués comme compléments protéiques dans l'alimentation des bovins, a été rapidement mise en cause par des études épidémiologiques (Wilesmith et al, 1992). L'origine de cet agent infectieux présent dans ces compléments reste encore discutée. L'interdiction des farines de viandes et d'os dans l'alimentation des bovins et l'abattage systématique des troupeaux dès la découverte d'un animal atteint en Grande-Bretagne ont permis de rompre le cycle de contamination chez les bovins (**Figure 2**).



**Figure 2 : Cas de BSE reportés au Royaume-Uni et à travers le monde, de 1988 à 2009.** Les données sont datées du 30 juin 2009, et proviennent de L'organisation mondiale de la santé animale (OIE, [http://www.oie.int/eng/en\\_index.htm](http://www.oie.int/eng/en_index.htm)).

### 2.3.1.3) Le dépérissement des cervidés (CWD)

Le dépérissement chronique des cervidés (« Chronic Wasting Disease ») est une EST affectant les élans et les cerfs aux Etats-Unis et au Canada. La maladie a été initialement

décrite chez des cerfs d'élevage dans les années 1960, mais elle est néanmoins la seule EST qui touche également des animaux sauvages (Miller & Williams, 2004). La Scrapie et le CWD présentent des caractéristiques communes, essentiellement dans l'accumulation précoce de la PrP<sup>Sc</sup> dans les tissus lymphoïdes suivie d'une accumulation dans le système nerveux central. La distribution de la PrP<sup>Sc</sup> contribue à l'efficacité apparente de la transmission horizontale de la maladie probablement par voie orale. L'éradication de la maladie est en cours chez les cervidés d'élevage, mais semble difficilement envisageable à l'état sauvage (Sigurdson & Aguzzi, 2007).

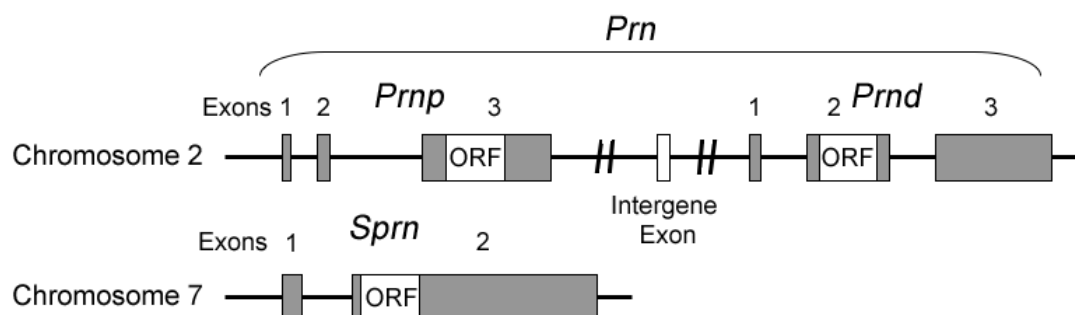
## **2.2) La PrP<sup>c</sup> et ses protéines homologues : génétique, structure et expression tissulaire**

### 2.2.1) La PrP<sup>c</sup>

#### 2.2.1.1) Génétique

La protéine prion est encodée par un gène appelé *PRNP* situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'Homme, et par le gène *prnp* situé sur le chromosome 2 chez la souris. Chez l'Homme et le hamster, le gène est constitué de deux exons, alors qu'il est composé de deux introns et trois exons chez la souris, le mouton et les bovins. La séquence est hautement conservée au sein des mammifères, avec plus de 80% d'homologie entre les espèces (Oesch et al, 1991). La phase ouverte de lecture est localisée sur un seul exon (**Figure 3**), le dernier, (Kretzschmar et al, 1986), ce qui indique que la PrP<sup>Sc</sup> ne peut être le résultat d'épissages alternatifs. Le promoteur de *prnp*, situé en amont du deuxième exon, ne contient pas de TATAbox et présente un enrichissement de la séquence en GC (Baybutt & Manson, 1997). Il présente ainsi les caractéristiques générales des gènes dits « de ménage » exprimés de manière constitutive.





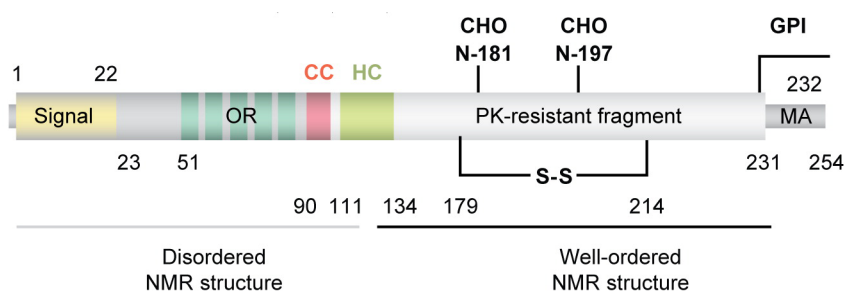
**Figure 3 : Représentations schématiques des gènes *Prnp*, *Prnd* et *Sprn* de la souris encodant respectivement les protéines PrP, Doppel et Shadoo.** Adapté de (Watts & Westaway, 2007).

### 2.2.1.2) Structure

La PrP<sup>c</sup> est une sialoglycoprotéine membranaire de 253 acides aminés chez l'Homme (254 pour le hamster et la souris) (Stahl et al, 1987). Après maturation, elle contient 209 acides aminés (résidus 23 - 231) chez l'homme. Fonctionnellement, la PrP présente deux régions d'intérêt et de propriétés particulières (**Figure 4**):

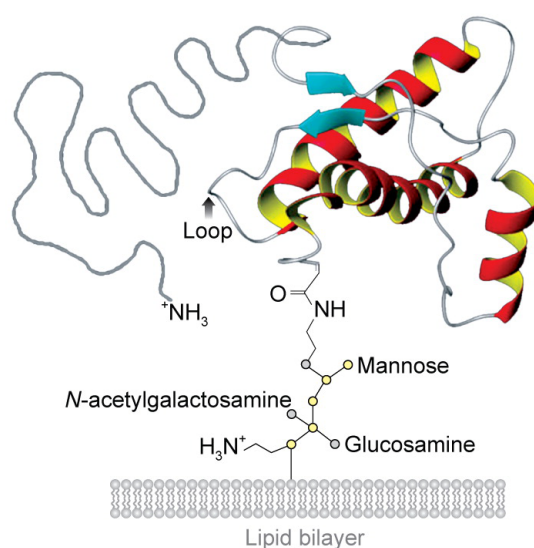
- La région des octapeptides, comprise entre les **résidus 51 à 91**, correspond selon les espèces à une répétition de 4 à 8 séquences consensus (PHGGGWGQ). Dans tous les espèces, ces séquences présentent une capacité à lier les ions divalents, avec une affinité de l'ordre du micromolaire pour le cuivre, et une affinité plus faible pour le zinc ou le manganèse (Brown et al, 1997a).

- La région du cœur hydrophobe, comprise entre les **résidus 113 et 127**, est constituée d'un enchaînement de 15 résidus (AGAAAAGAVVGLGG) représentant un domaine totalement conservé entre les espèces mammifères. Des mutations dans cette région peuvent conduire à l'expression d'une forme transmembranaire aberrante de la PrP<sup>c</sup> (Hegde et al, 1998). Chez l'Homme, la mutation ponctuelle d'un acide aminé dans ce domaine (A117V) suffit à provoquer un syndrome GSS. Cette région apparaît de première importance dans la conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Ce point sera discuté dans les paragraphes 3.1.3 et 4.1.2) (Chabry et al, 1998).



**Figure 4 : Représentation schématique de la structure primaire de la PrP<sup>c</sup> et de ses modifications post-traductionnelles.** Signal : peptide signal ; OR : octapeptides ; CC : cluster chargé ; HC : cœur hydrophobe ; S-S : pont disulfure ; MA : ancrage à la membrane ; GPI : glycosyl phosphatidyl inositol ; CHO : sites de N-glycosylation. D'après (Aguzzi et al, 2008b).

La résolution de la structure tridimensionnelle a été obtenue à partir de PrP recombinantes purifiées. Les études biophysiques et structurales utilisant des techniques de spectroscopie infra-rouge, de dichroïsme circulaire et résonance magnétique nucléaire ont permis de montrer que la PrP<sup>c</sup> comporte deux régions distinctes : une région carboxy-terminale structurée de manière globulaire (« C-ter ») et une région amino-terminale (« N-ter ») peu structurée (Riek et al, 1996; Wuthrich & Riek, 2001; Zahn et al, 2000). Le domaine C-terminal est constitué de 3 hélices  $\alpha$  (42% des acides aminés), appelées H1, H2 et H3, et de 2 petits feuilletts  $\beta$  anti-parallèles (3% des acides aminés) (Pan et al, 1993) (**Figure 5**). L'ensemble de la structure est stabilisé par un pont disulfure intra-chaîne reliant les hélices 2 et 3.



**Figure 5: Structure tertiaire de la PrP<sup>c</sup> déterminée par RMN.** Les hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge, les feuilletts  $\beta$  anti-parallèles en bleu. La région non structurée N-terminale est représentée en gris. D'après (Aguzzi et al, 2008b).

### 2.1.2.3) Trafic et modifications post-traductionnelles

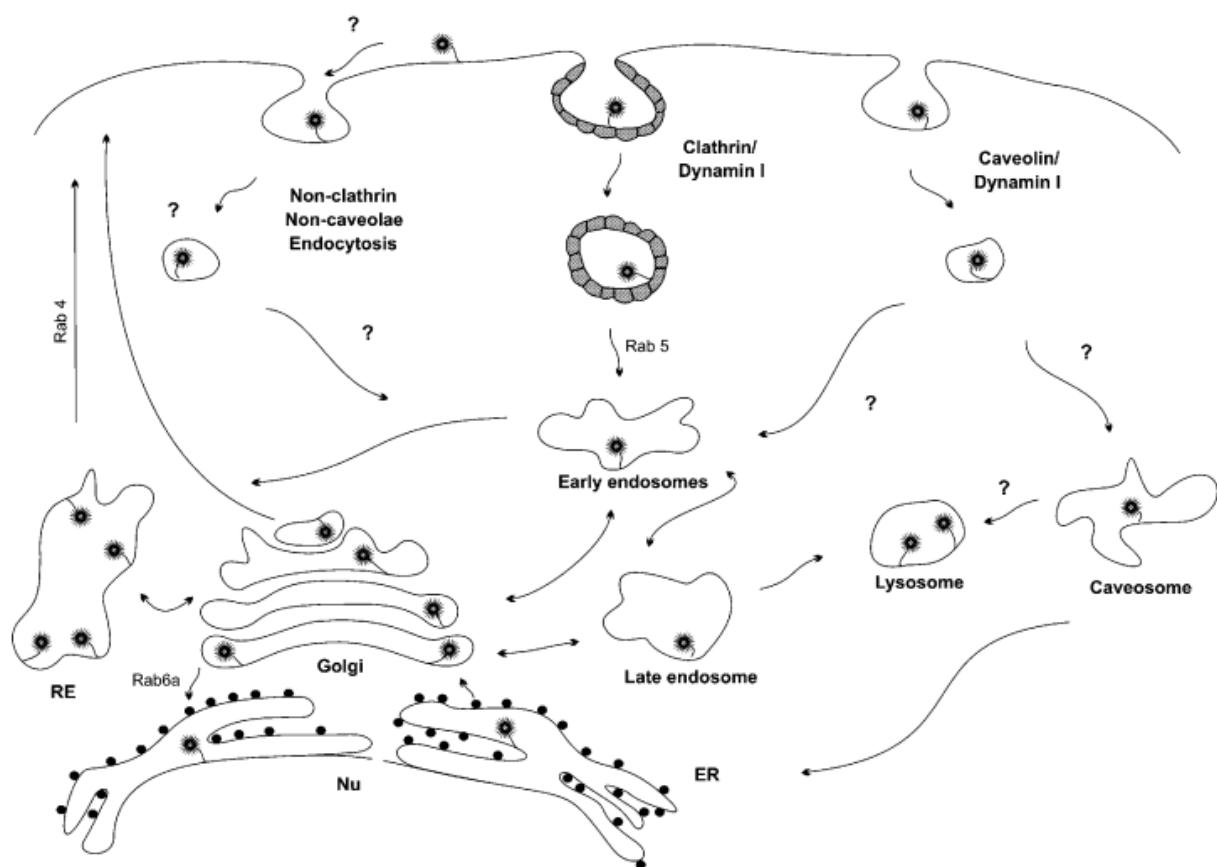
#### a) Trafic

La PrP<sup>c</sup> est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) rugueux, puis transite dans l'appareil de Golgi avant d'être adressée à la membrane. La PrP<sup>c</sup> est ancrée à la surface externe de la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un groupement Glycosylphosphatidylinositol (GPI), constitué d'une partie lipidique et d'une partie glucidique. La chaîne glucidique est constituée de résidus d'acide sialique et la partie lipidique d'acide stéarique. La PrP<sup>c</sup> est localisée dans une région particulière de la membrane plasmique, dans des régions riches en cholestérol et en glycosphingolipides, appelées radeaux lipidiques (Tiveron et al, 1994). Ces structures sont également dénommées « Detergent Resistant Microdomains » (DRM) à cause de leur faible solubilisation dans des détergents non ioniques (Simons & Toomre, 2000). Des expériences de pulse-chase réalisées sur des neuroblastomes murins ont montré que la demi-vie de la PrP<sup>c</sup> est de 3 à 6 heures (Caughey et al, 1989). Dans des cultures primaires d'origine neuronale ou lymphoïde, la demi-vie est plus court, d'une heure environ (Parizek et al, 2001). La majorité des molécules de PrP<sup>c</sup> sont recyclées à la membrane plasmique et seulement 10% d'entre elles sont dégradés à chaque cycle d'internalisation, par la voie lysosomiale (Lehmann et al, 1999). Les voies d'endocytose empruntées par la PrP<sup>c</sup> sont encore mal connues, et ne sont pas exclusives d'une voie particulière. Certaines études décrivent une voie exclusivement dépendante des cavéoles, tandis que d'autres auteurs privilégient une endocytose médiée par des puits recouverts de clathrine (Shyng et al, 1994; Vey et al, 1996). Il est possible que l'une de 2 voies soit favorisée en fonction du type cellulaire utilisé, ou encore que ces 2 voies coexistent dans une même cellule (Fivaz et al, 2002). Finalement, une voie dépendante de la présence de cuivre pourrait également exister. Ainsi, les trois mécanismes d'endocytose de la PrP<sup>c</sup> sont représentés par la **Figure 6** :

- **Les cavéoles** sont définies comme des invaginations de la membrane plasmique, en relation avec les rafts lipidiques. Ces organelles dépourvues de clathrine contiennent des lipides et protéines résistantes aux détergents et sont responsables de l'internalisation des protéines ancrées par un GPI (Anderson, 1998). Il a été montré que la PrP<sup>c</sup>, qui fait partie de ces protéines, emprunte une voie d'endocytose utilisant la voie des cavéoles (Peters et al, 2003).

- **Les puits recouverts de clathrine** constituent une voie d'internalisation qui impose une interaction entre les protéines transmembranaires et la clathrine sous-membranaires *via* le complexe adaptateur hétérotétramérique AP-2, moteur de l'invagination. Pour la PrP<sup>c</sup> cette voie d'endocytose a été décrite dans un modèle de cellules épithéliales CHO (Shyng et al, 1994) et de Neuroblastomes N2a (Magalhaes et al, 2002). L'observation en microscopie électronique de cultures primaires de neurones suggèrent une relocalisation de la PrP<sup>c</sup> vers les puits recouverts de clathrine lors de l'endocytose (Sunyach et al, 2003).

- **La voie clathrine et cavéole indépendante** pourrait co-exister avec celles responsables de la voie constitutive. L'exposition à des concentrations de l'ordre de 100 à 500  $\mu$ M de cuivre provoque en effet une endocytose immédiate de la PrP<sup>c</sup> (Pauly & Harris, 1998).



**Figure 6: Les voies d'endocytose de la PrP<sup>c</sup>.** A la membrane plasmique, la PrP<sup>c</sup> peut être internalisée de façon constitutive à l'aide de Cu<sup>2+</sup> extracellulaire. Dans les cellules neuronales, la voie d'internalisation majoritaire se fait par un mécanisme clathrine-dépendant. L'endocytose de la PrP<sup>c</sup> par les cavéoles est également possible. D'après (Prado et al, 2004).

### b) Modifications post-traductionnelles

Dans le réticulum endoplasmique, la PrP<sup>c</sup> subit quatre modifications post-traductionnelles principales : le retrait du peptide signal amino-terminal (22 résidus) ; la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines 179 et 214 ; l'addition aléatoire de

deux groupements oligosaccharidiques sur les résidus Asn 181 et 197 qui génère des isoformes de PrP non-, mono- ou di-glycosylées ; le clivage du peptide signal carboxy-terminal de 23 résidus suivi de l'addition d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique.

La PrP<sup>c</sup> peut subir plusieurs clivages à la surface de la membrane. Le principal clivage a lieu entre les acides aminés 111 et 112 et conduit à la libération d'un fragment amino-terminal (N1) et à la formation d'une PrP<sup>c</sup> tronquée (C1) qui reste liée à la membrane (Chen et al, 1995; Jimenez-Huete et al, 1998). La perte du domaine N-terminal contenant les sites de liaison au cuivre a pour conséquence une demi-vie du fragment C1 accrue par rapport à celle de la PrP<sup>c</sup>. Deux métalloprotéases transmembranaires ADAM 10 et ADAM 17 (A Disintegrin And Metalloprotease) seraient responsables de ce clivage (Cisse et al, 2005).

Un second clivage peut se produire au niveau des résidus 90-96, générant ainsi les fragments N2 et C2 (Mange et al, 2004). Ce clivage proche de la région des octapeptides répétés serait dépendant des espèces réactives à l'oxygène et du cuivre (Yadavalli et al, 2004). Les formes tronquées de la PrP, ainsi que les fragments N1 et N2 sont détectés *in vivo* dans le cerveau, aussi bien chez des sujets sains que chez des sujets atteints d'EST. La proportion des différentes formes de PrP varie selon les régions neuro-anatomiques du cerveau (Beringue et al, 2003). La signification fonctionnelle et le rôle des fragments de ces clivages n'est pas encore déterminée.

La libération d'une forme soluble de la PrP<sup>c</sup> dans le milieu extracellulaire a été tout d'abord démontrée en culture cellulaire. La libération de PrP<sup>c</sup> a lieu après clivage dans la région du groupement GPI (Harris et al, 1993). *In vivo*, des formes solubles de la PrP<sup>c</sup> ont été retrouvées dans le liquide céphalorachidien (Tagliavini et al, 1992), dans les cellules du sang (MacGregor et al, 1999), ainsi que dans le sérum humain et murin (Parizek et al, 2001). De plus, la PrP<sup>c</sup> peut être libérée par les plaquettes activées (Perini et al, 1996). La quantité de PrP<sup>c</sup> ainsi clivée a été estimée dans les études *in vitro* par des expériences de pulse-chase et varie selon le type cellulaire concerné. Dans les neuroblastomes, on observe un taux de 10 à 30%, alors que dans les cultures primaires de splénocytes, ce taux peut atteindre 60 à 70% (Parizek et al, 2001). La présence de sérum dans le milieu semble augmenter la libération, ce qui suggère l'implication d'enzymes telles que les phospholipases C ou D. Enfin, l'action d'une métalloprotéase a également été mise en cause dans ce phénomène (Parkin et al, 2004).

Finalement, il a été récemment montré chez l'Homme que la PrP<sup>c</sup> pouvait être libérée par les plaquettes activées et les neurones, par sécrétion dans des exosomes (Alais et al, 2008; Faure et al, 2006; Robertson et al, 2006). Les exosomes, dont le diamètre est compris entre 30 et 100 nm, sont des vésicules issues de l'endocytose, enrichies en protéines. Leur fonction n'est pas encore clairement définie, mais leur rôle initial est probablement l'élimination des protéines non dégradées par le lysosome et des protéines endosomales.

### c) Expression tissulaire

La PrP<sup>c</sup> est une protéine ubiquitaire exprimée majoritairement dans le cerveau, mais aussi dans la quasi-totalité des organes (Bendheim et al, 1992; Chesebro, 1985; Robakis et al, 1986). Dans le système nerveux central, la PrP<sup>c</sup> est présente dans toute la substance grise, mais elle est absente de la substance blanche. Son niveau d'expression est le plus élevé dans l'hippocampe, le cortex et le striatum, puis elle présente des taux d'expression plus modérés dans le thalamus et le bulbe olfactif, et également le cervelet. Seule la couche moléculaire dans le cortex cérébelleux présente une expression abondante de la PrP<sup>c</sup> (Barmada et al, 2004). Parmi les différents types neuronaux, les neurones GABAergiques sont ceux qui expriment le plus fortement la PrP<sup>c</sup>, par rapport aux neurones cholinergiques et dopaminergiques (Ford et al, 2002). A l'échelle cellulaire, la PrP<sup>c</sup> est majoritairement retrouvée au niveau des boutons synaptiques des neurones (Fournier et al, 1995). La PrP<sup>c</sup> est également détectée dans d'autres types cellulaires du SNC, tels que les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules de Schwann, mais avec une moindre intensité (Follet et al, 2002; Ford et al, 2002). Ces données ont été principalement obtenues par des techniques basées sur la détection des ARN messagers et par western blot à l'aide d'anticorps anti-PrP.

Dernièrement, l'utilisation des modèles de souris transgéniques, chez lesquelles l'expression d'une protéine fluorescente GFP (Bailly et al, 2004; Lemaire-Vieille et al, 2000) ou de la  $\beta$ -galactosidase (Tremblay et al, 2006) est placée sous contrôle du promoteur du gène *prnp*, a permis de s'affranchir de certaines difficultés liées aux techniques traditionnelles. Chez la souris, au cours de la vie embryonnaire, la PrP<sup>c</sup> a pu être détectée dans les tissus du SNC (crêtes neurales) mais également dans d'autres organes (cœur, glandes surrénales, thyroïde).

Au niveau périphérique, la PrP<sup>c</sup> est présente dans la plupart des tissus mais à des taux différents. Au sein de chaque tissu ou organe, des sous-populations cellulaires expriment des quantités importantes de PrP<sup>c</sup>. Globalement, elle est exprimée à un niveau intermédiaire dans le cœur, les poumons, et les testicules et la rate et un niveau faible dans le foie et les muscles. Elle est également présente dans les cellules composant le réseau neuro-immunitaire : nerfs et ganglions périphériques, système nerveux parasymphatique, cellules présentatrices d'antigènes, lymphocytes et moelle osseuse. Il apparaît donc que la PrP<sup>c</sup> est présente dans tous les organes, seul le niveau d'expression est variable (Ford et al, 2002).

## 2.2.2) Doppel

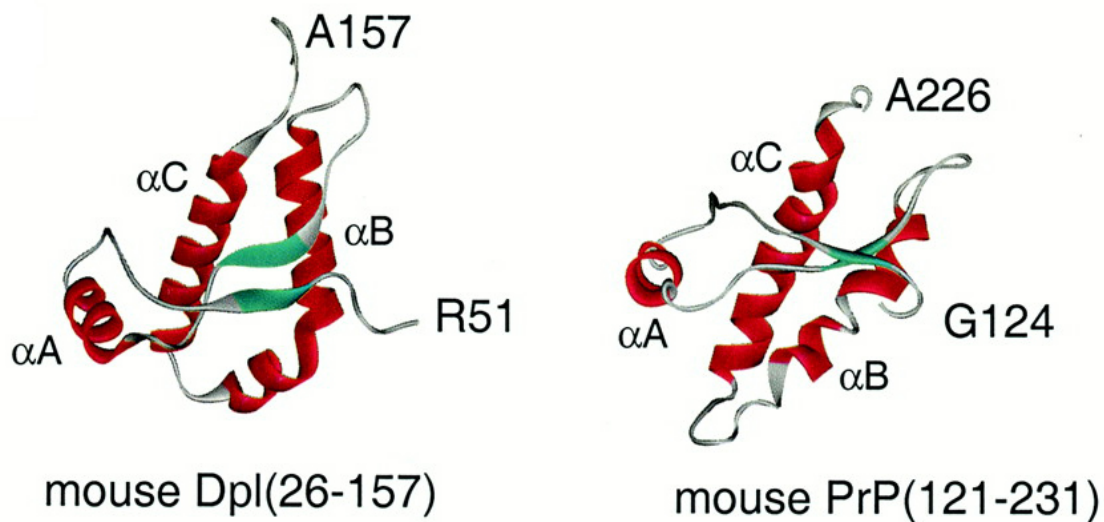
### 2.2.2.1) Génétique

Westaway et collaborateurs ont identifié la protéine Doppel (Dpl, double en allemand) en 1999 (Moore et al, 1999). Chez l'Homme, le gène de Doppel, *PRND*, se situe 27kb en aval du gène *PRNP*, alors que chez la souris, le gène *prnd* se situe 16 kb en aval du locus *prnp* (**Figure 3**). Ces deux gènes constituent donc une famille de gène nommée *Prn*, possédant chacun leur propre promoteur. Le gène *prnd* a été également identifié chez les bovins, les ovins et les caprins (Moore et al, 1999; Peoc'h et al, 2000; Tranulis et al, 2001; Uboldi et al, 2005). Il possède 3 exons et la totalité de la phase ouverte de lecture se situe sur le second exon. L'expression du gène *prnd* peut être régulée au niveau transcriptionnel. Des délétions sur la séquence de *prnd* ont permis de caractériser la région du promoteur (-185/+27) qui contient deux éléments de régulation en *cis*, une boîte CAAT et une boîte E (Nagyova et al, 2004). Le facteur de transcription USF-1 (upstream stimulatory factor-1) serait le principal facteur de transcription impliqué dans la régulation du gène *prnd* (Sepelakova et al, 2005). Les gènes *prnp* et *prnd* ne présentent pas une forte homologie de séquence (25% d'identité sur la séquence protéique), mais il semblerait qu'ils soient issus de la duplication d'un gène ancestral commun (Mastrangelo & Westaway, 2001; Mo et al, 2001).

### 2.2.2.2) Structure

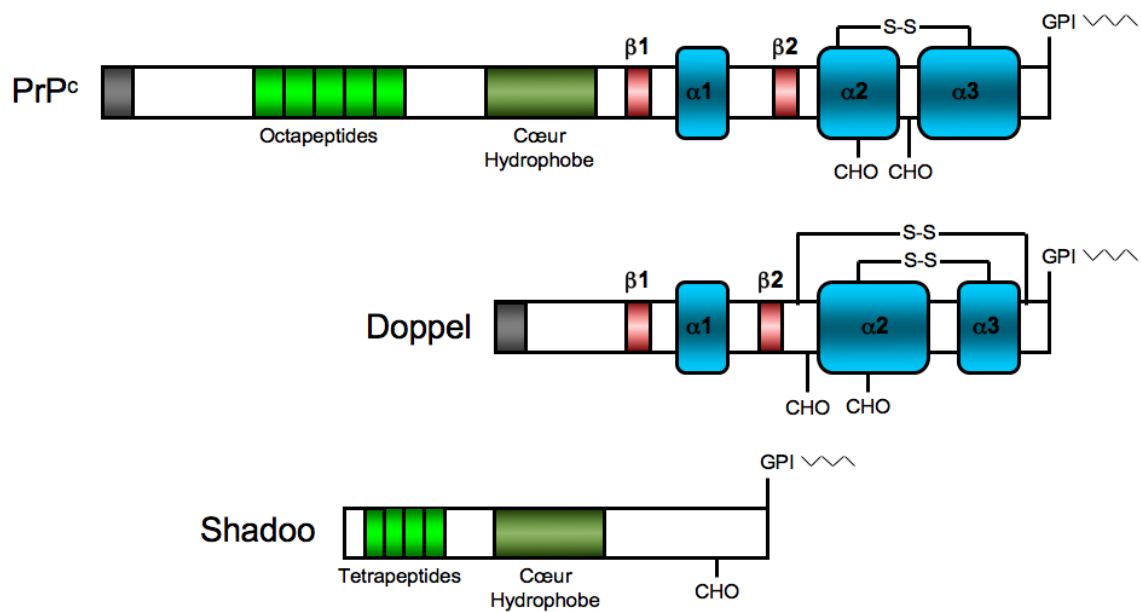
Doppel, comme la PrP<sup>c</sup>, est une protéine de 179 résidus (chez la souris) ancrée à la membrane par une GPI. La résolution de la structure de Dpl en RMN indique que les domaines C-terminaux de Dpl (résidus 58 à 179) et de la Pr P (résidus 121-231) présentent une structure tridimensionnelle extrêmement similaire (**Figure 7**). On retrouve une structure

caractérisée par 3 hélices  $\alpha$  et deux courts feuillets  $\beta$  anti-parallèles (Mo et al, 2001). L'analyse par dichroïsme circulaire révèle que Dpl possède essentiellement une structure en hélice  $\alpha$  (40%) (Lu et al, 2000). Les expériences de digestion trypsique et de spectrométrie de masse indiquent la présence de deux ponts disulfures : un premier, entre les résidus cystéines 109 et 143, qui est analogue au pont disulfure de la PrP<sup>c</sup>, et un second, entre les cystéines 95 et 148, qui pourrait intervenir dans la stabilisation conformationnelle de la protéine (Silverman et al, 2000) (Whyte et al, 2003) (**Figure 8**). Comme la PrP, Dpl possède également deux sites de N-glycosylation sur les résidus asparagine 99 et 111.



**Figure 7 : Comparaison de la structure en solution de la protéine Dpl(26-157) et du domaine C-terminal de la PrP(121-231).** La topologie globale des deux protéines murines est très similaire. D'après (Mo et al, 2001).





**Figure 8 : Représentation schématique des structures primaires de PrP, Doppel et Shadoo.** Doppel et PrP<sup>c</sup> présentent toutes deux un domaine C-terminal structuré, constitué de 3 hélices  $\alpha$  et de 2 courts feuillets  $\beta$ . Des séquences répétées sont présentes dans les protéines PrP<sup>c</sup> et Shadoo: les octapeptides de la PrP<sup>c</sup> sont capables de lier le cuivre et les tétrapeptides de Shadoo sont riches en résidus arginine et glycine. Le domaine central hydrophobe hautement conservé est représenté sur la PrP<sup>c</sup> et sur Shadoo. S-S: ponts disulfures; CHO: sites de N-glycosylation.

#### a) Expression tissulaire

Lorsque PrP et Dpl sont co-exprimées dans des cellules N2a, elle sont co-localisées dans les rafts lipidiques, et suivent les mêmes processus d'endocytose et d'internalisation (Massimino et al, 2004). Une autre étude démontre toutefois Dpl ne se situe pas dans les mêmes microdomaines membranaires que ceux occupés par la PrP<sup>c</sup> (Shaked et al, 2002). A l'inverse de la PrP, Dpl est très fortement et quasi exclusivement exprimée au niveau des testicules (Makrinou et al, 2002), en particulier dans les spermatozoïdes et les cellules de Sertoli (Peoc'h et al, 2002), et elle n'est que très peu exprimée dans les tissus du système nerveux central chez l'adulte. Au cours de l'embryogenèse, de faibles quantités de Dpl sont néanmoins détectées dans le cerveau (Moore et al, 1999).

Les souris knock out pour le gène *prnd* ne présentent aucun phénotype particulier au cours de leur développement. Une analyse plus approfondie a néanmoins montré que les mâles étaient stériles (Behrens et al, 2002), et présentaient des spermatozoïdes en nombre réduit, malformés, immobiles et incapables de fertiliser des ovocytes *in vitro*. Ces

observations suggèrent une fonction physiologique importante de Dpl au cours de la spermatogénèse.

L'absence de Dpl ne prévient pas l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> au cours de la physiopathologie des maladies à prion. Ceci a pu être observé par des expériences de neurogreffes : des tissus neuronaux issus de la différenciation de cellules ES *prnd*<sup>0/0</sup> et greffés chez un hôte *prnp*<sup>0/0</sup> sont aussi susceptibles à une infection par la Scrapie que les neurogreffes issues de cellules ES sauvages (Behrens et al, 2001). La surexpression transgénique de Dpl dans le SNC n'a également aucune conséquence sur le temps d'incubation ou l'apparition des symptômes après infection avec une souche de Scrapie murine (Tuzi et al, 2002), ce qui permet d'affirmer que Dpl ne participe pas en tant que tel au processus pathologique des EST (Peoc'h et al, 2003). Cette hypothèse peut-être envisagée dans la mesure où il a été montré qu'une forme tronquée en amino-terminale de la PrP<sup>c</sup> ( $\Delta$ 32-93), qui présente une grande homologie structurelle avec Dpl, peut être convertie en PrP<sup>Sc</sup> (Flechsigs et al, 2000).

### 2.2.3) Shadoo

Récemment, un gène présentant une forte homologie avec la séquence nucléotidique de *prnp* a été identifié, et nommé *Sprn* pour « shadow of the prion protein » (Premzl et al, 2003). Ce gène est hautement conservé à travers les espèces, puisqu'il a pu être identifié chez les rongeurs, les primates et les poissons. *Sprn* ne fait pas partie du locus *prn* et se situe sur les chromosomes 7 chez la souris et 10 et l'homme (**Figure 3**). Les études phylogénétiques suggèrent une origine antérieure de *sprn* par rapport à celle de *prnp* et *prnd* (Premzl et al, 2004). Comme pour la PrP et Dpl, la totalité de la phase ouverte de lecture est encodée dans un seul exon. Shadoo (Sho) est une glycoprotéine de 98 résidus qui possède comme la PrP et Dpl une séquence signal en N-terminal, une séquence d'ancrage GPI, ainsi qu'un site de N-glycosylation (Watts & Westaway, 2007). En revanche, Sho ne possède pas de résidus cystéine et reste dépourvue de pont disulfure. De ce fait, sa structure secondaire est flexible et ressemble à celle de la partie N-terminale de la PrP. Shadoo possède une région hydrophobe homologue à la PrP, composée de séries de séquences tétramériques riches en résidus glycine, sérine, alanine et arginine, ce qui suggère une homologie fonctionnelle avec la PrP. Globalement, Shadoo est proche de la partie N-terminale de la PrP<sup>c</sup> et semble ainsi dépourvue de tout élément associé à l'établissement d'une structure secondaire (**Figure 8**).

Shadoo est exprimée exclusivement dans le SNC, et on la détecte uniquement dans certains types cellulaires spécifiques, à l'inverse de la PrP. Elle est fortement exprimée dans

les cellules de Purkinje (cervelet) et les cellules pyramidales (hippocampe) au niveau des prolongements dendritiques (Watts et al, 2007). La fonction de Sho est inconnue, mais une hypothèse suggère que cette protéine pourrait mimer les fonctions de la PrP dans des régions du SNC dépourvues de PrP. De plus, elle pourrait également remplir les fonctions physiologiques de la PrP dans les animaux invalidés pour le gène de la PrP. Enfin, Sho pourrait également être impliquée dans les processus pathologiques liés aux EST. Si cette hypothèse n'est pas encore validée, une récente étude a montré que le niveau d'expression de Sho variait au cours de l'infection dans le cerveau de souris inoculées avec une souche de Scrapie murine (Watts et al, 2007).

## 2.3) La PrP<sup>Sc</sup> : caractérisation biochimique et mécanismes de conversion

### 2.3.1) Caractéristiques biochimiques et structurales

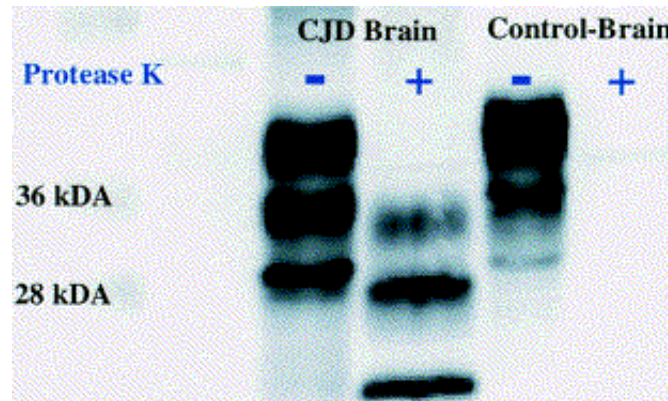
La PrP<sup>Sc</sup> est l'isoforme pathologique et anormale de la PrP<sup>c</sup>. Elle est retrouvée exclusivement chez les individus atteints d'EST. Si la PrP<sup>Sc</sup> et la PrP<sup>c</sup> présentent une séquence primaire identique, elles présentent néanmoins de grandes différences structurales et biochimiques (**Tableau 2**).

PrP <sup>c</sup>	PrP <sup>Sc</sup>
Monomérique	Agrégat
Forme globulaire prédominante en hélice $\alpha$ (42 %, contre 3% feuillets $\beta$ )	Riche en feuillets $\beta$ (42% , contre 30% hélices $\alpha$ )
Soluble dans les détergents non ioniques	Insoluble dans les détergents non ioniques
Sensible à la protéolyse	Partiellement protégée contre la protéolyse

**Tableau 2 : Propriétés biochimiques et structurales des isoformes normales et pathologiques de la PrP.**

La PrP<sup>Sc</sup> est partiellement résistante à l'action des protéases telles que la protéinase K, alors que la PrP<sup>c</sup> est totalement dégradée par leur action. La digestion partielle de la PrP<sup>Sc</sup> entraîne un changement de son profil électrophorétique en SDS-PAGE (**Figure 9**). Cette propriété est couramment utilisée en diagnostique post-mortem pour distinguer la PrP<sup>Sc</sup> de son isoforme cellulaire en Western blot. Le terme de « PrP<sup>Sc</sup> » désigne d'une façon générale la protéine pathologique historiquement associée à la Scrapie. Depuis, les auteurs utilisent également le terme de « PrP<sup>res</sup> » qui fait référence à l'état de résistance à la protéolyse de

l'isoforme conformationnel de la PrP<sup>c</sup>, ce qui permet de la désigner sans pour autant l'associer à la notion d'infectivité.



**Figure 9 : La PrP<sup>Sc</sup> est partiellement résistante à la protéolyse.** La PrP<sup>c</sup> et la PrP<sup>Sc</sup> ne sont pas différenciables en SDS-PAGE, en absence de traitement par des protéases. Une protéolyse limitée de la PrP<sup>Sc</sup> (dans cet exemple d'un extrait de cerveau d'un patient atteint de MCJ par la protéinase K) génère des fragments de plus faible poids moléculaire. D'après (Glatzel & Aguzzi, 2001).

La PrP<sup>Sc</sup> présente une forte propension à former des agrégats. En conséquence, la PrP<sup>Sc</sup> est partiellement insoluble dans les détergents non ioniques (Meyer et al, 1986). En effet, après ultracentrifugation d'un lysat de cellules ou de tissus infectés, la PrP<sup>Sc</sup> peut être sédimentée (Caughey & Raymond, 1991). L'insolubilité de la PrP<sup>Sc</sup> empêche l'analyse de sa structure tridimensionnelle par RMN (Caughey & Raymond, 1991). Certaines approches biophysiques (transformation de Fourier en infra-rouge et dichroïsme circulaire) ont permis de montrer que la PrP<sup>c</sup> contient majoritairement des hélices  $\alpha$  et que la PrP<sup>Sc</sup> est fortement enrichie en feuillettes  $\beta$  (**Tableau 2**) (Pan et al, 1993).

### 2.3.2) Mécanismes de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>

#### 2.3.2.1) Nature de l'agent infectieux

En 1982, Bolton et collaborateurs ont isolé la PrP<sup>Res</sup>, ce qui a permis de mieux cerner la nature de l'agent infectieux (Bolton et al, 1982). La PrP<sup>Res</sup> est par la suite systématiquement co-purifiée avec l'infectiosité, et la concentration de la protéine est proportionnelle au titre infectieux isolé dans les échantillons testés (Gabizon et al, 1988).

La purification de la protéine a permis l'identification du gène codant pour la PrP, le gène *prnp* (Chesebro et al, 1985). Il est apparu que la PrP pouvait exister sous deux isoformes

particulières: la protéine cellulaire normale, la PrP<sup>c</sup> et son isoforme pathologique, PrP<sup>Sc</sup>. Aussi, il a été montré que la présence de la PrP<sup>c</sup> est nécessaire pour le développement de la maladie : les souris dépourvues du gène *prnp* sont résistantes à l'infection par la Scrapie et ne permettent pas la propagation de la maladie (Bueler et al, 1993). Les premiers systèmes *in vitro* ont permis de mieux cerner les mécanismes de réplication de la PrP<sup>Sc</sup>. La PrP<sup>res</sup> est capable d'induire le changement de conformation de la PrP<sup>c</sup> afin de maintenir la propagation et la formation de nouvelles unités de PrP<sup>Sc</sup>. Dans ce système, originellement développé par Caughey et ses collaborateurs, le mélange de PrP<sup>c</sup> purifiée avec de la PrP<sup>Sc</sup> purifiée, dans des conditions non physiologiques, conduit à la formation de PrP<sup>res</sup> (Kocisko et al, 1994). A l'époque, ce système présentait toutefois un inconvénient majeur, à savoir que le rendement de la réaction de conversion était particulièrement faible.

Au cours des dernières années, les systèmes de conversion se sont largement améliorés, permettant de convertir de grandes quantités de PrP<sup>c</sup> en utilisant des faibles quantités de PrP<sup>res</sup>. Un de ces systèmes, appelé PMCA (pour « **P**rotein **M**isfolding **C**yclic **A**mplification »), consiste à mélanger *in vitro* de faibles quantités de PrP<sup>res</sup> avec de la PrP<sup>c</sup> non purifiée en excès dans des conditions spécifiques puis à effectuer plusieurs cycles de sonication/incubation au cours desquels a lieu la conversion et l'élongation la PrP<sup>res</sup> (Saborio et al, 2001). Cette technique permet d'envisager à plus long terme le développement d'un outil diagnostique capable de détecter de faibles quantités de PrP<sup>Sc</sup> à partir d'échantillons biologiques. Egalement, l'amélioration du rendement de la technique PMCA a permis de générer *de novo* de la PrP<sup>res</sup> aux propriétés infectieuses, ce résultat n'ayant pas encore été reproduit (Castilla et al, 2005).

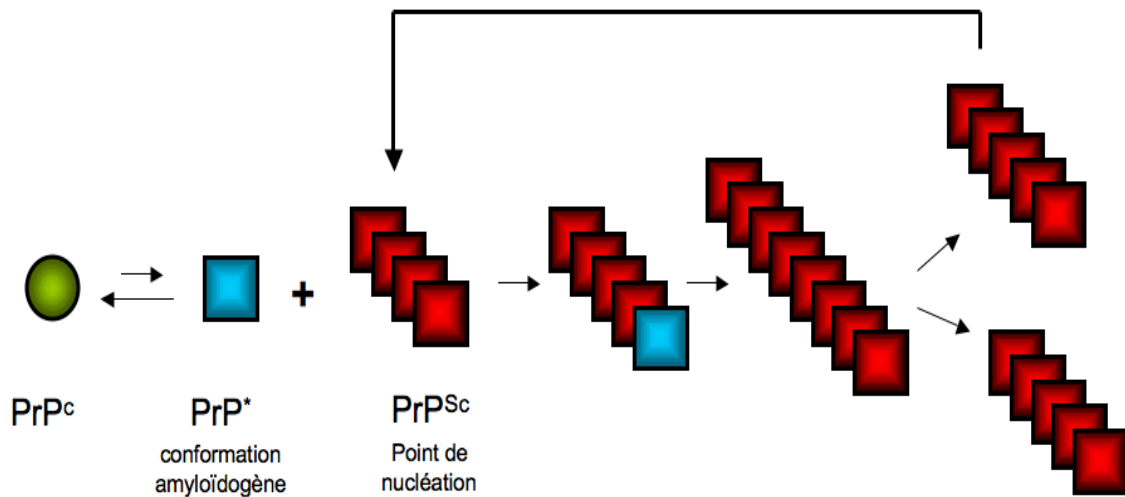
La présence et la quantité de PrP<sup>Sc</sup> sont, dans la majorité des cas, corrélées avec la propagation de l'infectiosité. Néanmoins, certaines études ont rapporté que le caractère infectieux pouvait être établi en absence de PrP<sup>Sc</sup> détectable (Lasmezas et al, 1997), et inversement inexistant alors que les échantillons testés contenaient de grandes quantités de PrP<sup>Sc</sup> (Hill et al, 2000). Il existe de multiples souches caractérisées par des périodes d'incubation différentes et des profils lésionnels et cliniques spécifiques (Chesebro, 1998). L'origine et les mécanismes de ce phénomène de souche sont encore mal compris. Pour expliquer ces observations, il a été proposé que la PrP<sup>Sc</sup> puisse adopter différentes conformations, chaque variation dans la structure déterminant une souche aux propriétés particulières (Caughey et al, 1998; Safar et al, 1998). Les caractéristiques de la PrP<sup>Sc</sup> seraient alors conservées lors du mécanisme répliatif de la PrP<sup>c</sup> (Prusiner, 1998).

La PrP<sup>Sc</sup> possède une grande affinité pour les acides nucléiques, notamment les ARN (Weiss et al, 1997). Cette propriété est à l'origine d'une hypothèse plaçant les ARN dans le rôle de co-facteurs de la réaction de conversion conformationnelle, permettant ainsi de catalyser la conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>res</sup> *in vitro* (Deleault et al, 2005). Ces changements conformationnels imposés par les acides nucléiques permettraient de mieux envisager le phénomène de souches. Cependant, à ce jour, aucun acide nucléique spécifique des préparations infectieuses de PrP<sup>Sc</sup> n'a été identifié. Plusieurs groupes ont toutefois rapporté la présence d'acides nucléiques dans des échantillons de matériel infectieux (Narang, 2002), et même l'existence de particules virales de 25nm de diamètre dans des cellules chroniquement infectées (Manuelidis et al, 2007).

### 2.3.2.2) Mécanismes de conversion

#### a) Le modèle nucléation-polymérisation

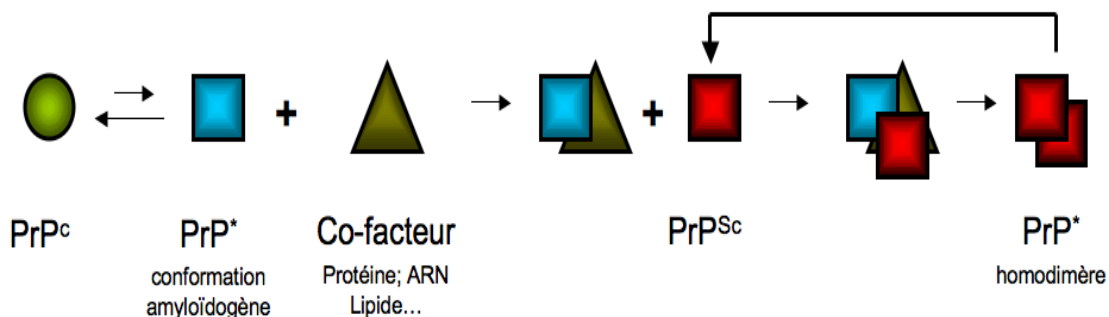
Selon le modèle dit de nucléation-polymérisation (**Figure 10**), la PrP<sup>Sc</sup> monomérique existe à l'état d'équilibre avec la PrP<sup>c</sup> (Jarrett & Lansbury, 1993 ; Kocisko et al, 1994). Cet équilibre est thermodynamiquement en faveur de la PrP<sup>c</sup>. La PrP<sup>Sc</sup> monomérique représenterait donc une isoforme mineure et transitoire et ne serait stabilisée qu'en cas de formation d'agrégats ordonnés qui agissent comme des noyaux (centres de nucléation) permettant de recruter la PrP<sup>Sc</sup> monomérique au sein des polymères. Ce processus est bien plus rapide que l'étape de formation du noyau initial de PrP<sup>Sc</sup>. L'état agrégé serait une propriété intrinsèque de l'infectiosité : la PrP<sup>Sc</sup> monomérique ne serait pas infectieuse, mais elle pourrait s'assembler dans les agrégats de PrP<sup>Sc</sup>. Par ailleurs, ce modèle intègre bien la situation rencontrée lors des formes génétiques des EST. La mutation de la PrP<sup>c</sup> entraînerait un déplacement de l'équilibre, en favorisant la formation de PrP<sup>Sc</sup>.



**Figure 10 : Modèle de nucléation-polymérisation.** la PrP<sup>c</sup> et la PrP<sup>Sc</sup> sont dans un état d'équilibre thermodynamique réversible. La PrP<sup>Sc</sup> monomérique ne peut être recrutée et agrégée en amyloïdes que si une graine de nucléation hautement ordonnée a été préalablement formée. Au sein de la graine de nucléation, la PrP<sup>Sc</sup> est stabilisée. La fragmentation de la PrP<sup>Sc</sup> augmente le nombre de graines de nucléation.

b) Le modèle auto-catalytique

Le modèle auto-catalytique (**Figure 11**) stipule que la PrP<sup>Sc</sup> contient les instructions de repliement nécessaires au changement de conformation de la PrP<sup>c</sup> suite à l'interaction des deux isoformes. Le processus de conversion implique d'abord la formation d'une unité hétérodimérique PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>Sc</sup> qui initierait le changement conformationnel de la PrP<sup>c</sup>, et qui générerait une unité homodimérique de PrP<sup>Sc</sup>. Cette dernière interagirait ensuite avec d'autres dimères de PrP<sup>Sc</sup>, ayant pour conséquence de former des agrégats de plus en plus grands. Dans ce modèle, l'unité infectieuse est le monomère de PrP<sup>Sc</sup>, et la formation de plus grands agrégats n'est pas nécessaire à la réplication des prions.

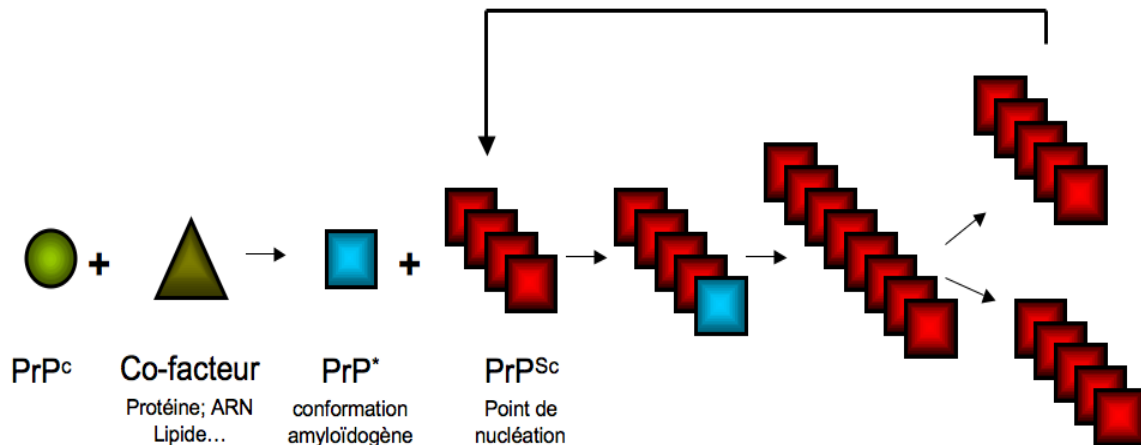


**Figure 11 : Le modèle auto-catalytique.** L'interaction entre une PrP<sup>Sc</sup> exogène et la PrP<sup>c</sup> endogène provoque le changement de conformation de cette dernière et sa conversion en PrP<sup>Sc</sup>. Le changement de conformation peut être aidé d'un cofacteur non identifié. L'existence d'une barrière énergétique très importante entre ces deux isoformes empêcherait la conversion spontanée de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>.

Récemment, ce modèle a été remis en question par Silveira et ses collaborateurs, qui ont montré que des petits oligomères composés de moins de six unités de PrP<sup>Sc</sup> étaient non infectieux (Silveira et al, 2005). Les particules au potentiel infectieux le plus élevé seraient les structures agrégées composées de 14 à 28 unités de PrP<sup>Sc</sup>. Ainsi, les résultats actuels convergent vers l'idée selon laquelle ce sont les petits agrégats de PrP<sup>Sc</sup>, et non les monomères ou les larges structures fibrillaires qui catalysent la conversion de la PrP<sup>c</sup> et portent le caractère infectieux.

### c) Le Modèle de nucléation assistée

Soto et ses collaborateurs ont récemment proposé un nouveau modèle de réplication, nommé modèle de nucléation assistée (Abid & Soto, 2006) (**Figure 12**). Dans ce modèle, l'événement principal est la formation d'un état structural intermédiaire (PrP\*) lors de l'interaction de la PrP<sup>c</sup> avec le facteur de conversion. La conformation intermédiaire préparerait la PrP à subir les changements structuraux profonds menant à la formation de PrP<sup>Sc</sup>. L'existence de ces états intermédiaires a été le sujet des nombreuses études (Apetri & Surewicz, 2002; Glockshuber, 2001), mais leur pertinence *in vivo* reste à établir.



**Figure 12 : Le modèle de nucléation assisté.** Un facteur de conversion endogène non identifié permet en présence de PrP<sup>c</sup> la formation d'un intermédiaire partiellement structuré. Ce changement structural facilite l'interaction avec une molécule de PrP<sup>Sc</sup>, et leur assemblage peut entraîner la formation d'un oligomère stable de nucléation.

Dans ce modèle, La formation de l'oligomère stable minimum serait l'étape limitante pour la formation *de novo* de PrP<sup>Sc</sup>. Cependant, dans les formes infectieuses d'EST, ce serait l'agent infectieux, correspondant à un oligomère de PrP<sup>Sc</sup>, qui catalyserait les changements conformationnels de PrP\* en l'incorporant dans l'agrégat croissant de PrP<sup>Sc</sup>.



# CHAPITRE 3

-

## AGREGATION DE LA PRP IN VITRO ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES

### 3) AGREGATION DE LA PRP IN VITRO ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES

#### 3.1) Les modèles d'agrégation de la protéine prion in vitro

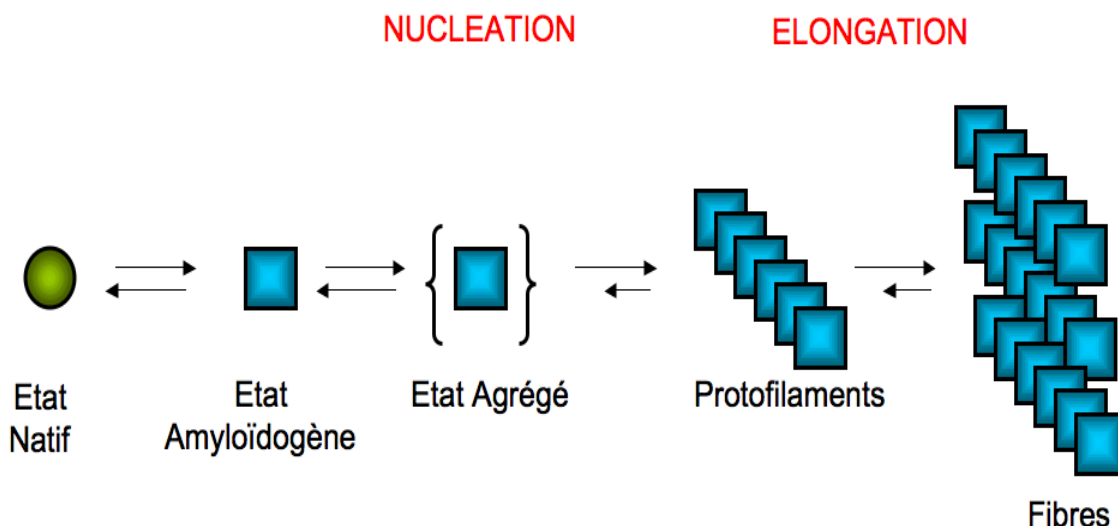
Si l'étude des mécanismes moléculaires de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> *in vivo* se révèlent difficiles, de nombreux modèles *in vitro* ont pu apporter des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes d'oligomérisation et de formation de fibres amyloïdes. Les techniques physico-chimiques et biophysiques appliquées à des formes et des espèces variées de PrP recombinantes ont permis d'aborder deux questions principales :

- **Quelles sont les conditions** (pH, force ionique, température, agitation...) dans lesquelles la protéine s'agrège le plus facilement ? Autrement dit, quel est micro-environnement cellulaire le plus propice à la conversion conformationnelle?

- Existe-t-il **différentes voies d'agrégation** pour la PrP, et si oui, conduisent-elles à la formation d'agrégats discrets intermédiaires qui possèdent des caractéristiques particulières (toxicité, stabilité thermodynamique) ?

##### 3.1.1) Les facteurs favorisant l'agrégation

Le taux relatif d'agrégation est corrélé avec les propriétés physico-chimiques des protéines et peptides, telles que leur charge, leur structure secondaire, leur stabilité et leur hydrophobicité (Chiti et al, 2003). Dans les protéines globulaires comme la PrP, la conversion en fibres amyloïdes pourra se faire quand la protéine sera partiellement dépliée et que les chaînes latérales hydrophobes seront exposées (**Figure 13**).



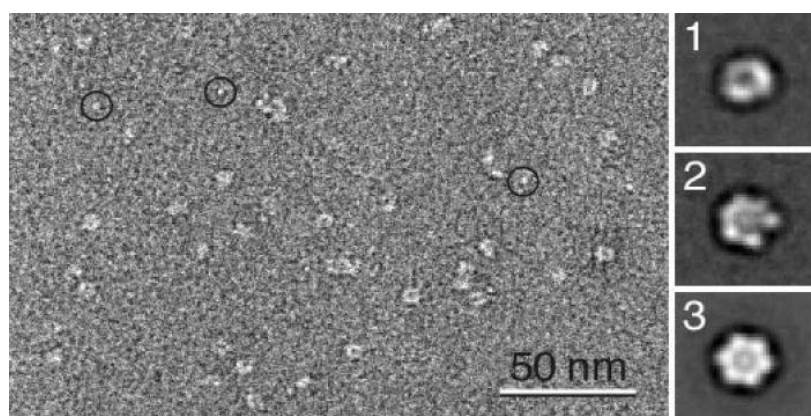
**Figure 13 : Mécanisme général de la formation de fibres amyloïdes.** Un changement dans l'environnement physico-chimique de la protéine à l'état natif conduit à la formation d'un état amyloïdogène. Cet état peut permettre l'assemblage d'une unité minimum de nucléation, qui par élongation va conduire aux fibres matures.

La PrP recombinante (humaine, murine, hamster et ovine) est capable de s'agréger en présence d'agents chaotropiques, destabilisants ou dénaturants (NaCl, HCl-Guanidinium, Urée) et sous l'effet de la température. Les chaotropes et la température favorisent le dépliement partiel des hélices  $\alpha$  de la protéine et permettent l'apparition d'intermédiaires de dénaturation (Hart et al, 2009; Nandi et al, 2002). A pH acide, la PrP a tendance à former des agrégats oligomériques avec des tailles variant de 200 à 2000 kDa (Jain & Udgaonkar, 2008; Rezaei et al, 2005; Vendrely et al, 2005). En revanche, à pH physiologique, la PrP tend à former rapidement des fibres amyloïdes (Baskakov, 2004; Baskakov et al, 2002; Bocharova et al, 2005). La manière dont les molécules de PrP se rencontrent pendant l'agrégation joue un rôle important dans l'ultrastructure résultante des agrégats. En effet, il a récemment été montré que la PrP recombinante de hamster pouvait former, sous conditions de solvant et de chaotropes identiques, des fibres de formes et longueurs différentes en fonction du mode d'agitation employé pendant l'agrégation (Makarava & Baskakov, 2008). D'autres paramètres peuvent également influencer sur le changement de structure de la PrP, comme l'effet du potentiel redox (Jackson et al, 1999), ou l'incubation de la PrP en présence d'ions bivalents comme le cuivre (Qin et al, 2000; Tsirolnikov et al, 2006).

### 3.1.2) Formation de fibres amyloïdes et intermédiaires amyloïdogéniques

La formation de fibres est généralement caractérisée par une phase de latence suivie d'une phase de croissance rapide (Caughey & Lansbury, 2003). La première phase implique la formation d'oligomères solubles résultant de transitions structurales spécifiques. Les agrégats précoces se transforment ensuite en protofilaments qui sont des structures fibrillaires courtes, capables de s'assembler en fibre mature par association latérale et réorganisation structurale.

Les oligomères solubles sont aujourd'hui particulièrement étudiés dans les nombreuses maladies amyloïdes (oligomères de résistine (Aruna et al, 2008), serpins (Carrell et al, 2008), vitronectine (Shin et al, 2008), transthyréline (Sorgjerd et al, 2008), cystatine (Zerovnik, 2009)). Les observations par microscopie électronique et à force atomique ont montré que ces particules pouvaient avoir différentes tailles, de 3 à 10 nm (Anguiano et al, 2002; Harper et al, 1997; Lashuel et al, 2002) (**Figure 14**).



**Figure 14 : Microscopie électronique et projection de structure de la protéine amyloïde A du sérum (SAA), sous forme oligomérique.** Les particules observées sont hexamériques et annulaires, d'un diamètre de 10 nm et avec un pore central de 2.5 nm. D'après (Wang et al, 2002).

De nombreuses évidences pointent ces intermédiaires comme les agents causatifs primaires des amyloses. Cependant, le mécanisme primaire de toxicité exercé par ces particules est encore mal connu. Les hypothèses incluent la capacité de ces oligomères non seulement à former des canaux dans la membrane plasmique, mais également à perméabiliser la membrane directement. Enfin, ces intermédiaires pourraient jouer le rôle de « piège à protéines mal repliées » grâce à des interactions non spécifiques entre leurs feuillets  $\beta$  et les chaînes partiellement dépliées des protéines ou en cours de traduction. Cette interaction aurait

pour effet un dérèglement du système du ubiquitination/protéasome et causer un stress dans le reticulum endoplasmique, phénotype observé dans de nombreuses pathologies amyloïdes (Gruschus, 2008).

Récemment, les travaux de Silveira et collaborateurs ont montré que des particules non fibrillaires, purifiées à partir de cerveaux de hamsters infectés et de masse équivalent à 14-28 molécules de PrP, représentaient la fraction d'infectivité la plus élevée (Silveira et al, 2005) par rapport à des structures plus larges ou plus petites. Cependant, ces intermédiaires oligomériques sont difficiles à isoler *in vivo*, de part leur nature transiente et peu homogène. Les modèles recombinants ont permis d'apporter des informations structurales au cours de ces dernières années. En affinant les paramètres d'agrégation de la PrP (pleine longueur), plusieurs auteurs ont reporté la formation et la caractérisation biophysique d'oligomères solubles (**tableau 3**).

Protéine	Conditions			Type oligomères obtenus	Propriétés		Réf
	pH	T°	chaotrope		Taille	Réversibilité	
MoPrP <sup>23-231</sup> (25-450 µM)	3.5	37°C	Sel	Oligomère I	> 850 kDa	oui	(Vendrey et al, 2005)
				Oligomère II	8-12mers (195-350 kDa)	Non	
MoPrP <sup>23-231</sup> (25 µM)	2	25°C	Sel	Oligomer	Large > 300kDa	ND	(Jain & Udgaonkar, 2008)
OvPrP <sup>23-234</sup> (50 µM)	3.4	45°C	Sel	P1	730 kDa	Non	(Rezaei et al, 2005)
				P2	275 kDa (12mer)	Non	

**Tableau 3 : Quelques exemples et caractéristiques d'oligomères de PrP obtenus *in vitro*.**

Les voies de formation de ces oligomères, à partir de la protéine partiellement dépliée, sont encore mal connues. Néanmoins, il semblerait qu'il existe des voies multiples qui permettraient la génération d'oligomères distincts et possédant des propriétés particulières comme la capacité de s'engager dans la voie de fibrillogénèse. De récents arguments tendent à montrer qu'un changement conformationnel dans la région S2-H2 (résidus 168-173 ovins) doit intervenir avant le processus d'oligomérisation (Eghiaian et al, 2007).

### 3.1.3) L'influence de la partie N-terminale sur l'agrégation de la PrP

Des expériences d'épitope-mapping ont suggéré que la région N-terminale pouvait influencer la conformation locale du domaine C-terminal de la PrP (Li et al, 2000). Les propriétés d'agrégation de la PrP recombinante pleine longueur (résidus souris 23-231) ont été comparées à celles d'une version tronquée du N-terminal (résidus 90-231). Les deux protéines s'assemblent par un mécanisme similaire de nucléation-polymérisation, toutefois la protéine pleine longueur s'assemble en de plus larges agrégats, indiquant que cette différence d'agrégation est médiée par la partie N-terminale (Frankenfield et al, 2005). De plus, à pH neutre, la PrP pleine longueur apparaît sous forme de monomères, dimères et trimères, alors que la protéine tronquée n'existe qu'à l'état monomérique (Frankenfield et al, 2005; Zahn, 2003). Cordeiro et collègues ont également montré que la partie N-terminale ne jouait pas de rôle dans la stabilité globale de la PrP. Cependant, des protéines tronquées de différentes parties de la région amino-terminale et agrégées sous forme riche en feuillets- $\beta$  sont plus susceptibles aux traitements physiques, tels que les hautes pressions (Cordeiro et al, 2005). Ces résultats montrent que le domaine amino-terminal de la PrP affecte sa stabilité ainsi que son comportement d'agrégation.

Ces données concordent avec des expériences de conversion (cell free assay) réalisées *in vitro* à partir de PrP de hamster exprimée et purifiée à partir de neuroblastomes de souris. Les mutants délétés de la partie 34-94 et 34-113 présentent une quantité moindre et une conformation de PrP<sup>Res</sup> différente de ceux qui sont générés avec la protéine sauvage, indiquant que ces résidus pourraient intervenir dans des interactions PrP-PrP et ainsi favoriser la conversion en un isoforme résistant à la protéolyse (Lawson et al, 2001). La partie N-terminale pourrait ainsi jouer un rôle dans les mécanismes de franchissement de la barrière des espèces. En effet, les auteurs ont réalisé des réactions de conversion *in vitro* en utilisant la PrP<sup>Res</sup> provenant de hamster et la PrP<sup>Sen</sup> murine délétée de variables régions du N-terminal. La PrP<sup>Res</sup> formée par ce processus présente des profils de digestion à la PK proches de ceux retrouvés lorsque des souches de hamster sont inoculées chez la souris et stabilisées par plusieurs passages successifs (Lawson et al, 2004).

### **3.2) Partie 1 des résultats: grâce au domaine N-terminal de la PrP, Doppel s'agrège d'une manière similaire à la PrP<sup>Sc</sup>.**

#### 3.2.1) Avant-propos

Dans la première partie de mon travail de thèse, nous avons utilisé le modèle recombinant pour étudier le rôle de la partie N-terminale de la PrP dans les mécanismes d'agrégation. L'approche que nous avons employée a consisté à créer une protéine « synthétique » très proche de la PrP, aussi bien dans sa longueur (nombre d'acides aminés), que dans sa structure secondaire, mais également dans ses propriétés physico-chimiques (point isoélectrique).

La première protéine recombinante répondant à cette description que nous avons construite est composée des acides aminés 23-125 de la PrP (partie N-terminale) et des acides aminés 54-154 de la protéine Doppel (domaine C-terminal structuré). Nous avons nommé cette construction « chimère ». L'originalité de ce travail repose sur le fait que nous n'étudions pas une troncature de la PrP, mais bien une protéine pleine longueur qui va posséder un état natif proche de celui de la PrP. De plus, avant cette étude, Dpl n'avait jamais été étudiée sous sa forme recombinante pour ses capacités à s'agrèger.

L'objectif de ce travail est de comparer les protéines PrP, Dpl et Chimère dans leur capacité à s'agrèger tout en acquérant des propriétés PrP<sup>Sc</sup>-like, c'est-à-dire l'augmentation du taux de feuillets  $\beta$  dans leur structure secondaire et l'acquisition de la résistance à une protéolyse modérée.

Pour notre étude, nous avons utilisé comme modèle d'agrégation de référence celui de Vendrely et collègues (Vendrely et al, 2005). Ce modèle d'assemblage de la PrP présente différents avantages :

- L'agrégation se fait à pH acide (3.5), permettant de s'affranchir des effets de pH sur la protéine monomérique tels que décrits dans le paragraphe 3.1.1.
- L'agent déstabilisant utilisé est le NaCl, ce qui permet un dépliement de la protéine « doux » en comparaison avec l'utilisation de HCl-Guanidinium ou de l'urée, laissant ainsi la protéine sous une conformation la plus native possible.
- Enfin, ces conditions ont permis de former des oligomères solubles discrets de PrP, dont les propriétés biologiques présentent un intérêt particulier (paragraphe 3.1.2).

**Article 1 : « PrP N-terminal domain triggers PrPSc-like aggregation of Dpl »**

Paul Erlich, Jean-Yves Cesbron , Catherine Lemaire-Vieille , Aurélie Curt , Jean-Pierre  
Andrieu, Guy Schoehn, Marc Jamin and Jean Gagnon

Publié dans :

**Biochemical and Biophysical Research Communications 365 (2008) 478–483**



## PrP N-terminal domain triggers PrP<sup>Sc</sup>-like aggregation of Dpl

Paul Erlich<sup>a,b</sup>, Jean-Yves Cesbron<sup>a,b,c</sup>, Catherine Lemaire-Vieille<sup>a,b</sup>, Aurélie Curt<sup>a,b</sup>,  
Jean-Pierre Andrieu<sup>c</sup>, Guy Schoehn<sup>d</sup>, Marc Jamin<sup>d</sup>, Jean Gagnon<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France*

<sup>b</sup> *CNRS, UMR 5163, Délégation Alpes, 25 rue des Martyrs, BP 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France*

<sup>c</sup> *Laboratoire d'Immunologie, Département de Biologie, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France*

<sup>d</sup> *Unit of Virus Host Cell Interaction, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Carl-Ivar Brändén Building, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble Cedex, France*

<sup>e</sup> *Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France*

Received 11 October 2007

Available online 13 November 2007

### Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies are fatal neurodegenerative disorders thought to be transmitted by self-perpetuating conformational conversion of a neuronal membrane glycoprotein (PrP<sup>C</sup>, for “cellular prion protein”) into an abnormal state (PrP<sup>Sc</sup>, for “scrapie prion protein”). Doppel (Dpl) is a protein that shares significant biochemical and structural homology with PrP<sup>C</sup>. In contrast to its homologue PrP<sup>C</sup>, Dpl is unable to participate in prion disease progression or to achieve an abnormal PrP<sup>Sc</sup>-like state. We have constructed a chimeric mouse protein, composed of the N-terminal domain of PrP<sup>C</sup> (residues 23–125) and the C-terminal part of Dpl (residues 58–157). This chimeric protein displays PrP-like biochemical and structural features; when incubated in presence of NaCl, the  $\alpha$ -helical monomer forms soluble  $\beta$ -sheet-rich oligomers which acquire partial resistance to pepsin proteolysis *in vitro*, as do PrP oligomers. Moreover, the presence of aggregates akin to protofibrils is observed in soluble oligomeric species by electron microscopy.  
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Prion protein; PrP N-terminal domain; Doppel; Aggregation; Limited proteolysis; Protofibrils

A key molecular event in transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) is the conversion of the normal cellular form of the prion protein (PrP<sup>C</sup>) into a misfolded pathological amyloid form, called the scrapie isoform (PrP<sup>Sc</sup>). The molecular details of this transformation and the mechanisms of dissemination of the disease are still enigmatic. The “protein only hypothesis” [1] suggests that PrP<sup>Sc</sup> supports by itself the infectivity and self-perpetuates by recruiting PrP<sup>C</sup> molecules into a multimeric form that has all the characteristics of an amyloid fibril. The misfolded PrP<sup>Sc</sup> shows several structural and biochemical differences from PrP<sup>C</sup>, including a high percentage of  $\beta$ -sheet,

partial resistance to proteolysis, insolubility in detergents, and a propensity to polymerize into amyloid-like fibrils [2].

The cellular host encoded PrP<sup>C</sup> is a cell-surface glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored glycoprotein, predominantly expressed in brain [3], and implicated in copper binding, cell signaling, and protection against oxidative stress [4]. Soluble recombinant PrP proteins from various mammalian species have been shown to consist of two main domains. The flexible N-terminal portion (residues 23–120 in mice) harbors repetitions of a copper-binding glycine-rich octarepeat peptide, whereas the C-terminal globular domain (residues 121–230) is well structured and contains three  $\alpha$ -helical regions and a short two strands antiparallel  $\beta$ -sheet.

During the last 10 years, several PrP<sup>C</sup> knockout mouse lines were engineered to elucidate the function of PrP. While Zurich I and Edbg *Prnp*<sup>-/-</sup> mice showed only minor defects

\* Corresponding author. Address: Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier, BP 170, F-38042 Grenoble Cedex 9, France. Fax: +33 4 76 63 71 57.

E-mail address: [jean.gagnon@ujf-grenoble.fr](mailto:jean.gagnon@ujf-grenoble.fr) (J. Gagnon).

[5,6], Ngsk, Rcm0, and Zurich II *Prnp*<sup>-/-</sup> mice developed a late-onset ataxic phenotype with cerebellar Purkinje cell degeneration [7,8]. Moore and colleagues analyzed the intergenic splicing events occurring in these knockouts and discovered that the ataxic phenotype was due to the mRNA upregulation of a prion-like gene (*Prnd*), located 16-kb downstream of the *Prnp* locus, and encoding a PrP related protein denoted as Doppel (Dpl) [9]. In these mice, the onset of disease is inversely correlated with the expression level of Dpl in brain, and this phenotype is strikingly rescued by co-expression of at least one copy of PrP<sup>C</sup> [10].

Dpl primary function is elusive, but recent investigations clearly define it as a critical regulator of male gametogenesis [11]. In mice defective or overexpressing Dpl, neither the time course of prion disease nor the generation of the pathogenic PrP<sup>Sc</sup> are significantly modified [12]. Hence, Dpl is commonly depicted as the “N-terminally truncated” version of PrP that might in principle be converted into a protease-resistant multimeric  $\beta$ -sheet-rich isoform “Dpl<sup>Sc</sup>” [11,13]. However, so far such conformation of Dpl has not been described, and there is no evidence that Dpl could become misfolded in presence of infectious PrP<sup>Sc</sup>.

Numerous studies have suggested that the N-terminal part of PrP is important for TSE pathogenesis and protein aggregation. *In vitro*, full-length PrP forms larger aggregates than the N-terminally truncated protein, pointing out that the N-terminus could promote higher-order aggregation processes [14–16]. Moreover, extra-copies of the octapeptide repeat region dramatically influence the kinetics of PrP amyloid formation [17]. *In vivo*, mice lacking N-terminal residues 32–106 do not display PrP<sup>Sc</sup> accumulation upon scrapie infection, whereas reintroduction of full-length PrP transgene restores susceptibility to the disease [18].

To test the hypothetical ability of Dpl to be converted into a PrP<sup>Sc</sup>-like isoform, we have grafted the N-terminal domain of PrP<sup>C</sup> to the C-terminal part of Dpl. PrP/Dpl constructions have been recently described, outlining the efficient membrane-bound expression of the related proteins and their anti-apoptotic function following serum deprivation in mammalian cultured cells [19]. In the present work, we describe the structural and biochemical features of this recombinant chimeric protein. We present its characteristics of fibrillization and reveal PrP<sup>Sc</sup>-like structural properties of early aggregates, including resistance to limited proteolysis. These data underline the possibility of obtaining a “Dpl<sup>Sc</sup>” isoform and point out the role of the N-terminal part of PrP in general aggregation process.

## Materials and methods

**Cloning, expression, and purification of proteins.** Cloning of mouse PrP<sup>23–230</sup> has been described previously [16]. To generate the chimeric protein (PrP<sup>23–125</sup>/Dpl<sup>58–157</sup>, referred to as Chi), fragments encoding PrP<sup>23–125</sup> and Dpl<sup>58–157</sup> were amplified by PCR to introduce a unique AvrII site at the 3' and the 5' ends, respectively. Finally, the entire coding region of the chimera was amplified by overlap PCR using the two separate fragments. The cDNA fragments encoding mouse Dpl<sup>24–157</sup> and

mouse Chi were amplified by PCR to introduce restriction sites for NdeI and XhoI at the 5' and 3' end, respectively. Gel-purified fragments were then cloned into pET17b or pET41a vectors (Novagen) for Chi or Dpl, respectively. Recombinant PrP, Dpl, and Chi were expressed and purified as previously described [16,20]. Protein concentration was measured by optical density using calculated molar extinction coefficients (PrP: 62,400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, Dpl: 29,640 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, Chi: 66,340 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), and the fractions of interest were desalted (20 mM Na acetate, pH 3.5, Sephadex columns PD-10 GE Healthcare) and concentrated by ultrafiltration (Amicon Ultra 4. 10.000 MWCO).

**Conversion of murine recombinant proteins into oligomers.**  $\beta$ -Oligomers were prepared by incubating 100  $\mu$ l of freshly purified monomeric (5 mg/ml) recombinant PrP, Dpl, or Chi at 40 °C for 12 h in presence of 100 mM NaCl.  $\beta$ -Oligomers were separated by Size Exclusion Chromatography (SEC) using a Protein-Pak SW300 HPLC column (300  $\times$  7.5 mm, Waters), in a 50 mM Na acetate 50 mM NaCl, pH 4, buffer, at a flow rate of 0.5 ml/min. Elution was monitored at 280 nm, and the fractions corresponding to oligomers were collected.

**Limited pepsin proteolysis of recombinant proteins.** Pepsin (Boehringer Mannheim, France) was reconstituted in 50 mM Na acetate 50 mM NaCl, pH 4, to a final concentration of 1 mg/ml. Two micrograms of recombinant monomeric or oligomeric proteins were incubated (37 °C, 30 min) with pepsin at the indicated protein/enzyme mass-ratio (varying from 100:1 to 5:1). The reaction was stopped by adding reducing Laemmli buffer and boiling the sample at 100 °C for 5 min.

**Analysis of proteolysed fragments.** Products of digestion were analysed by SDS-PAGE. After migration, the gel was either stained with Coomassie blue (Bio-Safe Coomassie, Bio-Rad), or used to transfer the proteins onto a Nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were probed with either the mouse monoclonal anti-PrP SAF32 (0.4  $\mu$ g/ml), SHA31 (0.06  $\mu$ g/ml), or rabbit polyclonal anti-Dpl DDC39 (1/10,000) antibodies (respectively generous gifts from J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, France, and S. Lehmann, CNRS UPR1142, Montpellier, France). After incubation with appropriate secondary antibodies, membranes were developed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia) and exposed on X-Ray film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia). For N-terminal sequence analysis, products from limited pepsin proteolysis were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Amersham). Sequencing was performed on a Procise Model 492 protein sequencer (Applied Biosystems).

**Circular dichroism (CD) spectroscopy.** Circular dichroism spectra were recorded at 20 °C using a Jasco J-810 spectropolarimeter, coupled to a Peltier temperature control unit. Protein concentration was 15  $\mu$ M in 20 mM Na acetate or in 20 mM Na acetate 50 mM NaCl, pH 4, buffers. The path length was 0.1 cm and the CD signal was monitored from 200 to 250 nm. For each experiment, the data is the average of four scans with blank spectra subtracted.

**Electron microscopy (EM).** Samples of each oligomers at a concentration of about 0.04 mg/ml were adsorbed onto the clean face of a carbon film, deposited on a mica sheet, and negatively stained with 1% (w/v) neutral sodium silico-tungstate. The specimens were examined with a JEOL 1200 EX II microscope at 100 kV and a nominal magnification of 40,000 $\times$ .

## Results

### Structural properties of the recombinant Chi protein

To study the influence of the N-terminal part of PrP on Dpl aggregation we constructed a chimeric protein, composed of the amino acids 23–125 of mouse PrP, fused to the amino acids 58–157 of Dpl. Expressed recombinant proteins were solubilised in 5 M GdnHCl and refolded on a Ni<sup>+</sup> Column. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and the secondary structure was probed using circular

dichroism. All proteins ran at their expected calculated size (PrP: 23 kDa; Dpl: 15 kDa; Chi: 21 kDa; PrP N-terminal portion: 11 kDa; PrP C-terminal portion: 13 kDa; data not shown), as single unglycosylated bands. Whereas the N-terminal part of PrP displays a random-coil structure (see Supplementary material for CD spectra), the PrP C-terminal domain and Dpl are  $\alpha$ -helix-rich as shown by a characteristic far-UV CD spectrum with well-defined minima at 208 and 222 nm. The full-length monomeric PrP yields an  $\alpha$ -helix-rich form with a CD spectrum which resembles the sum of the spectra for the N- and the C-terminal domains, whereas the chimeric protein has a secondary structure content strongly similar to that of PrP.

#### Oligomerization of the Chi protein in solution

The conversion of a monomeric  $\alpha$ -helix-rich isoform to multimeric  $\beta$ -sheet-rich isoform was largely investigated *in vitro* by using recombinant full-length mouse PrP protein [20,21]. PrP is able to form two populations of soluble  $\beta$ -sheet-rich oligomers when incubated with 100 mM NaCl at 40 °C during 12 h as described in [20]. The first population (oligomers I) is composed of a mix of undefined aggregates. In contrast, oligomers II have been shown to be

composed of 8–15 monomers and are thought to be an intermediate form that, when further incubated, leads to oligomers I [20,22]. These two populations can be isolated by gel filtration (Fig. 1A, black line).

In order to determine if recombinant Chi and Dpl have the same behavior, they were processed under identical conditions and analyzed by SEC. In the presence of 100 mM NaCl at 40 °C during 12 h, recombinant monomeric Chi formed soluble oligomers I (Fig. 1A, red line), but did not form any oligomers II. In contrast, Dpl did not form soluble oligomers, and was always eluted as a monomer (Fig. 1A, green line). In absence of salt the three proteins eluted as a single peak of monomers (Fig. 1A). These data suggests that the recombinant chimeric protein oligomerizes the same way as PrP in our *in vitro* assay, in contrast with Dpl which remains in a monomeric state.

Each sample of oligomers was probed for changes in secondary structure by circular dichroism. PrP oligomers I and II clearly showed spectra with a minima at 215 nm (Fig. 1B, pale green and orange lines), corresponding to fractions of protein composed mainly of  $\beta$ -sheet structure. The chimeric oligomers fraction did show the same spectra pattern, pointing out a similar change in secondary structure (Fig. 1B, blue line).

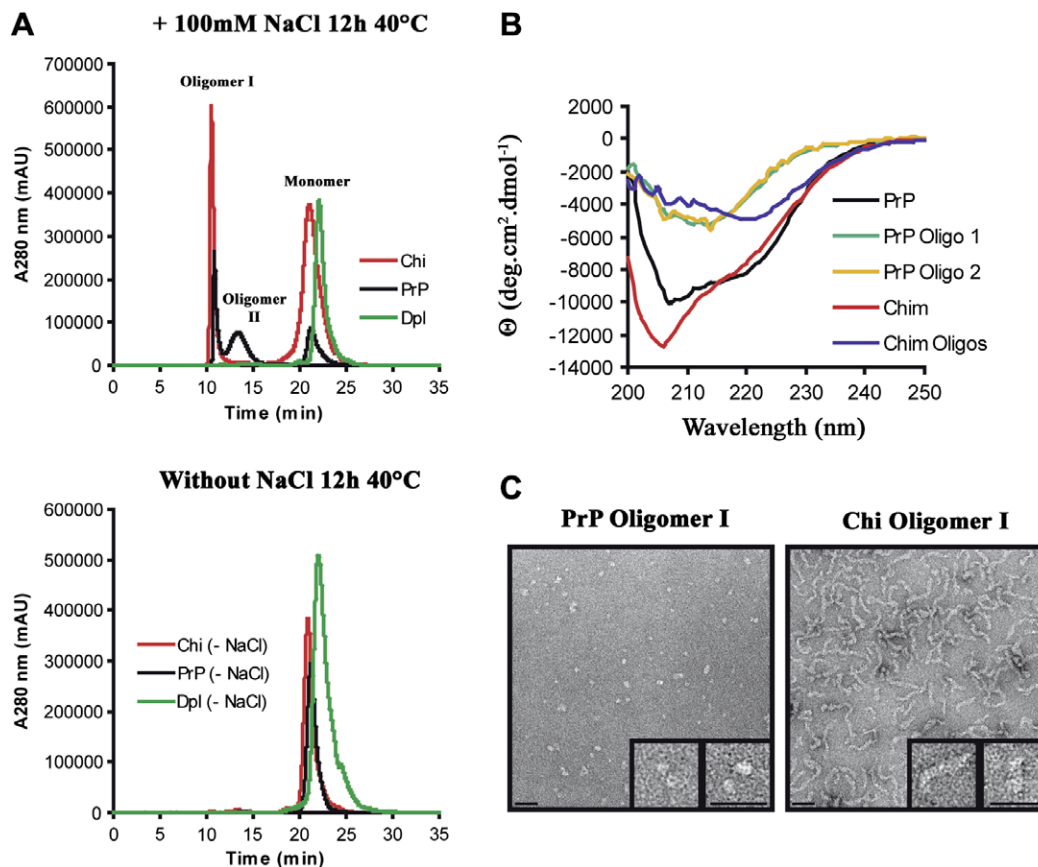


Fig. 1. Aggregation of Chi and PrP proteins in solution. (A) Elution profile by Size Exclusion Chromatography of monomeric and oligomeric PrP (black line), Dpl (green line), and Chi (red line) after 12 h incubation at 40 °C in presence or absence of 100 mM NaCl. (B) CD spectra of PrP oligomers I and II (pale green and orange lines) and Chi oligomers (blue line) (C) Electron micrographs of negatively stained PrP and Chi oligomers I. Scale bar, 50 nm. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

Finally, electron microscopy was used to confirm the presence of aggregates in the soluble polymerized fractions of PrP, Dpl, and Chi. PrP oligomers I appear as large particles with a diameter of 80 Å that seem to stack on each other ( $80 \times 120 \pm 10$  Å, Fig. 1C). PrP oligomers II contains small globular particles with a diameter of about 40 Å (data not shown) as previously described [20]. The chimeric oligomers have the appearance of worm-like curved particles with an average length of 55 Å and a diameter of  $160 \pm 10$  Å (Fig. 1C). For buffer alone or monomeric proteins, negatively stained aggregates could not be detected.

*Resistance to limited proteolysis of soluble β-oligomers of the Chi protein*

One of the main features of PrP<sup>C</sup> conversion into PrP<sup>Sc</sup> is the acquisition of limited resistance to proteolysis. Therefore, we compared the proteolysis resistance of the various protein species collected during SEC. We digested 2 μg of each monomeric or oligomeric protein with pepsin at 37 °C for 30 min, with increasing enzyme concentration (range from 20 to 400 ng). All digested samples were then analyzed by SDS–PAGE.

As expected PrP monomer and Dpl monomer were completely degraded by the action of 200 ng of pepsin (Fig. 2). In contrast, Chi oligomers were progressively digested with increasing protein:enzyme ratio leading to three major bands with approximate molecular weight of 16, 12, and 9 kDa. These Chi fragments (1, 2, and 3, respectively, in Fig. 2) displayed resistance to proteolysis up to 400 ng of pepsin (ratio protein:enzyme of 5:1). Under the same conditions, PrP oligomers I were progressively cleaved leading to three major bands with approximate molecular weight of 16, 12, and 9 kDa (bands 4, 5, and 6, respectively, in Fig. 2). The 9 kDa fragment is still resistant to the action of 400 ng of pepsin. Digestion of PrP oligomers II yielded only two major bands of 12 and 9 kDa (bands 7 and 8 in

Fig. 2) that completely disappeared in presence of 400 ng of pepsin. These data showed that Chi protein became resistant to proteolytic digestion upon oligomerisation, as PrP.

N-terminal sequencing was carried out in order to determine the nature of the stable fragment produced by proteolysis. In parallel, the digestion fragments were analyzed by Western blotting using different antibodies mapping the N-terminus or the C-terminal part of either PrP or Dpl. For PrP, patterns were probed using two different antibodies mapping the N-terminus (SAF32) and the first α-helix in the C-terminal part (SHA31). For Chi, SAF32 was used in combination with a rabbit polyclonal antibody (DDC39) mapping the first β-strand of the Dpl C-terminus. Developed films were superimposed to identify overlapping bands (data not shown). Schematic representation of the results is shown in Fig. 3.

Digestion fragments 1, 2, and 3 from Chi oligomers were revealed by both the SAF32 and the DDC39 antibodies. Fragment 1 began at the amino acid 89 as determined by N-terminal sequencing, while fragments 2 and 3 began at the N-terminus of the recombinant protein. Taken together, these data indicate a probable cleavage site for fragments 2 and 3 somewhere between α-helix 1 and β-strand 2 within the Dpl portion of the chimera. Digestion fragments 4, 5, and 6 from oligomers I of PrP were revealed by the SAF32 Mab while the SHA31 Mab detected only fragments 4 and 5. Fragment 4 began at amino acid 86, located within the SAF32 Mab epitope, while fragments 5 and 6 began at the N-terminus of PrP. These results also suggest a probable cleavage site located in the region of α-helix 1 and β-strand 2 of the C-terminal portion of PrP. N-terminal sequencing and immuno detection of fragments 7 and 8 from PrP oligomers II indicated that they correspond to the fragments 5 and 6 of PrP oligomers I. In conclusion, PrP and Chi proteins, once in their multimeric β-sheet-rich conformation, acquire a similar resistance to limited proteolysis by pepsin.

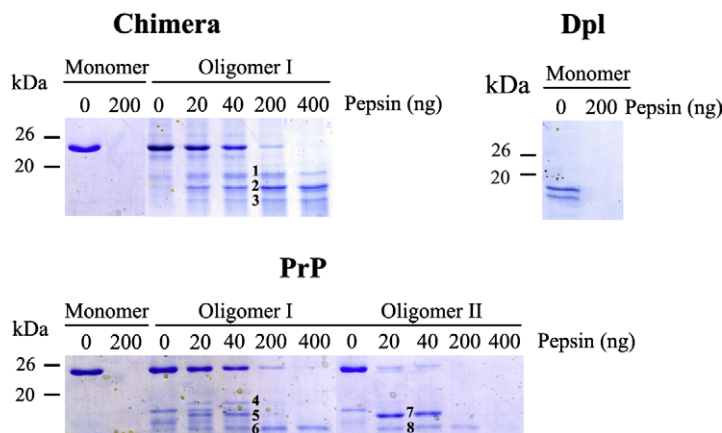


Fig. 2. Limited proteolysis of soluble β-oligomers of Chi and PrP proteins. Two micrograms of each protein were incubated with increasing concentration of pepsin for 30 min at 37 °C. Digestion reactions were analysed by SDS–PAGE. 1, 2, and 3 represent fragments derived from Chi, while 4 through 8 are derived from PrP.



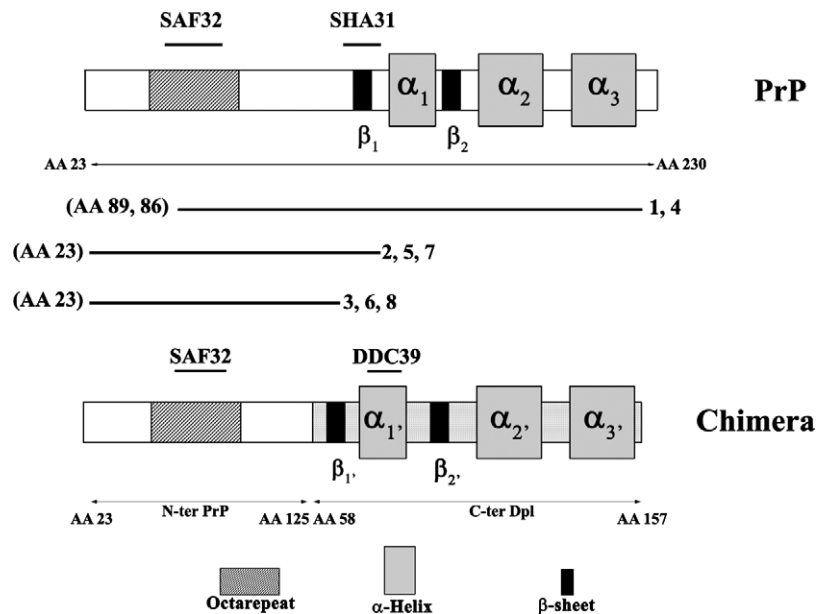


Fig. 3. Schematic representation of Chi and PrP proteins. Fragments generated by pepsin cleavage were identified by N-terminal protein sequencing and Western blotting (1, 2, and 3 for Chi; 4 through 8 for PrP).

## Discussion

Like PrP, Dpl is a small glycosylated GPI-anchored membrane protein. The close proximity of the *prnd* gene to the *prnp* locus and the similarity of the structural  $\alpha$ -helical scaffold between both proteins suggest that Dpl could be considered a partial paralog of PrP, but lacking its N-terminal portion [23]. However Dpl is not known to form scrapie-like isoforms, although it has been shown to induce ataxia when over expressed in brain of *prnp*<sup>0/0</sup> mice [9]. While such a misfolded state has not yet been described, we assessed the ability of Dpl to acquire PrP-like properties when fused to the N-terminal domain of PrP. Dpl by itself does not reach a soluble oligomeric form, unlike its counterpart the C-terminal portion of PrP that will make oligomers [16]. However when coupled to the N-terminal domain of PrP,  $\beta$ -sheet-rich oligomers are formed. The production of these oligomers appears to be faster for the chimeric protein than observed for PrP. This leads to a population of polydispersed soluble oligomers that are larger than those observed for PrP, as seen by EM. These particles are akin to protofibrils typically observed during the early stages of fibril formation of amyloidogenic proteins. The N-terminal domain has been previously shown to affect the kinetics and properties of aggregates formed. These properties have a relevant *in vivo* significance as infected transgenic mice devoid of the octapeptide repeat region develop longer incubation times and have lower prion titers than mice expressing full-length PrP [24].

The conversion of a monomeric  $\alpha$ -helix-rich isoform to multimeric  $\beta$ -sheet-rich isoform is strongly related to the conversion of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup>. The transformation

observed involves a partial unfolding of the native state and refolding into a  $\beta$ -sheet-rich conformation [25] which imparts a partial resistance to proteolysis. Indeed resistance to proteinase K digestion is a common analytical criterion to demonstrate the presence of PrP<sup>Sc</sup>. In this work, pepsin is used instead of PK to stay at a pH value similar to the conditions of oligomerization. The nature of the resulting undigested core obtained using oligomers from both proteins is the same, centered on the core region of the disease-associated prion protein [1]. This further indicates the importance of the N-terminal segment in the oligomerization process which likely leads to similar cross-beta structures for both PrP and the chimeric protein. In contrast, the N-terminal segment on its own is unable to interact with itself in order to give oligomeric forms [16]. This strongly suggests that the C-terminal structured segment of both PrP and Dpl must also influence this oligomerization process. Despite the small differences in the oligomeric forms observed, it would be of interest to verify if such chimeric protein could behave as PrP and support infectivity in an *in vivo* experimental situation.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. Jacques Grassi for providing us with anti-PrP antibodies, and to Dr. Sylvain Lehmann for the anti-Dpl antibody.

## Appendix A. Supplementary data

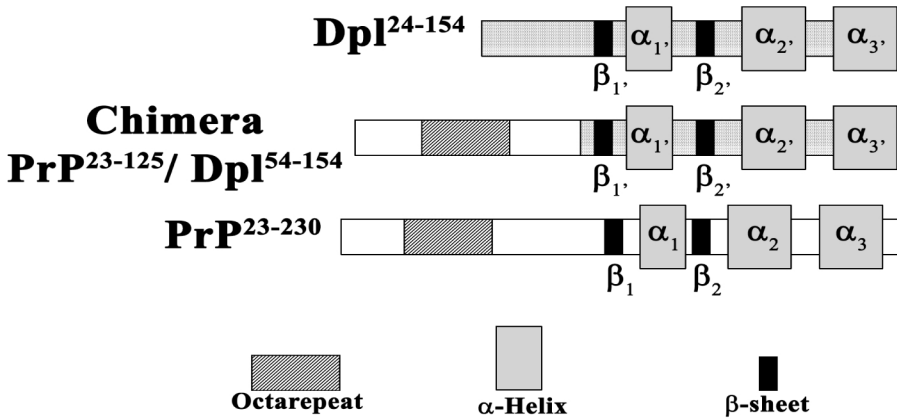
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.202](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.202).

## References

- [1] S.B. Prusiner, Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 13363–13383.
- [2] K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, et al., Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10962–10966.
- [3] Y. Bailly, A.M. Haeblerle, F. Blanquet-Grossard, S. Chasserot-Golaz, N. Grant, T. Schulze, G. Bombarde, J. Grassi, J.Y. Cesbron, C. Lemaire-Vieille, Prion protein (PrPc) 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 (2004) 244–269.
- [4] L. Westergard, H.M. Christensen, D.A. Harris, The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 629–644.
- [5] H. Bueler, M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.P. Lipp, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, M. Aguet, C. Weissmann, Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein, *Nature* 356 (1992) 577–582.
- [6] I. Tobler, S.E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P.A. McBride, J.C. Manson, Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein, *Nature* 380 (1996) 639–642.
- [7] S. Sakaguchi, S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto, T. Noda, Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene, *Nature* 380 (1996) 528–531.
- [8] D. Rossi, A. Cozzio, E. Flechsig, M.A. Klein, T. Rulicke, A. Aguzzi, C. Weissmann, Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain, *EMBO J.* 20 (2001) 694–702.
- [9] R.C. Moore, I.Y. Lee, G.L. Silverman, P.M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S.H. Pasternak, M.A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A.F. Smit, S. Katamine, G.A. Carlson, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.W. Melton, P. Tremblay, L.E. Hood, D. Westaway, Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 797–817.
- [10] C. Weissmann, E. Flechsig, PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research, *Br. Med. Bull.* 66 (2003) 43–60.
- [11] A. Behrens, Physiological and pathological functions of the prion protein homologue Dpl, *Br. Med. Bull.* 66 (2003) 35–42.
- [12] N.L. Tuzi, E. Gall, D. Melton, J.C. Manson, Expression of doppel in the CNS of mice does not modulate transmissible spongiform encephalopathy disease, *J. Gen. Virol.* 83 (2002) 705–711.
- [13] A. Behrens, A. Aguzzi, Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP(C) and its homologue Dpl, *Trends Neurosci.* 25 (2002) 150–154.
- [14] K.N. Frankenfield, E.T. Powers, J.W. Kelly, Influence of the N-terminal domain on the aggregation properties of the prion protein, *Protein Sci.* 14 (2005) 2154–2166.
- [15] E.M. Jones, K. Surewicz, W.K. Surewicz, Role of N-terminal familial mutations in prion protein fibrillization and prion amyloid propagation in vitro, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8190–8196.
- [16] C. Dumestre-Perard, J. Osmundson, C. Lemaire-Vieille, N. Thielens, A. Grives, B. Favier, F. Csopaki, M. Jamin, J. Gagnon, J.Y. Cesbron, Activation of classical pathway of complement cascade by soluble oligomers of prion, *Cell. Microbiol.* 9 (2007) 2870–2879.
- [17] R.A. Moore, C. Herzog, J. Errett, D.A. Kocisko, K.M. Arnold, S.F. Hayes, S.A. Priola, Octapeptide repeat insertions increase the rate of protease-resistant prion protein formation, *Protein Sci.* 15 (2006) 609–619.
- [18] M. Fischer, T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi, C. Weissmann, Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie, *EMBO J.* 15 (1996) 1255–1264.
- [19] D.C. Lee, A. Sakudo, C.K. Kim, T. Nishimura, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S.G. Chen, S. Itohara, T. Onodera, Fusion of doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation, *Microbiol. Immunol.* 50 (2006) 203–209.
- [20] C. Vendrely, H. Valadie, L. Bednarova, L. Cardin, M. Pasdeloup, J. Cappadoro, J. Bednar, M. Rinaudo, M. Jamin, Assembly of the full-length recombinant mouse prion protein I. Formation of soluble oligomers, *Biochim. Biophys. Acta* 1724 (2005) 355–366.
- [21] I.V. Baskakov, G. Legname, M.A. Baldwin, S.B. Prusiner, F.E. Cohen, Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 21140–21148.
- [22] H. Rezaei, F. Eghiaian, J. Perez, B. Doublet, Y. Choiset, T. Haertle, J. Grosclaude, Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities, *J. Mol. Biol.* 347 (2005) 665–679.
- [23] H. Mo, R.C. Moore, F.E. Cohen, D. Westaway, S.B. Prusiner, P.E. Wright, H.J. Dyson, Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 2352–2357.
- [24] E. Flechsig, D. Shmerling, I. Hegyi, A.J. Raeber, M. Fischer, A. Cozzio, C. von Mering, A. Aguzzi, C. Weissmann, Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice, *Neuron* 27 (2000) 399–408.
- [25] P.K. Nandi, E. Leclerc, D. Marc, Unusual property of prion protein unfolding in neutral salt solution, *Biochemistry* 41 (2002) 11017–11024.

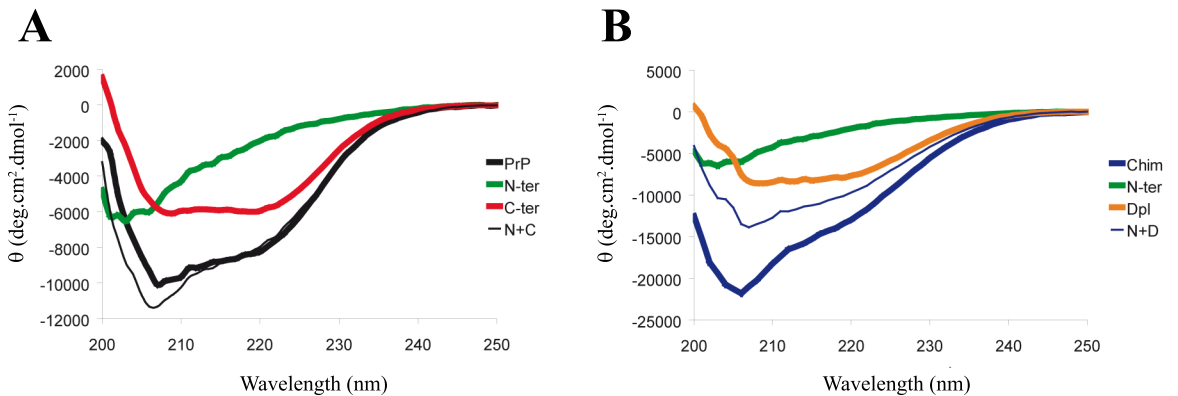
# Supplementary Material

## Figure S1



**Figure S1.** Schematic representation of PrP, Dpl and Chi proteins. All recombinant proteins were designed to be expressed without their signal peptide and glypiation signal sequences. Globular C-terminal domain of Dpl shows high similarity with PrP.

## Figure S2



**Figure S2.** Secondary structure of mouse recombinant proteins used in this study, as monitored by far-UV circular dichroism. (A) Full length PrP and PrP C-terminal domain display  $\alpha$ -helix rich CD spectra (respectively black and red lines), whereas PrP N-terminal domain is unstructured (green line). (B) Dpl resembles the  $\alpha$ -helix rich C-terminal domain of PrP (orange line), while Chi (blue line) displays a similar secondary structure to full length PrP. The curves representing the sum of N-terminal and C-terminal spectra of both PrP and Chi are shown as thin lines.

### 3.2.2) Résultats complémentaires et conclusion

Au vu de ces premiers résultats, nous avons construit d'autres protéines chimériques et analysé leur capacité d'agrégation en comparaison avec la PrP. L'objectif principal était de trouver une protéine dont l'agrégation se rapprocherait davantage de celle de la PrP, notamment en ce qui concerne la capacité à former des oligomères de petite taille (oligomères II).

- **La Chimère 2 (PrP<sup>23-134</sup>/ Dpl<sup>67-154</sup>)** comprend toute la région N-terminale de la PrP non structurée étendue au premier feuillet  $\beta$ . La partie de Dpl greffée est donc raccourcie en conséquence de son propre premier feuillet  $\beta$ . La région 125-134 qui représente le domaine central ou « cœur hydrophobe » de la PrP semble en effet importante dans la fonction de la PrP. Des souris délétées pour cette région de la PrP présentent un phénotype anormal et une dégénérescence progressive (Baumann et al, 2007).

- **La Chimère 3 (PrP<sup>23-124</sup> / Dpl<sup>25-154</sup>)** comprend sensiblement la même région N-terminale de la PrP que la chimère 1, greffée à la Dpl pleine longueur. Cette construction permet d'avoir une région N-terminale flexible plus longue, comprenant les acides aminés de la région non structurée de Dpl. L'importance de ces résidus dans le repliement de Dpl n'a pas été démontrée, toutefois notre hypothèse repose sur le fait qu'ils pourraient être impliqués dans le changement de conformation de Dpl.

#### 3.2.2.1) Matériel et méthode complémentaire

##### a) Constructions, expression et purification

Les chimères 2 et 3 ont été construites de façon séquentielle avec plusieurs vecteurs intermédiaires permettant l'expression des protéines en bactéries sous leur forme recombinante (sans peptide signal et sans ancre GPI), mais également pour leur clonage dans des vecteurs permettant l'établissement des lignées de souris transgéniques (voir matériel et méthode **article 3**).

Les jonctions PrP/Dpl ont été réalisées par PCR overlap en deux étapes et les amplicons clonés dans un vecteur intermédiaire TA-cloning pCR2.1 (Invitrogen). Les constructions résultantes, respectivement chi2-pCR2.1 et chi3-pCR2.1 ont été séquencées. Pour l'expression des chimères en bactéries, ces deux vecteurs ont servi de matrice dans une



deuxième PCR qui permet la délétion des régions codant le peptide signal dans le N-ter de PrP et l'ancre GPI dans le domaine C-terminal de Dpl, ainsi que l'introduction de fragments de restriction pour les enzymes *NdeI* et *XhoI*, respectivement en 5' et 3' de l'amplicon. Les fragments encodant les chimères ont été purifiés sur gel d'agarose puis sous-clonés dans le vecteur pET17b (Novagen). L'expression et la purification des chimères 2 et 3 ont été réalisées comme décrit précédemment (Dumestre-Perard et al, 2007; Erlich et al, 2008).

#### b) Cinétiques d'agrégation

Les cinétiques d'agrégation sont suivies par fluorescence de la thioflavine T qui s'intègre spécifiquement dans les feuillets  $\beta$ . Le protocole utilisé est détaillé dans l'**article 2**.

### 3.2.2.2) Résultats et conclusions

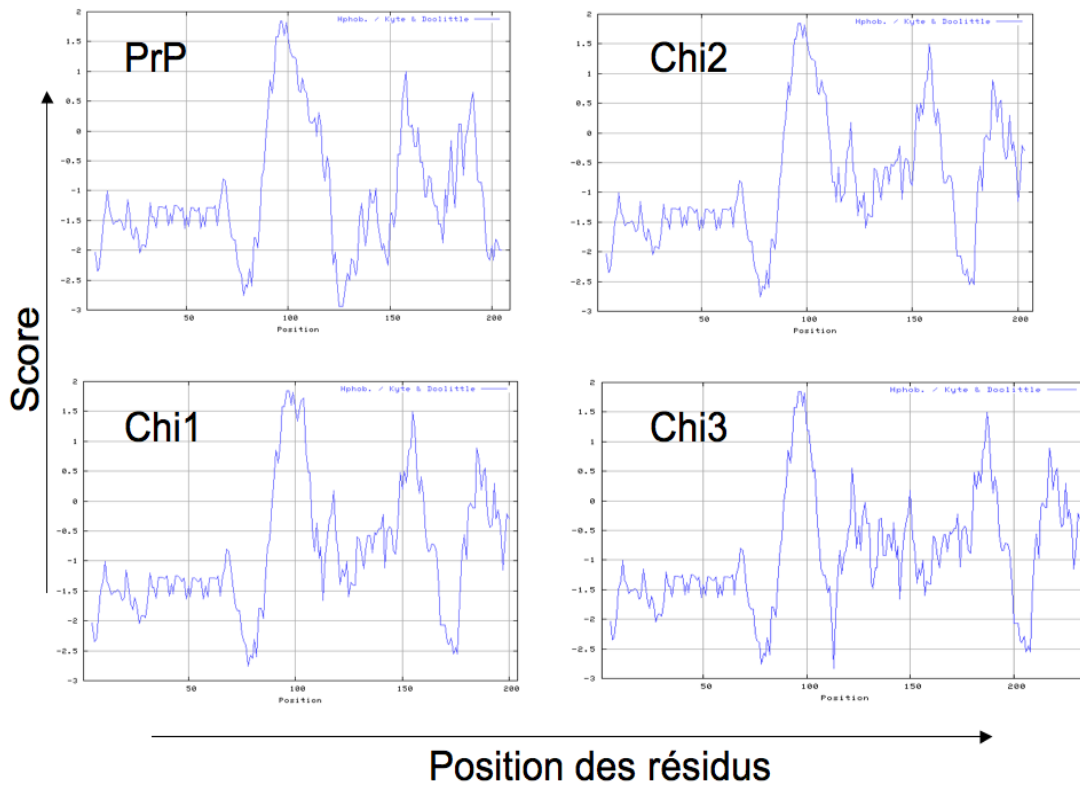
#### a) Caractéristiques physico-chimiques des protéines chimériques

Les différentes propriétés physico-chimiques des protéines chimériques 2 et 3 en comparaison avec PrP, Dpl et la chimère 1 sont résumées dans le **tableau 4**.

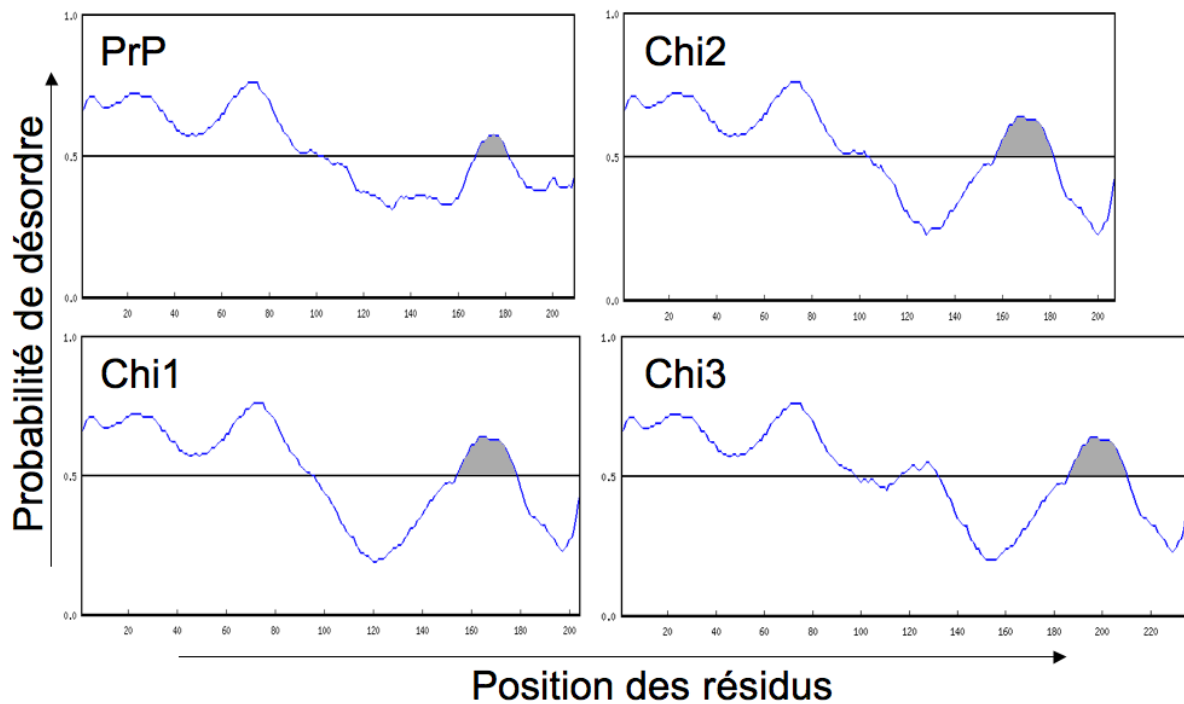
<b>Protéine</b>	<b>M.W</b>	<b>Epsilon</b>	<b>P.I</b>	<b>Nb A.A</b>
PrP	23 061	62 400	9,8	209
Dpl	15 227	29 640	9,5	134
Chimère 1	21 837	66 340	9,9	204
Chimère 2	22 192	67 170	9,6	207
Chimère 3	25 553	71 180	10,0	236

**Tableau 4 : propriétés physico-chimiques des chimères par rapport à PrP et Dpl**

Dans un premier temps, nous avons soumis les séquences en acides aminés des protéines chimériques à une analyse bio-informatique de deux paramètres couramment utilisés dans la détermination des structures secondaires : l'hydrophobicité (Kyte & Doolittle, 1982) (**Figure 15**) et la prédiction de régions intrinsèquement désordonnées (Yang et al, 2005) (**Figure 16**). Ces paramètres ont ensuite été comparés à ceux de la PrP.



**Figure 15 : Diagramme d'hydrophobicité des protéines PrP, Chi1, Chi2, Chi3.** Les diagrammes sont réalisés en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle, avec l'outil de prédiction ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>).

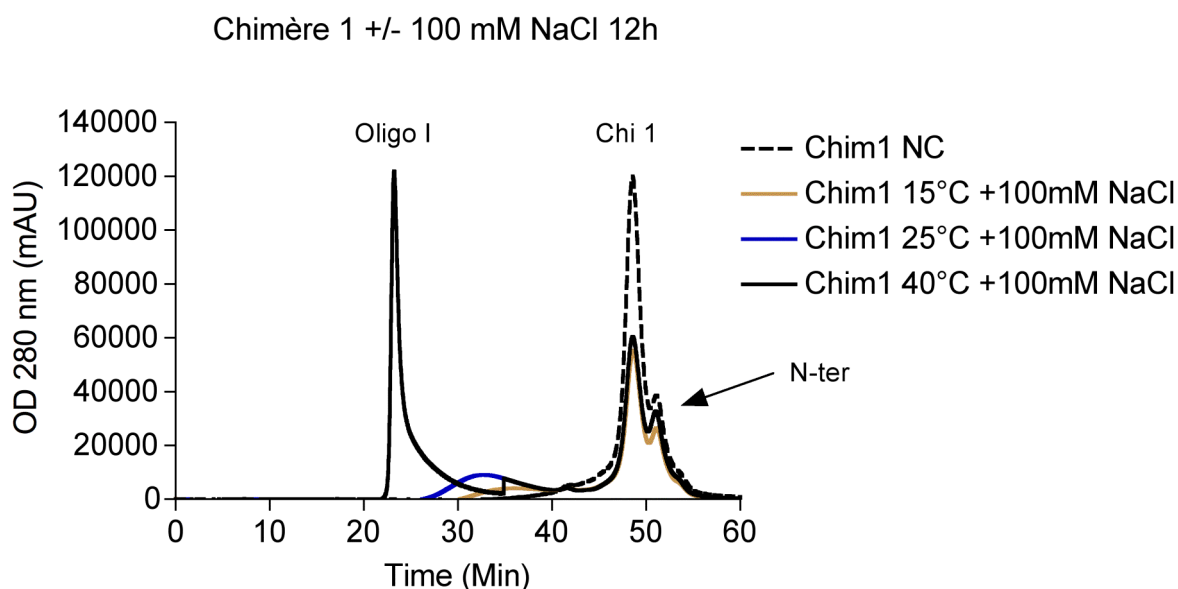


**Figure 16 : Prédictions des régions désordonnées des protéines PrP, Chi1, Chi2, Chi3.** Les régions désordonnées dans les domaines C-terminaux des protéines sont indiquées en gris. Réalisé avec l'outil RONN (<http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN>).

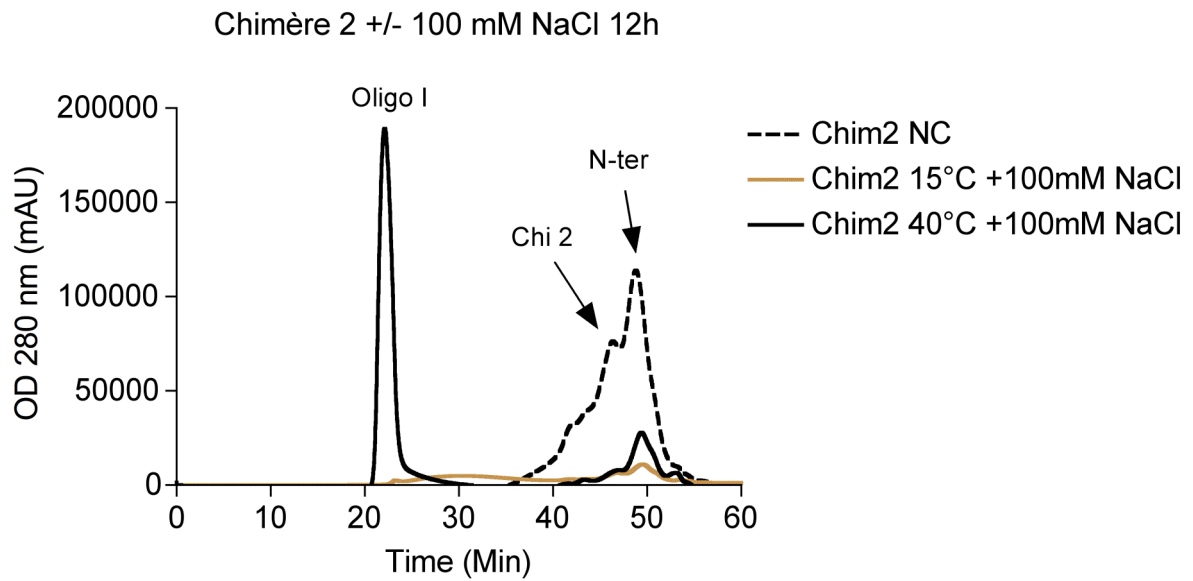
Les trois protéines chimériques présentent un diagramme des régions hydrophobes très similaire à celui de la PrP, suggérant que le domaine central hydrophobe présent dans la PrP est correctement conservé dans les constructions PrP/Dpl. Dans le domaine C-terminal structuré de la PrP, seule une petite région présente un score de probabilité de désordre positif (acides aminés 165-180). Cette région (2<sup>ème</sup> feuillet  $\beta$  - 2<sup>ème</sup> hélice  $\alpha$ ) semble importante pour l'initiation de l'agrégation de la protéine (Eghiaian et al, 2007). Dans les protéines chimériques, ce domaine de la partie C-terminale de Dpl fortement désordonné est élargi aux acides aminés 158 à 180 et présente un score plus important. Un tel changement dans cette région pourrait suggérer une capacité d'agrégation plus importante pour les protéines chimériques.

### b) Agrégation des protéines chimériques 2 et 3

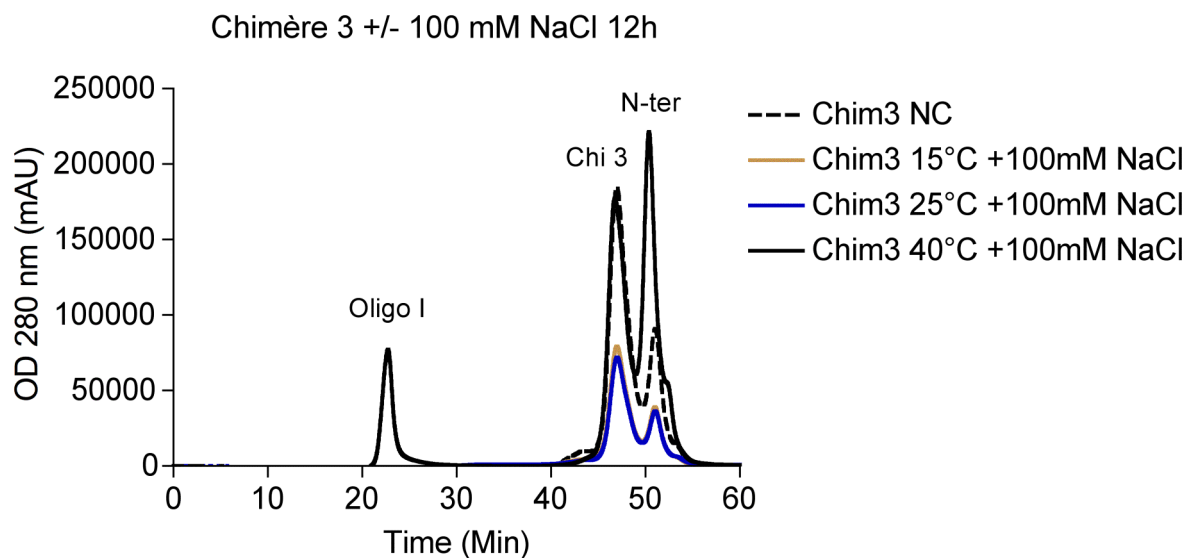
Afin de comparer la capacité des trois protéines chimériques à s'agréger, les chimères 1, 2 et 3 (5 mg/ml) ont été incubées en présence de 100 mM de NaCl à différentes températures (15, 25 et 40°C) et analysées par chromatographie d'exclusion de taille (respectivement **Figures 17, 18 et 19**).



**Figure 17 : Profil SEC de la chimère 1 après incubation en présence de 100 mM NaCl pendant 12h, à différentes températures.** Le fragment clivé correspondant à la région N-terminale est indiqué.



**Figure 18 : Profil SEC de la chimère 2 après incubation en présence de 100 mM NaCl pendant 12h, à différentes températures. Le fragment clivé correspondant à la région N-terminale est indiqué.**



**Figure 19 : Profil SEC de la chimère 3 après incubation en présence de 100 mM NaCl pendant 12h, à différentes températures. Le fragment clivé correspondant à la région N-terminale est indiqué.**

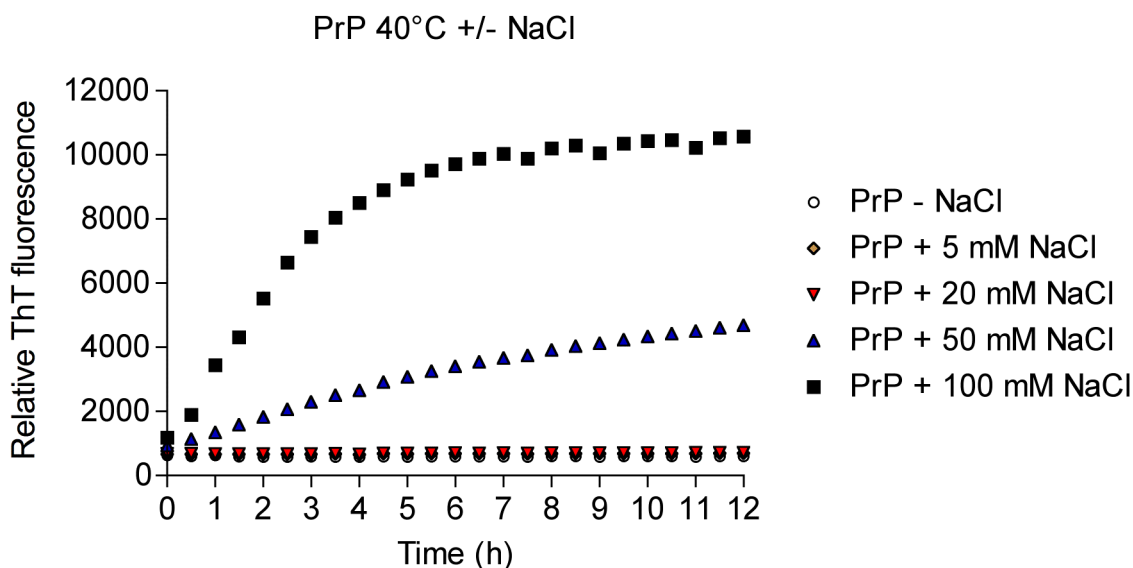
Une première observation des profils SEC permet d'affirmer que les chimères 2 et 3 ne sont pas homogènes à l'état monomérique. Cette observation est confirmée par l'analyse par SDS-PAGE de ces protéines après purification (données non montrées). Si la chimère 2 présente des contaminants protéolytiques très hétérogènes, la chimère 3 semble être particulièrement sujette à une protéolyse spontanée, probablement dans sa région N-terminale. Différentes modifications dans le protocole de purification n'ont pas amélioré l'homogénéité de ces protéines (notamment l'ajout d'inhibiteurs de protéases à différentes étapes pré et post-repliement sur la colonne).

A 40°C, les trois protéines forment des oligomères de type I, larges, qui sont élués dans le volume mort de la colonne (< 25 min). Au vu des premiers résultats obtenus pour la chimère 1, la cinétique d'agrégation des protéines chimériques semble être très rapide comparée à celle de la PrP. Nous avons donc choisi de vérifier si une diminution de la température de conversion pouvait permettre de ralentir le processus et d'obtenir d'autres types d'oligomères, de plus faible masse moléculaire, et possédant des propriétés proches des oligomères de type II de la PrP.

A 15°C, puis 25°C la chimère 1 présente des états oligomériques discrets, très hétérogènes car élués dans une fourchette de temps assez grande (28-40 minutes). La chimère 2 présente également des oligomères très hétérogènes à 15°C (temps d'éluion 22-40 minutes). Enfin la chimère 3 ne semble pas former d'espèces oligomériques à des températures inférieures à 40°C.

Globalement, peu d'agrégats sont formés à des températures <40°C, suggérant que cette température représente un minima pour la formation d'oligomères solubles stables de chimère. Ces données semblent indiquer que contrairement à nos hypothèses, la chimère 1 demeure la protéine dont la voie d'agrégation se rapproche le plus de la PrP.

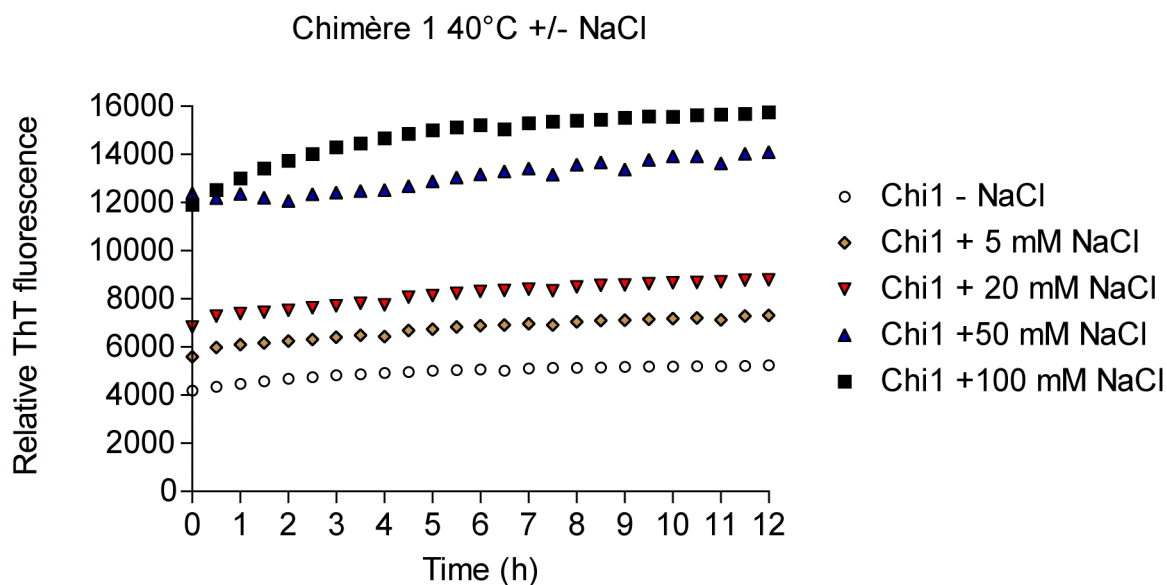
Les expériences précédentes ne nous permettent pas d'apprécier la cinétique d'agrégation de ces protéines, puisque les profils SEC révèlent uniquement l'état final des protéines après le processus d'oligomérisation. Pour mieux comprendre les différences observées entre la PrP et les protéines chimériques dans leurs propriétés d'assemblage, nous avons suivi l'évolution de la fluorescence de la thioflavine T au cours de l'agrégation.



**Figure 20 : Cinétique d'agrégation de la PrP suivie par fluorescence de la Thioflavine T.**

En présence de 100 mM de NaCl, la cinétique d'agrégation de la PrP ne présente pas de temps de latence, et l'augmentation de la fluorescence de la ThT, reflétant l'augmentation du taux de feuillets  $\beta$  dans les agrégats, atteint un plateau après 6 h d'incubation (**Figure 20**). Lorsque la PrP est incubée avec seulement 50 mM de NaCl, l'allure de la courbe diffère. La pente pendant la phase de croissance est plus faible et tend vers un plateau à 12h d'incubation. Pour des concentrations de NaCl < 50 mM (20, 5 et 0), la PrP ne s'agrège pas.

Les cinétiques observées pour la chimère 1 diffèrent fortement de celles de la PrP (**Figure 21**). Quelle que soit la concentration de sel utilisée, une très faible variation de fluorescence est observée au cours des 12h d'incubation. L'intensité de la fluorescence semble directement proportionnelle à la concentration de NaCl présente avec la protéine. Cette différence indique que l'assemblage de la chimère en oligomères riches en feuillets  $\beta$  est quasi instantané, dès l'addition du sel dans la réaction.



**Figure 21 : Cinétique d'agrégation de la chimère 1 suivie par fluorescence de la Thioflavine T**

c) En guise de conclusion

Dans le premier article présenté, nos travaux tendent à montrer que La PrP et la chimère  $N\text{-ter PrP}/C\text{-ter Dpl}$  recombinante présentent un comportement biochimique similaire, c'est-à-dire qu'avec la partie N-terminale de PrP, Dpl acquiert des propriétés de PrP :

- Sa structure secondaire monomérique est riche en hélices  $\alpha$ .
- En présence d'agent déstabilisant comme le NaCl, la chimère forme *in vitro* des oligomères solubles riches en feuillets  $\beta$  qui prennent une morphologie protofibrillaire.
- Ces oligomères sont résistants à une protéolyse modérée par la pepsine *in vitro*, tout comme la PrP<sup>sc</sup> *in vivo*.
- Après digestion à la pepsine, le « resistant core » semble être identique pour la PrP et la chimère.

L'étude complémentaire de nouvelles constructions nous a permis de mieux cerner les mécanismes d'assemblage de protéines PrP/Dpl par rapport à la PrP. Cet assemblage est beaucoup plus rapide que celui de la PrP et semble être uniquement dépendant de la concentration de l'agent déstabilisant utilisée. En présence de sel, Dpl seule forme des agrégats amorphes, précipités. L'ajout de la partie N-terminale permet de solubiliser les agrégats obtenus et aboutit probablement à un assemblage ordonné, comme en témoignent les morphologies des oligomères obtenus, de type protofibrillaire. Ce type d'assemblage peut être la conséquence de propriétés physico-chimiques intrinsèques de la protéine Dpl.

### 3.3) PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>Sc</sup> et complément

#### 3.3.1) Expression et fonction de la PrP<sup>c</sup> dans les cellules immunes

La PrP<sup>c</sup> est exprimée par les cellules souches hématopoïétiques chez la souris et son expression pourrait définir une sous-population particulière de ces cellules qui possèderaient un potentiel de repopulation à long terme (Zhang et al, 2006). Chez l'homme, les cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> expriment également la PrP<sup>c</sup> (Dodelet & Cashman, 1998). Au cours de la différenciation, les lymphocytes et monocytes maintiennent l'expression de la PrP<sup>c</sup>, mais celle-ci est réprimée dans le cas des granulocytes CD34<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> (Dodelet & Cashman, 1998). La maturation des monocytes et des cellules dendritiques conduit à l'augmentation de l'expression de la PrP<sup>c</sup> (Ballerini et al, 2006; Burthem et al, 2001 ; Durig et al, 2000 ). A l'inverse, la maturation des lymphocytes B et T tend à réprimer l'expression de la PrP<sup>c</sup> (Kubosaki et al, 2001; Liu et al, 2001 ).

La PrP<sup>c</sup> est détectée chez l'homme dans les lymphocytes B et T, les cellules « natural killer » (NK), les plaquettes, les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules folliculaires dendritiques (Dodelet & Cashman, 1998 ; Durig et al, 2000 ; Kubosaki et al, 2001 ; Li et al, 2001 ; Thielen et al, 2001). Chez l'Homme, parmi les cellules T, les cellules CD8<sup>+</sup> expriment un peu plus abondamment la PrP<sup>c</sup> que les CD4<sup>+</sup> (Durig et al, 2000; Politopoulou et al, 2000). De façon intéressante, l'expression de la PrP<sup>c</sup> est également plus importante dans les cellules T mémoire par rapport aux lymphocytes T naïfs (Li et al, 2001). Les profils d'expression génique sur puces à ADN ont révélé que le gène *prnp* murin était positivement régulé dans certains types de lymphocytes T régulateurs (Huehn et al, 2004).

#### 3.3.2) Fonction de la PrP<sup>c</sup> dans le système immunitaire

##### 3.3.2.1) Maturation des lymphocytes T

L'étude de deux types de souris transgéniques surexprimant la PrP<sup>c</sup> (Tga20 et Tg33) a permis d'appréhender l'influence de la PrP<sup>c</sup> sur le développement des lymphocytes (Jouvin-Marche et al, 2006). Dans ces modèles, la surexpression de PrP<sup>c</sup> induit des changements importants dans différentes étapes de la maturation des cellules T. Le thymus de ces souris



présente une importante atrophie par rapport à une souris sauvage. Dans les souris Tga20 la quantité des cellules  $T\alpha\beta$  est diminuée et elles présentent à l'inverse une augmentation du nombre de cellules  $T\gamma\delta$ . Si le régime alimentaire de ces animaux est supplémenté en cuivre, les souris présentent une restauration partielle du développement de cellules  $T\alpha\beta$ . Ce phénomène suggère que la surexpression de la  $PrP^c$  conduit à une chélation trop importante de cuivre et génère ainsi un contexte anti-oxydant important pour la différenciation des cellules T.

### 3.3.2.2) Phénotype immunologique des animaux $PrP^{0/0}$

Une autre façon de comprendre la fonction de la  $PrP^c$  dans le système immunitaire est l'étude des animaux déficients pour la PrP. Les souris  $PrP^{0/0}$  ne sont pas immunodéficientes. Elles présentent une expression normale de différents types de cellules immunitaires (cellules dendritiques, cellules souches hématopoïétiques, lymphocytes T et B ) ainsi que des molécules complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (Ballerini et al, 2006; Bueler et al, 1992) ; (Kubosaki et al, 2001; Zhang et al, 2006). De plus, les souris  $prp^{0/0}$  ne présentent pas de susceptibilité particulière aux infections, ni au développement de tumeurs. Par ailleurs, ces souris se sont avérées être un outil utile dans la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la PrP par immunisation avec la  $PrP^{Sc}$  ou la PrP recombinante (Prusiner et al, 1993; Williamson et al, 1996), indiquant l'existence d'une réponse B humorale fonctionnelle contre la PrP.

L'anomalie la plus marquée dans des souris  $PrP^{0/0}$  est l'altération des capacités d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, après une série successive de transplantations chez des receveurs  $PrP^{+/+}$  irradiés de façon létale (Zhang et al, 2006). La  $PrP^c$  pourrait ainsi être nécessaire à la croissance cellulaire en conditions extrêmes. Cette hypothèse est soutenue par les données provenant des puces d'expression génique qui montrent que l'expression de la  $PrP^c$  est augmentée dans les cellules  $CD8+$  entrant en prolifération homéostatique après transfert dans des souris immunodéficientes (Goldrath et al, 2004).

Les anomalies rapportées sur les souris  $PrP^{0/0}$  sont finalement assez limitées sur le plan immunitaire. Toutefois, étant donné que le KO post-natal de la  $PrP^c$  dans les cellules lymphoïdes n'a jamais été réalisé, il n'est pas exclu qu'un mécanisme compensatoire se mette en place dans les cellules lymphocytaires et myéloïdes et prenne ainsi le relais des fonctions de la  $PrP^c$ .

### 3.3.3) Rôle du système immunitaire dans la propagation des prions de la périphérie au système nerveux central

La participation du système immunitaire dans les EST est aujourd'hui incontestable, plus particulièrement dans le cheminement qui mène les prions des sites d'entrée périphériques jusqu'au cerveau. Néanmoins le rôle précis de chaque type cellulaire (lymphocyte B, cellule folliculaire dendritique, cellule dendritique) n'est pas encore totalement élucidé.

#### 3.3.3.1) Lympho-invasion

##### a) Rôle des organes lymphoïdes secondaires

La splénectomie, avant ou peu après une infection périphérique, permet de prolonger significativement la durée de vie des souris infectées par la Scrapie (Fraser & Dickinson, 1970) et l'absence des plaques de Peyer retarde la neuroinvasion des souris infectées par voie orale (Fraser & Dickinson, 1978). En revanche, la thymectomie est sans conséquence sur la progression de la maladie (Clarke & Haig, 1971). La réplication splénique n'est pas une condition *sine qua none* dans tous les modèles d'EST chez les rongeurs. Chez des hamsters syriens ayant subi une splénectomie puis infectés par voie intra-péritonéale avec la souche 263K, la neuro-invasion se produit malgré l'absence de réplication de PrP<sup>Sc</sup> dans le système lympho- réticulaire (Kimberlin & Walker, 1986). De plus, la splénectomie n'a aucune influence sur le temps d'incubation de souris infectées avec une souche adaptée de MCJ (Mohri et al, 1987). Le compartiment stromal serait le site de réplication de l'agent infectieux (Clarke & Kimberlin, 1984) car l'infectiosité de la fraction stromale est directement corrélée au poids de la rate entière et au poids du stroma.

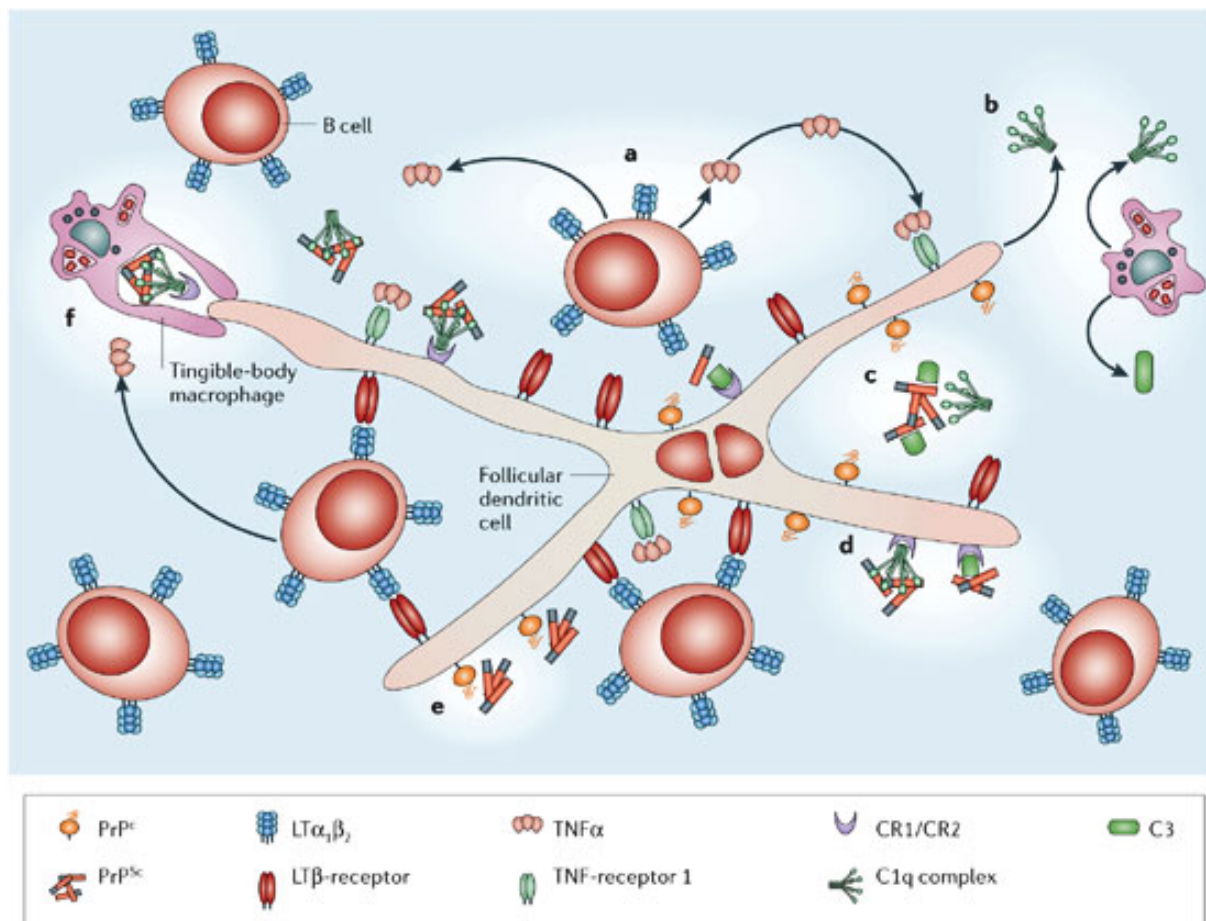
##### b) Implication des cellules immunitaires

L'implication des cellules du système immunitaire dans la pathogenèse précoce des EST a tout d'abord été étudiée par l'infection de souris immunodéficientes SCID. Les premières tentatives d'inoculation de ces souris par voie périphérique ont résulté en une résistance vis-à-vis de l'agent infectieux. Ces premières données indiquaient donc que le système lymphoréticulaire (LRS) était indispensable à la propagation des prions (O'Rourke et al, 1994). Toutefois, une deuxième étude montra qu'un faible pourcentage de transmission périphérique pouvait avoir lieu dans ces souris, démontrant que les prions pouvaient directement passer du péritoine au système nerveux et donc indépendamment du LRS

(Lasmezaz et al, 1996).

Par la suite il a été montré que des souris transgéniques déplétées en lymphocytes B ne développaient pas d'EST après inoculation périphérique (Klein et al, 1997), suggérant que les lymphocytes B jouaient un rôle crucial dans la pathogenèse des prions. Toutefois, cet effet a finalement été décrit comme indirect. En effet, les lymphocytes B sécrètent des cytokines comme la lymphotoxine LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 et le TNF $\alpha$  qui contribuent à maintenir la différenciation des cellules folliculaires dendritiques (FDC) (Mackay & Browning, 1998). Dans les tissus lymphoïdes, la PrP<sup>Sc</sup> s'accumule principalement au niveau de ces cellules, au sein des centres germinatifs des follicules B (Kitamoto et al, 1991). Les souris dépourvues de cellules B ou des cytokines LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 et TNF $\alpha$  sont donc également dépourvues de FDC différenciées et fonctionnelles et n'accumulent donc pas de PrP<sup>Sc</sup> dans leurs tissus lymphoïdes (Mabbott et al, 2000b; Prinz et al, 2002).

Les FDC appartiennent à une lignée distincte des cellules dendritiques myéloïdes puisqu'elles dérivent de précurseurs stromal non-hématopoïétiques. Ces cellules résident au sein des follicules primaires des cellules B mais également dans les centres germinatifs des tissus lymphoïdes. Les FDC ne sont pas des cellules circulantes et sont incapables de phagocyter. Morphologiquement, ces cellules présentent de nombreux prolongements dendritiques et s'étalent sur une grande surface, ce qui leur permet de capter et de retenir les antigènes sous leur forme native, pendant une longue période (Mandel et al, 1980). La membrane plasmique des FDC est équipée pour piéger les complexes immuns *via* les récepteurs des fragments Fc des anticorps et les récepteurs du complément CR1 et CR2 (Yoshida et al, 1993). A la surface des FDC, la PrP<sup>Sc</sup> s'accumule sur le plasmalemma et au niveau des espaces extracellulaires autour des dendrites (Jeffrey et al, 2000). L'accumulation de l'agent infectieux des EST dans les FDC est cruciale car en leur absence la neuro-invasion est retardée et l'incidence de la maladie est diminuée (Mabbott et al, 2000a; Mabbott et al, 2003; Montrasio et al, 2000) (**Figure 22**).



**Figure 22 : Modèle des mécanismes moléculaires et cellulaires de la pathogenèse des EST dans les tissus lymphoïdes.** **a)** Les cytokines produites par les cellules B permettent la maturation des FDC et les maintiennent à un stade différencié. En absence de cellules B ou des cytokines lymphotoxine  $LT\alpha_1\beta_2$  et  $TNF\alpha$ , les FDC ne peuvent devenir matures et l'accumulation de l'agent infectieux dans les tissus lymphoïdes est diminuée. **b)** Le mécanisme par lequel les FDC acquièrent l'agent infectieux est incertain. Une déficience des composants du complément, dont C1q et C3, altère l'accumulation de la  $PrP^{Sc}$  dans la rate. La  $PrP^{Sc}$  pourrait être opsonisée par les composants du complément (voir paragraphe 3.3.3.2). **d)** Le complexe formé par la  $PrP^{Sc}$  et les éléments du complément pourrait se fixer sur les récepteurs du complément (CR1/CR2) situés à la surface des FDC. **e)** Il est également envisageable que la  $PrP^c$  à la surface des FDC se comporte comme un récepteur pour la  $PrP^{Sc}$ . **f)** Les macrophages au sein des follicules B peuvent également capturer la  $PrP^{Sc}$ . Les macrophages pourraient phagocyter la  $PrP^{Sc}$  localisée à la surface des FDC et la dégrader. D'après (Mabbott & MacPherson, 2006)

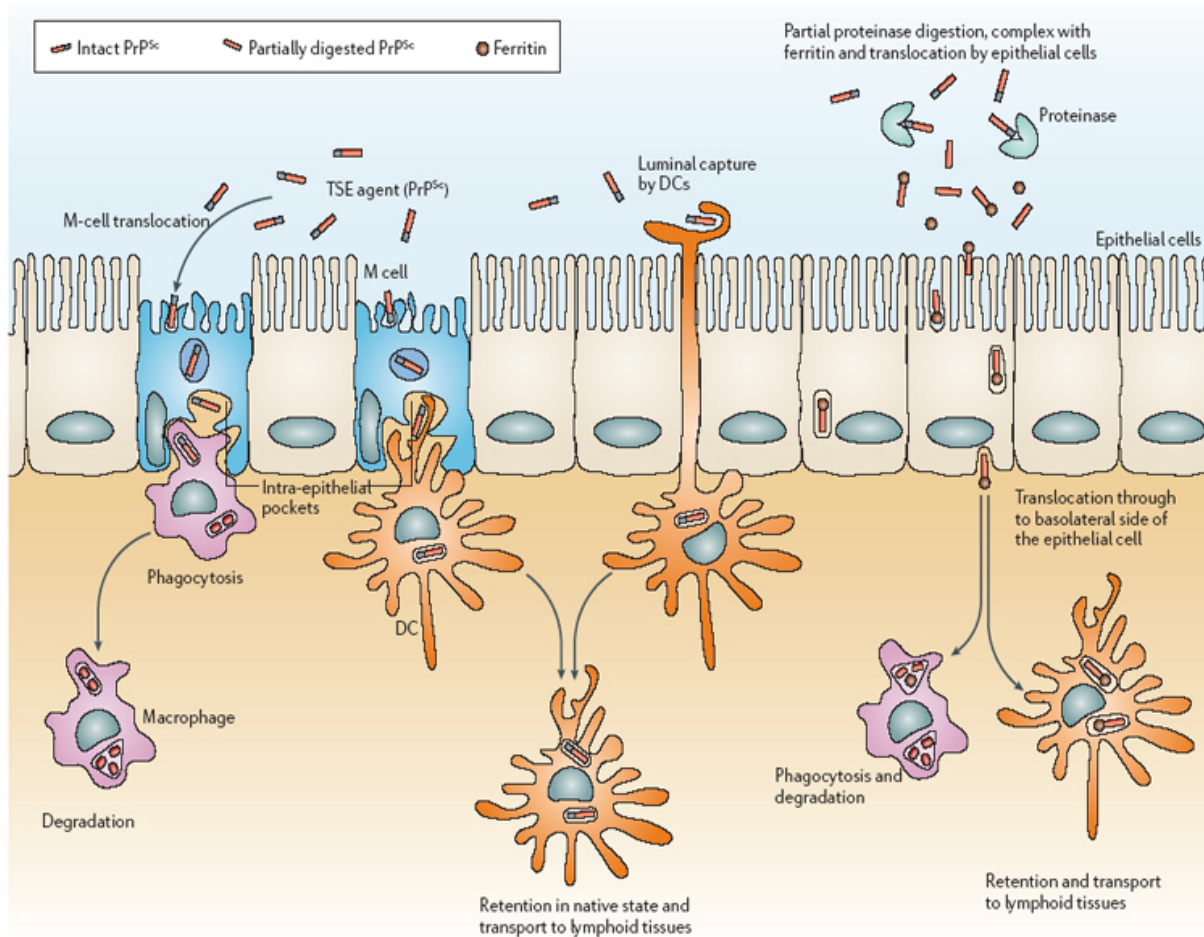
Les composés qui bloquent les voies de signalisation des récepteurs de la lymphotoxine  $LT\beta$  ou du  $TNF$  provoquent une déplétion temporaire des FDC et réduisent la susceptibilité à une infection périphérique par l'agent des EST (Mabbott & Bruce, 2002; Mabbott et al, 2000a); (Mohan et al, 2005; Montrasio et al, 2000). Les FDC jouent donc un rôle primordial dans l'accumulation de la  $PrP^{Sc}$  dans le tissu lymphoïde (Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Mabbott et al, 2006).

### 3.3.3.2) Transport de la PrP<sup>Sc</sup> de la périphérie vers les organes lymphoïdes

#### a) Transport à travers l'épithélium intestinal

Pour que l'agent infectieux puisse s'accumuler dans les FDC après contamination par voie orale, il doit d'abord traverser l'épithélium intestinal (Heppner et al, 2001). La surface luminale de l'intestin limite l'accès des micro-organismes pathogènes aux tissus profonds de l'hôte et elle est protégée par une monocouche de cellules épithéliales reliées par des jonctions serrées. Nichées au sein de l'épithélium vilieux et de l'épithélium associé aux follicules (EAF) des plaques de Peyer, se trouvent les cellules M (microfold), un type cellulaire épithélial spécialisé dans le transport transépithélial de macromolécules et de particules variées. Les cellules M permettent de prélever un échantillon du contenu de la lumière intestinale et la mise en place le cas échéant d'une réponse immunitaire appropriée. *In vitro*, il a été montré que les cellules M participent activement à la transcytose de la PrP<sup>Sc</sup> par le côté basolatéral de l'épithélium (Heppner et al, 2001).

Le transport trans-épithélial de l'agent infectieux pourrait également impliquer directement les cellules épithéliales. En effet, le traitement des homogénats de cerveaux de patients décédés de sMCJ avec des enzymes digestives (pepsine stomacale) génère des fragments de PrP<sup>Sc</sup> similaires au noyau résistant à la PK de PrP<sup>Sc</sup> de 27-30 kDa. Ces fragments peuvent alors former des complexes protéiques avec la ferritine. La ferritine est abondamment présente dans la viande et peut être absorbée par l'intestin. Ces complexes pourraient être ensuite captés par des cellules épithéliales intestinales et transcytosés par des structures vésiculaires *via* un mécanisme dépendant de la ferritine, comme cela a été démontré *in vitro* dans la lignée Caco-2 (Mishra et al, 2004).



**Figure 23 : Mécanismes de translocation de la PrP<sup>Sc</sup> à travers l'épithélium intestinal.** Plusieurs mécanismes sont envisagés, impliquant les cellules M, des complexes avec la ferritine, ou bien directement par les cellules dendritiques. D'après (Mabbott & MacPherson, 2006)

### b) Transport de la PrP<sup>Sc</sup> jusqu'aux FDC

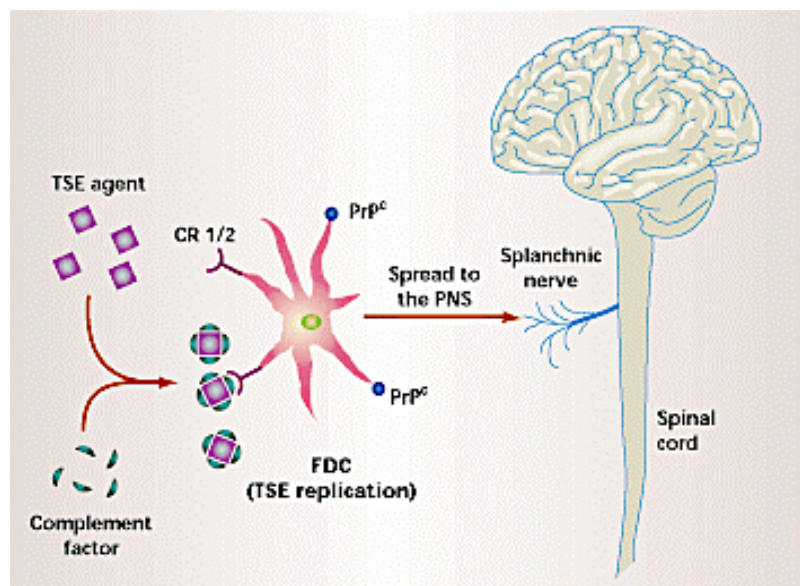
Dans les plaques de Peyer, le réseau de FDC est assez éloigné de l'épithélium associé aux follicules. Une fois la barrière intestinale traversée, l'agent infectieux doit ensuite être transporté jusqu'aux FDC. La membrane basolatérale des cellules M contient une large invagination : la poche intra-épithéliale. Les antigènes transcytosés par les cellules M sont libérés dans cette poche intra-épithéliale où ils sont pris en charge par les cellules B et T. Des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes sont également situés immédiatement en dessous, dans l'épithélium de la lamina propria. Si la transcytose de l'agent infectieux passe effectivement par les cellules M, celui-ci pourrait alors être pris en charge par les cellules situées dans la poche intra-épithéliale ou à proximité.

Les lymphocytes ne sont probablement pas impliqués dans le transport de l'agent infectieux lors d'une infection par voie orale car ils n'accumulent pas de quantité détectable

de PrP<sup>Sc</sup> suite à une exposition intra-intestinale (Huang et al, 2002). De plus, la surexpression ectopique de la PrP<sup>c</sup> dans les lymphocytes B ou les lymphocytes T chez des souris transgéniques construites sur fond *prnp0/0* ne permet pas chez ces souris de restaurer la susceptibilité à une infection par la Scrapie (Montrasio et al, 2001). Néanmoins, suite à une infection par voie i.p., les cellules B spléniques accumulent des quantités substantielles de PrP<sup>Sc</sup> (Aucouturier, 2001 #1836). Les cellules B pourraient acquérir l'infectiosité grâce à leurs contacts étroits avec les FDC de manière passive, par exemple par libération d'exosomes contenant la PrP<sup>Sc</sup>.

### c) Comment les FDC acquièrent la PrP<sup>Sc</sup> : découverte du rôle du complément

Une analyse approfondie du rôle des FDC dans la réplication de la PrP<sup>Sc</sup> a conduit à la mise en évidence de l'implication du système du complément dans la pathogenèse des EST. La déplétion d'un seul facteur du complément (parmi C1q, C2 et C3) dans des souris transgéniques résulte en un délai important dans l'apparition de la maladie quand ces animaux sont inoculés par voie périphérique avec les souches RML ou Me7 (Klein et al, 2001; Mabbott et al, 2001). Dans ces animaux déficients, l'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> dans les organes lymphoïdes (rate) est largement diminuée. Il a donc été suggéré que les facteurs du complément pourraient directement interagir avec l'agent infectieux (**Figure 24**).



**Figure 24 : Mécanismes hypothétiques de l'implication du complément dans la pathogenèse des EST.** La PrP<sup>Sc</sup> peut se lier aux facteurs du complément (C1q, C2, C3) et ces complexes sont capturés par les récepteurs au complément CR1 et CR2 exprimés à la surface des FDC. D'après (Cardone & Pocchiari, 2001).



Les complexes PrP<sup>Sc</sup>-complément pourraient ensuite être capturés par les récepteurs du complément CR1 (CD21) ou CR2 (CD35), qui sont exprimés à la surface des FDC. Des souris transgéniques, déficientes pour les récepteurs du complément CD21/35 et inoculées par voie périphérique, présentent un délai encore plus prononcé dans l'apparition des signes cliniques que les souris déficientes en facteur du complément (Klein et al, 2001) (Zabel et al, 2007), ce qui confirme l'implication de ces récepteurs.

Les auteurs avaient également suggéré que les fragments du complément C3b, C3d et C4b pouvaient cibler l'agent infectieux. La présence de ces facteurs signifie une implication totale de la cascade du complément, en incluant la production d'anaphylatoxines pro-inflammatoires (C3a, C4a, C5a). Dans le cerveau de patients atteints d'EST, on retrouve des complexes d'attaque membranaire (CAM ou C5b9), ce qui implique une lyse cellulaire médiée par le complément (Kovacs et al, 2004). Toutefois, Mabbott et collaborateurs ont par la suite montré que des souris déficientes pour le facteur C5 présentaient des temps d'incubation similaires aux animaux sauvages, après inoculation par voie périphérique, ainsi que des signes neuro-pathologiques identiques. Ces résultats indiquent que le facteur C5 du complément et les CAM ne sont pas directement impliqués dans la pathogenèse des EST (Mabbott & Bruce, 2004) chez la souris.

Depuis cette découverte originelle de l'implication du complément, différentes études ont porté sur les interactions entre les facteurs du complément et l'agent infectieux. Ces résultats sont décrits dans le paragraphe 3.3.4.

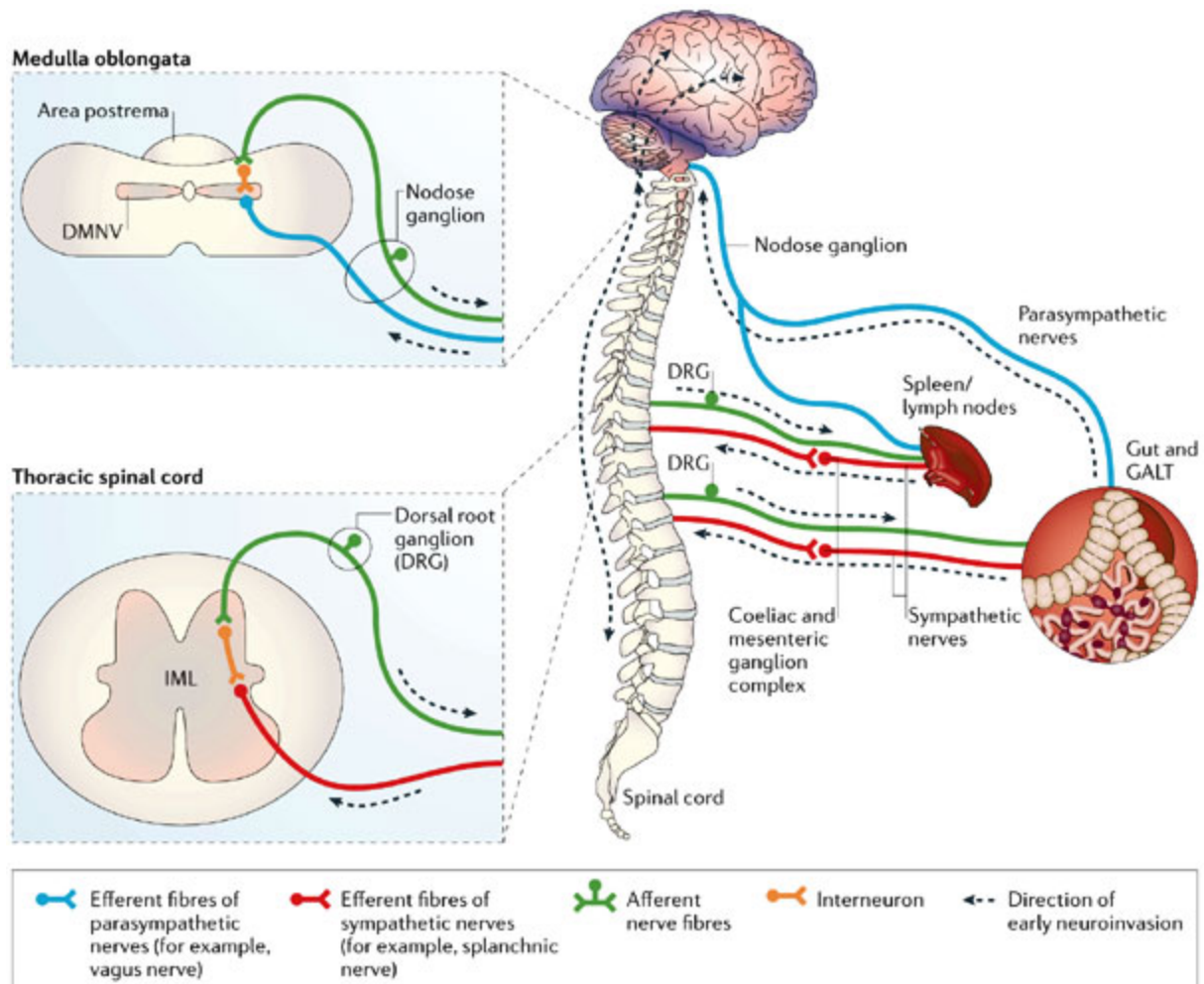
### 3.3.3.3) Neuro-invasion

L'analyse de la distribution spatio-temporelle de la PrP<sup>Sc</sup> dans le système nerveux des rongeurs inoculés par voie orale indique que l'agent peut se propager du tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT) au SNC, *via* le système nerveux entérique (Baldauf et al, 1997; Beekes et al, 1996; Beekes & McBride, 2000), en se propageant de façon rétrograde le long des fibres efférentes des nerfs sympathiques, comme le nerf vague et des nerfs parasympathiques, comme le nerf splanchnique (McBride & Beekes, 1999)(**Figure 25**).

Les nerfs parasympathiques, à la différence des nerfs sympathiques, entrent dans le SNC indépendamment du cordon médullaire, ce qui suggère que l'agent infectieux peut entrer dans le SNC de plusieurs façons. Une fois dans le cordon médullaire, la PrP<sup>Sc</sup> se propage aussi bien dans une direction antérograde que rétrograde (Beekes et al, 1996). Dans la Scrapie du mouton et dans la vMCJ chez l'Homme, il semblerait que le système nerveux entérique soit impliqué dans la neuro-invasion directement à partir du GALT (Haik et al, 2003;



Heggebo et al, 2003). Il est important de souligner que la propagation de l'agent des EST au sein du système nerveux périphérique et du SNC est dépendante de l'expression de la PrP<sup>c</sup> (Blattler et al, 1997; Glatzel & Aguzzi, 2000; Race et al, 2000).



**Figure 25 : Propagation de la PrP<sup>Sc</sup> au sein du système nerveux après inoculation par voie périphérique.** La PrP<sup>Sc</sup> se propage de l'intestin vers le SNC à travers différentes voies neuro-anatomiques. La propagation initiale se produit de façon rétrograde le long des voies efférentes motrices *via* les connexions synaptiques. Une des voies vers le SNC passe par les fibres sympathiques du nerf splanchnique et permet à l'agent infectieux d'atteindre la moelle épinière au niveau thoracique. Par la suite, l'agent se propage au cerveau selon une orientation caudal-cranial le long de la moelle épinière. La neuro-invasion à partir des intestins peut également se produire indépendamment de la moelle épinière. Dans ce cas, l'agent se propage le long des fibres parasympathiques du nerf vague vers le noyau moteur dorsal du nerf vague au sein de la medulla oblongata du cerveau. D'après (Mabbott & MacPherson, 2006)

Le mode d'innervation des organes lymphoïdes secondaires, dont la rate, est principalement sympathique, et de nombreuses études suggèrent que le transport de la PrP<sup>Sc</sup> des organes lymphoïdes jusqu'au SNC pourrait se faire *via* le système nerveux autonome (McBride & Beekes, 1999). La sympathectomie retarde le début de la Scrapie après une inoculation i.p., tandis qu'une hyper-innervation sympathique augmente la vitesse de réplication de la PrP<sup>Sc</sup> dans la rate et de la neuro-invasion en général. Ces résultats suggèrent que l'innervation des organes lymphoïdes secondaires est une étape limitante de la neuro-invasion (Glatzel & Aguzzi, 2001).

Une étude récente montre que la distance entre les FDCs et les nerfs spléniques a un impact considérable sur la vitesse de neuro-invasion (Prinz et al, 2003). Dans cette étude, la distance entre les FDCs associées aux centres germinatifs et les terminaisons nerveuses était réduite par ablation du récepteur de la chemokine CXCR5. Chez les souris CXCR5<sup>-/-</sup>, le repositionnement des FDCs à proximité des artérioles spléniques hyper-innervées a pour conséquence une augmentation de la vitesse de propagation des prions dans le SNC. Il est peu probable que la PrP<sup>Sc</sup> soit transférée directement par une synapse nerf-FDC dans la mesure où ces types de contacts physiques sont rares et que chaque type cellulaire occupe un site anatomiquement distinct. Dans la rate, les nerfs sympathiques sont associés aux vaisseaux sanguins, tandis que les FDCs sont situées à la périphérie de la pulpe blanche dans les follicules de cellules B. Il reste à déterminer si cet effet résulte d'une diffusion passive des prions, par exemple grâce à une libération de la PrP<sup>Sc</sup> accumulée dans les FDC *via* des exosomes, ou d'un processus de transport actif qui impliquerait la participation de cellules mobiles, telles que les lymphocytes B des centres germinatifs ou les DCs (Aucouturier et al, 2001).

#### 3.3.4) Interaction entre les protéines du complément et les isoformes de PrP

L'utilisation du modèle recombinant a permis une avancée considérable dans l'étude des interactions entre la PrP et les protéines du complément. Blanquet-Grossard et collaborateurs ont été les premiers à montrer, *in vitro*, une interaction entre la protéine C1q et une forme transconformée de la PrP (Blanquet-Grossard et al, 2005). Dans cette étude, les auteurs ont montré par plusieurs techniques que le C1q humain pouvait se fixer sur la PrP recombinante murine, mais seulement lorsque cette dernière était immobilisée à la surface d'une plaque ELISA ou d'une sensor chip de résonance plasmonique de surface (SPR). Cette immobilisation entraîne un changement de conformation dans le domaine C-terminal de la

PrP, nécessaire à la reconnaissance par les têtes globulaires de C1q. A l'inverse, la PrP monomérique sous sa forme soluble est incapable d'interagir avec C1q, suggérant que C1q est capable de distinguer la forme normale de la forme pathologique de la PrP. Par la suite, une étude a montré que cette interaction pouvait être reproduite en utilisant de la PrP<sup>Sc</sup> purifiée à partir d'extraits de cerveaux infectés, et qu'elle était fonctionnelle : la liaison PrP<sup>Sc</sup>-C1q conduit à l'activation de la voie classique du complément (Mitchell et al, 2007), que ce soit avec la PrP recombinante ou la PrP<sup>Sc</sup> purifiée. Si une telle activation se produisait *in vivo*, l'apparition des anaphylatoxines C3a et C4a pourrait entraîner une inflammation locale et ainsi permettre une réplication de la PrP<sup>Sc</sup> plus efficace dans le tissu lymphoïde. En effet, il a été démontré que des conditions pro-inflammatoires pouvaient induire l'accumulation et la réplication de prions dans des organes considérés comme non susceptibles à l'agent infectieux (Heikenwalder et al, 2005).

Plus récemment, les avancées dans la compréhension des mécanismes d'assemblage de la PrP ont permis l'identification d'intermédiaires oligomériques dans le processus de fibrillogenèse (voir paragraphe 3.1.2). Dans ce contexte, il est rapidement apparu important de vérifier si divers isoformes de la PrP présentaient des affinités et des conséquences fonctionnelles différentes vis-à-vis de C1q. Notre équipe a utilisé le modèle recombinant présenté dans le paragraphe 3.2.1 (Vendrey et al, 2005) pour adresser cette question.

Nous avons pu montrer que deux types d'oligomères solubles de PrP murine, de taille différentes et formés à pH acide, se liaient à C1q, ce qui n'est pas le cas du monomère. Cette interaction est fonctionnelle et déclenche la voie classique du complément par un test hémolytique TH50 (Dumestre-Perard et al, 2007). Cependant, dans cette étude nous n'avons pas pu établir quel type d'oligomère présentait la plus forte activation du complément. Des résultats similaires ont été rapportés par Sjöberg et al. en utilisant des oligomères formés par le domaine C-terminal de la PrP humaine (Sjöberg et al, 2008). De plus, les auteurs ont également montré que la PrP sous forme oligomérique est capable de lier des facteurs inhibant l'activation du complément, à savoir le facteur H et la C4binding protein (C4BP). Il reste toutefois à montrer que la balance activation-inhibition du complément joue un rôle *in vivo* dans la pathogenèse (Sjöberg et al, 2009). Les disparités trouvées entre les deux études sur le potentiel d'activation de la voie classique par les différentes isoformes de PrP (c'est-à-dire sous forme d'oligomères ou de fibres matures) sont discutées dans l'**article 2**.

Finalement, Flores-Langarica et al. ont montré très récemment que C1q pouvait interagir avec la PrP<sup>Sc</sup> dans un modèle cellulaire *in vitro*. En effet, des cellules dendritiques conventionnelles (cDC), incubées en présence d'extraits de cerveaux infectés par la souche

Me 7 et de sérum, présentent une forte internalisation de la PrP<sup>Sc</sup>. Cet effet est aboli lorsque les protéines du sérum ont été inactivé par la chaleur, ou lorsque les auteurs utilisent un sérum déficient en C1q (Flores-Langarica et al, 2009). De plus, cette endocytose est médiée par des récepteurs au C1q, comme la calreticuline, qui sont présents à la surface des cDC.

Les données de la littérature tendent à montrer que l'interaction entre la PrP<sup>Sc</sup> et C1q est fonctionnelle sous divers aspects : elle peut entraîner l'activation du complément avec les conséquences décrites ci-dessus, mais elle peut également jouer un rôle dans la transmission intercellulaire de l'agent infectieux.

### **3.4) Partie 2 des résultats : interaction entre C1q et les formes oligomériques de PrP et Chimère.**

#### 3.4.1) Avant-propos

Dans cette deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons tiré parti du modèle d'assemblage de la PrP murine pour déterminer quelles isoformes (monomère, petits  $\beta$ -oligomères, larges  $\beta$ -oligomères, fibrilles) présentaient la plus forte affinité pour le C1q, c'est-à-dire l'activation du complément la plus importante. Le potentiel cytotoxique de toutes ces isoformes a également été testé sur deux lignées cellulaires. Nous avons pu montrer que les petits oligomères (oligomères II, 8-15 mers) sont les espèces présentant les caractéristiques les plus intéressantes : ce sont les plus toxiques et également les oligomères se liant préférentiellement à C1q. Cette propriété nous a amenés à déterminer si C1q pouvait jouer un autre rôle que celui décrit précédemment, notamment s'il pouvait influencer l'agrégation de la PrP. Nous rapportons, à notre connaissance, la première évidence d'un tel processus coopératif entre ces deux protéines en suivant la cinétique d'agrégation de la PrP en présence de C1q par fluorescence de Thioflavine T. Dans ces conditions, nous avons montré que les oligomères II de PrP et C1q forment un complexe stable qui peut être purifié par SEC. Nous avons étudié une conséquence fonctionnelle de ce complexe : la cytotoxicité des oligomères II est inhibée quand ces derniers sont liés à C1q.

Notre approche présente plusieurs arguments qui permettent de penser que les mécanismes décrits seraient identiques dans un modèle *in vivo* :

- Travailler à pH acide permet de se rapprocher le plus possible de celui des compartiments cellulaires dans lesquels la conversion conformationnelle de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> a lieu (endosomes, proximité de la membrane plasmique).
- L'assemblage de la PrP se fait toujours à partir d'une protéine pleine longueur et à l'état natif, c'est-à-dire sans ajout d'agent chaotrope fort.

L'ensemble de ce travail permet d'appréhender de façon différente le rôle de C1q dans la pathogenèse des maladies à prions. Il est présenté sous forme d'article soumis pour publication.

**Article 2 : « Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers »**

Paul Erlich, Chantal Dumestre-Pérard, Wai Li Ling, Catherine Lemaire-Vieille, Gérard Arlaud, Nicole Thielens, Jean Gagnon and Jean-Yves Cesbron

Soumis dans :

**The Journal of Biological Chemistry**

## COMPLEMENT PROTEIN C1q FORMS A STABLE COMPLEX WITH CYTOTOXIC PRION PROTEIN OLIGOMERS

Paul Erlich<sup>1,2</sup>, Chantal Dumestre-Pérard<sup>1,2,3</sup>, Wai Li Ling<sup>4</sup>, Catherine Lemaire-Vieille<sup>1,2</sup>, Gérard J. Arlaud<sup>4,5</sup>, Nicole M. Thielens<sup>4,5</sup>, Jean Gagnon<sup>1,2</sup> and Jean-Yves Cesbron<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier, France*

<sup>2</sup> *CNRS, UMR 5163, France*

<sup>3</sup> *Laboratoire d'Immunologie, Département de Biologie, CHU Grenoble, Grenoble, France*

<sup>4</sup> *Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble, France*

<sup>5</sup> *CNRS, UMR 5075, France*

Running title: C1q-PrP complexes

Address correspondence to: Jean-Yves Cesbron, LAPM, UMR5163, Université Joseph Fourier, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France. Tel: +33 4 76 63 71 60. Fax: + 33 4 76 63 71 23. E-mail: jean-yves.cesbron@ujf-grenoble.fr

**A growing number of studies have investigated the interaction between C1q and PrP, but the oligomeric form of PrP involved in this interaction remains to be determined. Aggregation of recombinant full-length murine PrP at 40°C in the presence of 100 mM NaCl allowed us to isolate three different types of oligomers by size-exclusion chromatography. In contrast to PrP monomers and fibrils, these oligomers activate the classical complement pathway, the smallest species containing 8-15 PrP protomers being the most efficient. By monitoring the kinetics of PrP aggregation using thioflavine T fluorescence, we show that C1q has a cooperative effect, the interaction leading to formation of stable C1q/PrP complexes. In these complexes, C1q interacts through its globular domains preferentially with the smallest oligomers, as shown by electron microscopy, and retains the ability to activate the classical complement pathway. Using two cell lines, we also provide evidence that C1q inhibits the cytotoxicity induced by the smallest PrP oligomers. The cooperative interaction between C1q and PrP could represent an early step in the disease, where it prevents elimination of the prion seed, leading to further aggregation.**

Prion diseases represent a group of singular transmissible neurodegenerative disorders that affect mammals, and occur when the cellular prion protein PrP<sup>c</sup> is converted into an abnormal aggregated isoform called PrP<sup>Sc</sup> (1). The host PrP<sup>c</sup> is an  $\alpha$ -helix-rich 30-35 kDa glycoprotein expressed mainly in neuronal tissues in humans and other animals (2). Its expression and membrane attachment through a glycosylphosphatidyl anchor are crucial for transmissible spongiform encephalopathies

(TSE) susceptibility (3). The widely supported protein-only hypothesis stipulates that the infectious agent can replicate by converting the natively folded prion protein (PrP<sup>c</sup>). During the disease, changes occur in the secondary and tertiary structure of PrP<sup>c</sup>, resulting in an increased content of  $\beta$ -sheet which leads to the formation of aggregates that display a dramatic shift in their physico-chemical properties compared to those of the original protein (4). These  $\beta$ -sheet-rich aggregates are resistant to degradation by proteases, and tend to form oligomers that can further assemble into amyloid fibrils. Recent investigations support the hypothesis that in protein misfolding and aggregation pathologies like Alzheimer disease, smaller subfibrillar particles may be much more pathological than larger amyloid fibrils or plaques (5). In line with this hypothesis, Silveira and colleagues have reported that the smallest aggregate able to initiate TSE pathology is equivalent to approximately 14-28 PrP molecules (6). In the past, several *in vitro* recombinant models have been used to investigate the biochemical and biophysical properties of such oligomeric intermediates (7-10).

Innate immunity has been shown to play an important part in the neuroinvasion process following peripheral routes of infection with prions. Mice defective for the complement proteins C1q, C3 or factor B display partial resistance to such experimental inoculation routes, and accumulate less PrP<sup>Sc</sup> in the lymphoid organs than wild-type mice (11,12). Thus, complement is thought to play a role in the spreading of prions from the periphery to the central nervous system, via follicular dendritic cells. These cells, which are able to trap immune complexes at their surface, express high levels of

PrP<sup>c</sup> and complement receptors on their membrane.

A growing number of studies are addressing the interaction between PrP and C1q (13-15). In previous works, we have characterized the interaction between C1q and several oligomeric PrP species formed *in vitro* (16,17). Our data indicated that this interaction occurs through the globular heads of C1q, and only occurs when PrP is converted into  $\beta$ -sheet-rich oligomers. Moreover, this interaction has biological relevance, as it triggers activation of the classical pathway of complement. However the size of the oligomer which was the most efficient in complement activation was unresolved.

In the present work, we identify small-size oligomers as the preferential partners for C1q. These are composed of 8 to 15 PrP molecules and display the highest complement activation potential. Co-aggregation of PrP and C1q leads to the formation of a stable complex able to promote complement activation. This outlines a novel role for C1q in prion disease, as a cooperative partner in the PrP aggregation process. We assessed the cytotoxicity potential of PrP oligomers of several sizes using two cell culture models, and found that the smaller oligomers trigger cell death. Interestingly, this effect is inhibited through formation of C1q-PrP complexes.

## Experimental procedures

*Protein expression and purification.* Cloning, expression and purification of the recombinant full-length (23-230) murine prion protein have been previously described (17). Protein integrity was confirmed by 15% SDS-PAGE, circular dichroism analysis, and aliquots at a concentration of 10 mg/ml were stored at -20°C until use. Prior each experiment, protein samples were centrifuged at 13,000 x g for 20 min at 4°C to eliminate aggregated material. C1q, its globular domain, C1 inhibitor and the proenzyme form of the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer were purified from human serum and quantified as described previously (18,19). For aggregation kinetics studies, C1q and its globular domain were dialyzed against 20 mM Na acetate pH 3.5 prior to use.

*Conversion of PrP into  $\beta$ -oligomers and aggregation kinetics.* PrP  $\beta$ -oligomers were prepared by incubating freshly purified monomeric recombinant PrP (5 mg/ml) at 40°C

or 70°C for 18 h in the presence of 100 mM NaCl.  $\beta$ -oligomers were separated by Size Exclusion Chromatography (SEC) using a G4000SW HPLC column (600 mm x 7.5 mm, Waters), in 50 mM Na acetate, 50 mM NaCl, pH 4, at a flow rate of 0.5 ml/min. Elution was monitored at 280 nm, and fractions corresponding to protein species were collected as specified in the text. As indicated in supplemental data, the weight-average molar mass of oligomers was measured as described in (10) by static MALLS using a DAWN-EOS detector (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA).

The aggregation kinetics was monitored for 18 h by measurement of Thioflavin T (ThT) fluorescence, using a Fusion Alpha FP HT microplate reader (Perkin Elmer, excitation filter 436/20, emission filter 520/20). Kinetics experiments were carried out in a 96-well plate format, in a final volume of 75  $\mu$ l, with 2 drops of mineral oil (Sigma) on top of each well to avoid evaporation during incubation at 40°C. For all experiments, PrP (5 mg/ml) was incubated in the presence of 10  $\mu$ M ThT (Sigma) in 20 mM Na acetate pH 3.5, in the presence of 100 mM NaCl. When indicated, lysozyme, C1q or its globular domain were added to the reaction mixture at concentrations ranging from 0.2 to 0.4 mg/ml. End-point reactions were analyzed by SEC as described above.

*Electron Microscopy.* Samples of each protein species at a concentration of 0.04 mg/ml were adsorbed onto the clean face of a carbon film, deposited on a mica sheet and negatively stained with either 2% (w/v) ammonium molybdate (C1q) or 2% (w/v) uranyl acetate (PrP and C1q/PrP). The specimens were examined with a Philips CM12 electron microscope equipped with a LaB6 filament operating at 120 kV. The micrographs were recorded under low dose conditions (<20 electrons/ $\text{\AA}^2$ ) at a nominal magnification of 45,000. Images were recorded using a Gatan Orius<sup>TM</sup> CCD camera with a pixel size of 0.2 nm.

*Dot blot quantification of C1q.* One  $\mu$ g of each SEC-purified fraction (calculated from absorbance at 280 nm using a PrP extinction coefficient of 62,400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) was spotted onto a nitrocellulose membrane using a dot blot apparatus (Biorad). The membrane was blocked with 5% non fat dry milk in PBS containing 0.1% (w/v) Tween 20 for 1 h at room temperature, then incubated with monoclonal anti-human C1q antibody JL-1 (Hycult



Biotechnology, 1:500) in the blocking buffer. After incubation with anti-mouse HRP antibody (Jackson, 1:5,000) in the blocking buffer, membranes were developed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia) and exposed to an X-Ray film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia). Films were scanned, treated with the ImageJ software, and the percentage of C1q in each fraction was determined and plotted using GraphPad Prism 4.

*C1 activation assay.* The C1 activation assay was performed as previously described (20). The C1 complex (0.25  $\mu$ M) was reconstituted from equimolar amounts of C1q and proenzyme C1s–C1r–C1r–C1s, mixed with 1  $\mu$ M C1 inhibitor, and then incubated in 145 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM triethanolamine–HCl, (pH 7.4) with varying types of PrP oligomers (2.5  $\mu$ M final concentration) for 90 min at 37°C. The reaction mixtures were submitted to SDS-PAGE analysis under reducing conditions. After electrotransfer to a nitrocellulose membrane (Biorad), C1s was revealed by western blot analysis using a rabbit polyclonal antibody.

*C4 cleavage assay.* SEC-purified PrP oligomers II or C1q/PrP complexes were coated on ELISA plates (Maxisorb Nunc) at 5  $\mu$ g/ml in 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6 overnight at room temperature. Wells were washed 3 times in PT (PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20), saturated for 1 h in PBS-1% (w/v) BSA, and washed 3 times in PT. Normal Human Serum (NHS) from healthy donors (Etablissement Francais du Sang) was used as a source of complement factors necessary for complement activation. NHS was diluted 0-4% in BVB++ (1% BSA, 5 mM Veronal buffer, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% Tween 20), added to the wells and incubated for 30 min at 37°C. Plates were washed 4 times in PT. When indicated, C1q-depleted serum was used instead of NHS. Briefly, C1q-depleted serum was obtained by incubating 1.2 ml of NHS with 240  $\mu$ l of ovalbumin–antiovalbumin Ig complexes (19) for 1 h at 4°C. The depletion was performed twice. The C1q-deficient serum comprised all factors necessary for activation of the complement classical pathway and contained <13 U/L C1q as measured by nephelometry. To detect the C4 cleavage product C4b, a rabbit anti-C4b polyclonal antibody (Siemens, 1:1000 diluted in PT containing 1% (w/v) BSA) was added for 1 h at 37°C. After washing and addition of peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Jackson, diluted 1:20,000 in PT containing 1%

(w/v) BSA) for 1 h at 37°C, plates were washed and developed with tetramethylbenzidine (Sigma). Reaction was stopped by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N and read at 450 nm.

*Cell culture and in vitro neurotoxicity assay.* Cell lines were generous gifts from S. Lehmann, CNRS UPR1142, Montpellier, France. N2aD11 cells (PrP<sup>+/+</sup>) and Npl1 hippocampal cells derived from PrP<sup>0/0</sup> mice were maintained in Opti-Mem + Glutamax (Invitrogen) medium supplemented with 10% fetal calf serum and 50  $\mu$ g/ml gentamycin, and grown in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. For toxicity assays, cells were seeded at a density of 10,000 in a 96-well plate. Cells at ninety percent confluence were incubated with various preparations of oligomeric PrP or C1q/PrP complexes as stated in the text. SEC-purified fractions were diluted to the indicated concentrations in 100  $\mu$ l using FCS-free and antibiotic-free Opti-MEM medium. Each fraction was assayed in three independent experiments. For controls, cells were either untreated, or incubated in the presence of an equivalent volume of protein buffer. Twenty-four hours after exposure to the proteins, cell viability was measured using the WST-1 assay (Roche), according to manufacturer's instructions. Briefly, 10  $\mu$ l of the reagent was added to each well, and incubated for 5 h. The optical density at 450 nm was measured using an ELISA plate reader. Results were plotted using the GraphPad Prism 4 software, and statistical analysis was performed using student T test with Welsh correction.

## RESULTS

*PrP oligomers trigger differential complement activation depending on their size.* Direct interaction between C1q and different isoforms (ie fibrils or  $\beta$ -oligomers) of PrP has been described (13,17). However, the precise nature of the PrP isoforms that activate the C1 complex remains unknown. Different PrP species were prepared and purified in order to answer this question.

Recombinant murine PrP 23-230 can form soluble oligomers when incubated in 100 mM NaCl at 40°C or 70°C (Fig. 1A). Two types of oligomers (I and II) found in different proportions depending on the temperature used were previously identified by size-exclusion chromatography (SEC) (10,17,21). In the present study, using a more resolving SEC column we were able to identify a third oligomeric species (I', Fig. 1A), that has intermediate size. Whereas

oligomers II are composed of 8 to 15 mers, oligomers I' correspond to approximately 36 mers (supplemental data Fig. S3). Oligomers I, I' and II were collected during SEC and each tested for their ability to trigger complement activation through the classical pathway.

A C1 activation assay (20) was performed using equimolar amounts of C1q and proenzyme C1s-C1r-C1r-C1s, mixed with excess C1 inhibitor to prevent self-activation, and incubated in the presence or absence of the oligomeric species at 2.5  $\mu$ M (Fig. 1B). The generation of the C1s A chain was monitored by western blot using an anti-C1s antibody. In keeping with our previous findings (17), monomeric PrP (lane 3) failed to activate C1. The smaller oligomers II displayed strong C1 activation (lane 6), whereas the larger oligomers I (lane 4) and I' (lane 5) were less effective. Aged PrP fibrils (lane 7) triggered only very slight C1s cleavage, comparable to that observed for the negative control (lane 2). These fibrils were obtained by leaving monomeric PrP at 4°C in its storage buffer (20 mM sodium acetate, pH 3.5) for at least 10 weeks, and the presence of fibrils was confirmed by electron microscopy (supplemental data Fig. S1). Thus, these experiments provided clear evidence that smaller PrP oligomers are more efficient activators of the classical complement pathway.

*C1q enhances the kinetics of formation of PrP oligomers.* Our previous results have indicated that a conformational change in PrP is required for C1q binding (16,17). This prompted us to assess whether C1q binding can occur during the process of PrP transconformation and aggregation. For this purpose, ThT fluorescence was used to investigate the kinetics of formation of PrP aggregates, in the presence of C1q, or its globular heads (GH) (Fig. 2).

Using our oligomerization conditions (incubation for 18 h at 40°C in the presence of NaCl), PrP started to aggregate immediately, as no lag phase was observed. The kinetics of  $\beta$ -sheet formation was fast, and fluorescence reached a plateau after about 6 h of incubation (Fig. 2A). Under the same conditions, incubation of PrP in the presence of 0.2 mg/ml C1q (PrP-C1q molar ratio=400:1), led to a short lag phase in the aggregation which reached a plateau at about 18 h. The fluorescence observed was higher than for PrP alone, indicating enhancement of  $\beta$ -sheet formation in the presence of C1q (Fig. 2A). Increasing C1q concentration to 0.3 and 0.4 mg/ml did not

modify the lag phase, but led to a dose-dependent increase in the ThT fluorescence after 6 h (Fig. 2A).

Binding of PrP oligomers to C1q occurs through the globular domain of C1q (17). Therefore, we next investigated whether this domain alone could account for the variations induced by the whole C1q molecule. Using this domain instead of intact C1q only slightly modified the aggregation curve of PrP (Fig. 2B). No lag phase was observed, but a small dose-dependent increase in the ThT fluorescence was seen compared to the curve with PrP only.

We next addressed the question whether C1q itself could replace NaCl as a destabilizing agent and thus be sufficient to initiate aggregation. When NaCl was omitted in the reaction mixture, PrP did not aggregate in the presence of increasing concentrations of C1q (data not shown). In the presence of NaCl, no effect was observed when replacing C1q by lysozyme as an irrelevant control protein (supplemental data Fig. S2). C1q, its globular domain and lysozyme alone did not bind to thioflavin T, as monitored by kinetic analysis of ThT fluorescence (Fig. 2A, B and supplemental data Fig. S2, respectively). Taken together, these data suggested that C1q can influence the aggregation of PrP in a cooperative manner, but only when structurally intact, as a hexameric molecule.

*C1q forms a stable complex with PrP oligomers.* Although C1q enhances formation of PrP aggregates, the nature of the products formed upon aggregation is unknown. Therefore, the kinetic end point reactions were analyzed by SEC after 18 h of incubation. When PrP was aggregated alone, separation of the reaction products revealed two major peaks of  $\beta$ -oligomers, I' and II, as previously described (Fig. 3A). The elution profile of the C1q/PrP aggregation mixture showed a similar pattern with specific differences. First, the peak corresponding to oligomers II was markedly decreased. Secondly, the peak encompassing oligomers I' became wider, and a small proportion of larger species was detected in the void volume (elution time 25 min) (Fig. 3A). This suggests that C1q interacts preferentially with oligomers II.

In order to ascertain the presence of C1q within the elution profiles, the C1q/PrP aggregation mixture was submitted to SEC, fractions were collected and subjected to dot-blot quantification of C1q using a monoclonal

antibody raised against the native collagen moiety (Fig. 3B, elution time 25-38 min). C1q was found in the first 10 fractions, and fractions 1-4 contained 80% of total C1q. Fractions 5-10 contained only a small amount of unbound C1q, as judged from the retention time of C1q alone (Fig. 3A), whereas fractions 11-15 did not contain any C1q (Fig. 3B). Finally, we analyzed the kinetic end point reactions of the C1q globular domain/PrP co-aggregation mixture. As seen for the C1q/PrP aggregation products, we observed a decrease in the peak corresponding to oligomers II (Fig. 3C), suggesting that these oligomers interact with the globular domain of C1q.

The above observations provided evidence that an oligomeric form of PrP was complexed with C1q, but the nature of this oligomer within the complex remained to be established. To gain insights into the structure of the C1q/PrP complexes, SEC-purified fractions were analyzed by electron microscopy. PrP oligomers I' (Fig. 4A) appeared as annular particles stuck to each other, strongly resembling the morphology of oligomers I, whereas oligomers II had the appearance of small spherical particles with a diameter of about 50 Å, as previously described (10,21) (Fig. 4B). As expected from previous reports, analysis of the C1q molecule alone showed a central collagen-like stalk prolonged by six small C-terminal globular domains (Fig. 4C-E) (22-24). In the C1q/PrP fractions collected at the beginning of the elution profile, the morphology of C1q appeared quite different. The globular domains were significantly larger (Fig. 4F-K), each globular domain appearing to be bound to one oligomer molecule, with a size corresponding in most cases to the type II species.

*Complex-bound C1q is functional.* As described above, SEC analysis revealed that fractions 5-10 contained a small amount of unbound C1q, most of the C1q molecules being found as larger complexes in fractions 1-4. Although the complexed form of C1q was recognized by a monoclonal antibody to the native protein, its ability to trigger complement activation remained to be established. For this purpose, a C4 cleavage assay was performed using C1q/PrP complexes purified by SEC after co-aggregation or oligomers II purified after aggregation of PrP alone, as a control. Complement activation was assessed by measuring the extent of C4 cleavage after incubation of the coated proteins with C1q-

depleted human serum. No significant activation was observed using oligomers II (Fig. 5). In contrast, C1q/PrP complexes triggered complement activation in a dose-dependent manner. In a comparative analysis, oligomers II also triggered a dose dependent activation when incubated in normal human serum. This demonstrated that C1q molecules within the C1q/PrP complexes retained structural and functional integrity after the co-aggregation and purification processes.

*C1q/PrP complexes inhibit PrP oligomer induced cell toxicity.* PrP oligomers have been recently described as neurotoxic (25). In order to test the cytotoxicity of our protein preparations, we used two neuronal cell lines, N2aD11 (PrP<sup>+/+</sup> neuroblastoma cells) and Npl1 (PrP<sup>0/0</sup> hippocampal cells). Cells were exposed to different concentrations of purified PrP isoforms, including monomeric PrP, SEC-purified oligomers II and I', aged PrP fibrils, and fraction 3 of purified C1q/PrP complexes (see Fig. 3B). Cell viability was measured twenty-four hours after exposure using the WST-1 assay (Fig. 6).

Exposure of N2aD11 cells to 2 µM oligomers II resulted in a loss of about 70% of the cells, compared to untreated or to vehicle-treated cells (Fig. 6A). This effect could not be observed at a concentration of 1 µM, but an intermediate effect was seen at 1.5 µM. Monomeric PrP, oligomers I' and aged PrP fibrils had no significant cell toxicity whatever the concentration used. Similar toxic effects were observed using Npl1 hippocampal cells from PrP<sup>0/0</sup> defective mice, indicating that the toxicity of oligomers II was independent of the expression of PrP (Fig. 6B). When C1q/PrP complexes were tested using the same assays, no significant toxicity was observed for these species whatever the concentration used, using either type of cells (Fig. 7A, B).

## DISCUSSION

*PrP oligomerization generates three distinct soluble oligomers.* The ability of monomeric PrP to adopt fibrillar conformations has been widely studied (26,27). Only recently, efforts have been made toward the identification of other amyloidogenic oligomeric structures (7,8,10,25,28). PrP oligomers described so far have been generated under different conditions and using various deleted constructions, thus they often display distinct biophysical and biochemical characteristics. We previously

showed that thermal destabilization of PrP in the presence of NaCl leads to the formation of two discrete oligomeric species named oligomers I (larger species, heterogeneous in size) and oligomers II (smaller species, 8-15 mers) (10,21). In the present study, we were able to separate a third oligomeric species, with an intermediate size. This newly-found oligomer was named oligomer I'.

Recently, recombinant ovine PrP has been shown to aggregate and generate three oligomeric forms O1, O2, O3 (8,28) which likely correspond to oligomers I, I' and II, respectively, obtained with our murine preparations. These authors showed that the best model for ovine PrP oligomerization would be a set of parallel pathways, where O1, O2, O3 originate from the same partially unfolded monomer, but form soluble aggregates independently and are not kinetically related. Interestingly, this work also pointed out that only the O1 oligomer was able to fibrillize. Further biophysical investigations will determine whether our murine oligomers can fit this model.

*C1q binds preferentially to small PrP oligomers.* The implication of C1q in prion pathogenesis has been pointed out by (11,12) showing that the onset of the disease is delayed in C1q- and C3-deficient mice. Further studies have described direct interaction between C1q and PrP (13,14,16,17). However, the nature of the PrP isoform (i.e. fibrils or  $\beta$ -oligomers) recognized by C1q remains unclear. In a previous attempt to assess the ability of PrP oligomers to activate the classical complement pathway, we could not use SEC-purified species, because the haemolytic assay used required high protein concentrations (17). In the present work, the use of a specific C1 activation assay requiring lower protein concentrations, allowed us to demonstrate that the smaller oligomers II, comprising 8-15 PrP molecules are the most efficient activators of complement, compared to larger oligomers (I and I'). Also, in our hands, aged PrP fibrils did not trigger C1 activation. This finding is in contradiction with previous studies, where fibrillar species from a C-terminal fragment of human PrP were found to activate the classical pathway (13). Since the procedure used for forming PrP fibrils dictates their final structure (29), these discrepancies may arise from the fact that the fibrils used in both studies display different structural features. In addition, the absence of the N-terminal part of PrP in the

study by Sjoberg et al. could also account for the observed variations.

*C1q in the aggregation process of PrP.* Investigation of the functional relevance of the C1q/PrP interaction has focused on the ability of PrP-derived ligands to interact with complement factors and trigger complement activation (13,14,17). In the present study, we characterized a novel role for C1q, namely its ability to interact with PrP during the process of oligomer formation and to enhance this process in a dose-dependent manner. ThT has a greater affinity for fibrillar structures than for oligomers (30). As no fibrillar structures were observed by electron microscopy, this phenomenon cannot account for the variations seen in the fluorescence. A plausible hypothesis would be that the hexameric C1q molecule starts interacting with PrP as soon as this reaches the critical oligomeric size, a step that could explain the observed lag phase (0-6 h). This critical size could be even smaller than the 8-15 molecules characteristic of oligomer II. After initial binding, C1q could then bring together PrP molecules more efficiently, thus enhancing the kinetics of oligomer formation (6-18 h). When the C1q globular domain was used instead of the whole C1q molecule, no obvious effect was seen on PrP aggregation. It may be concluded from this observation that the cooperative effect of C1q requires the latter to be under a native hexameric form. The effect of C1q on PrP aggregation was only investigated at 40°C and at C1q concentrations up to 0.4 mg/ml, because of the low solubility of C1q at concentrations >0.8 mg/ml and its instability at 70°C. Also, it would be of interest to test whether C1q can act as a co-factor enhancing PrP<sup>Sc</sup> formation in a Protein Cyclic Misfolding Amplification assay (31).

*C1q forms a stable complex with PrP oligomers II and remains functional.* The interaction between PrP and C1q during aggregation led to the formation of a stable complex. Several results indicate that oligomers II represent the PrP moiety of these complexes. First, the proportion of oligomers II was strongly decreased in the C1q/PrP aggregation mixture. Secondly, the electron micrographs of the SEC-purified C1q/PrP complexes indicate that most of the oligomers bound to the C1q globular domain resemble type II.

We also tried to determine the C1q/PrP complex molar mass by MALLS (supplemental data Fig. S3). PrP oligomers II have a mean molar mass of  $2.5 \times 10^5$  g/mol, which

corresponds to the mass previously calculated for 12-mer PrP, based on a mass of 23 kDa for recombinant PrP (10). Oligomers I' are heterogeneous in size, but their mean molar mass could be estimated to approximately  $8 \times 10^5$  g/mol (34-mer). The C1q/PrP molecular mass can be only roughly estimated, as its light scattering is superimposed on that of oligomers I'. Nevertheless, taking the apex of the peak as a reference, the mean molar mass could be evaluated to  $1.15 \times 10^6$  g/mol. C1q is a molecule of about 460 kDa, which leads to an estimate of 690 kDa for the average mass of the PrP moiety in the complex, corresponding to the size of either one oligomer I' (800 kDa), or 3 oligomers II (780 kDa). This is the minimal estimate for the C1q/PrP complexes since C1q is found mainly in fractions 1 to 3, well before the apex of the peak. In line with electron microscopy data, this strengthens our hypothesis that oligomers II are recognized by C1q. To be biologically relevant, such complexes must contain functional C1q molecules. Indeed, dot blot analyses indicated that C1q retained its structural integrity, as it was recognized by a monoclonal antibody raised against the native form of the collagenous moiety of C1q. In addition, C1q remained functional within the complex and could still bind its partner proteases to activate the classical complement pathway as shown by a C4 cleavage assay.

*A role for C1q/PrP complexes in the prevention of neuronal cell death?* Neurotoxicity of prion oligomers and fibrils for both cultured cells and primary neurons has been widely explored (25,32,33). Although recent results tend to demonstrate that  $\beta$ -oligomers are cytotoxic to cultured cells whereas mature fibrils are harmless, the nature of the most neurotoxic species is uncertain. In our hands, only oligomers II displayed a pronounced dose-dependent cytotoxic effect to cultured cell lines, while larger species showed no toxicity. Interestingly, this effect could be observed using both PrP<sup>+/+</sup> and PrP<sup>0/0</sup> cells. This indicates that expression of endogenous PrP is not required to observe a

toxic effect, as previously reported for  $\beta$ -oligomers (25). However these results must be confirmed using primary neurons from wild-type and PrP<sup>0/0</sup> mice. When cells were exposed to C1q/PrP complexes, in contrast, no toxicity was observed, indicating that the toxic effect induced by the oligomers II present within the complex was inhibited. There are three possible explanations to this phenomenon: (i) PrP oligomers are trapped by the C1q molecules, and cannot reach the cell membrane to exert their toxicity. (ii) C1q/PrP complexes bind to C1q receptors at the cell surface, triggering an anti-apoptotic signal. This latter scenario is feasible in our cell lines, as they express calreticulin (data not shown), a well-known C1q receptor. (iii) C1q itself has neuroprotective properties, as recently described for  $\beta$ -amyloid and serum amyloid P-induced toxicity to neurons (34), and this seems to be independent of caspase- and calpain-mediated mechanisms. In the brain, C1q is expressed by neurons, and thus could protect them against PrP oligomer toxicity.

*Conclusion.* Our findings support the notion that the C1q/PrP interaction could have a broader biological significance in addition to complement activation. Small cytotoxic oligomers such as oligomers II are transient, thermodynamically unstable species, and thus are unable to enter the fibrillization pathway (28). C1q could act as a stabilizer of these species, allowing them to interact with each other to form larger non cytotoxic aggregates. C1q has a broad range of ligands, including non-self pathogenic motifs and altered self structures. It is mostly found in serum, and is largely expressed by neurons where its role is not fully established. The cooperative interaction between C1q and PrP could represent an early step in the disease, where it prevents elimination of the prion seed, leading to further aggregation. It would also be of interest to verify whether our findings on the prion protein could be extended to other oligomers formed by amyloidogenic proteins (35-37).

## REFERENCES

1. Prusiner, S. B. (1982) *Science* **216**, 136-144
2. Bailly, Y., Haerberle, A. M., Blanquet-Grossard, F., Chasserot-Golaz, S., Grant, N., Schulze, T., Bombarde, G., Grassi, J., Cesbron, J. Y., and Lemaire-Vieille, C. (2004) *J Comp Neurol* **473**, 244-269
3. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) *Cell* **73**, 1339-1347

4. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-10966
5. Caughey, B., Baron, G. S., Chesebro, B., and Jeffrey, M. (2009) *Annu Rev Biochem* **78**, 177-204
6. Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. (2005) *Nature* **437**, 257-261
7. Jain, S., and Udgaonkar, J. B. (2008) *J Mol Biol* **382**, 1228-1241
8. Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertle, T., and Grosclaude, J. (2005) *J Mol Biol* **347**, 665-679
9. Rezaei, H. (2008) *Curr Alzheimer Res* **5**, 572-578
10. Vendrely, C., Valadie, H., Bednarova, L., Cardin, L., Padeloup, M., Cappadoro, J., Bednar, J., Rinaudo, M., and Jamin, M. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1724**, 355-366
11. Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H., and Aguzzi, A. (2001) *Nat Med* **7**, 488-492
12. Mabbott, N. A., Bruce, M. E., Botto, M., Walport, M. J., and Pepys, M. B. (2001) *Nat Med* **7**, 485-487
13. Sjoberg, A. P., Nystrom, S., Hammarstrom, P., and Blom, A. M. (2008) *Mol Immunol* **45**, 3213-3221
14. Sim, R. B., Kishore, U., Villiers, C. L., Marche, P. N., and Mitchell, D. A. (2007) *Immunobiology* **212**, 355-362
15. Flores-Langarica, A., Sebti, Y., Mitchell, D. A., Sim, R. B., and MacPherson, G. G. (2009) *J Immunol* **182**, 1305-1313
16. Blanquet-Grossard, F., Thielens, N. M., Vendrely, C., Jamin, M., and Arlaud, G. J. (2005) *Biochemistry* **44**, 4349-4356
17. Dumestre-Perard, C., Osmundson, J., Lemaire-Vieille, C., Thielens, N., Grives, A., Favier, B., Csopaki, F., Jamin, M., Gagnon, J., and Cesbron, J. Y. (2007) *Cell Microbiol* **9**, 2870-2879
18. Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S., and Arlaud, G. J. (2001) *J Immunol* **167**, 6374-6381
19. Arlaud, G. J., Sim, R. B., Duplaa, A. M., and Colomb, M. G. (1979) *Mol Immunol* **16**, 445-450
20. Biro, A., Thielens, N. M., Cervenak, L., Prohaszka, Z., Fust, G., and Arlaud, G. J. (2007) *Mol Immunol* **44**, 1169-1177
21. Erlich, P., Cesbron, J. Y., Lemaire-Vieille, C., Curt, A., Andrieu, J. P., Schoehn, G., Jamin, M., and Gagnon, J. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 478-483
22. Reid, K. B., and Porter, R. R. (1976) *Biochem J* **155**, 19-23
23. Gaboriaud, C., Thielens, N. M., Gregory, L. A., Rossi, V., Fontecilla-Camps, J. C., and Arlaud, G. J. (2004) *Trends Immunol* **25**, 368-373
24. Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J. C., and Arlaud, G. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 46974-46982
25. Simoneau, S., Rezaei, H., Sales, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J. G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., Schatzl, H., and Lasmez, C. I. (2007) *PLoS Pathog* **3**, e125
26. Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 21140-21148
27. Baskakov, I. V. (2009) *FEBS Lett* **583**, 2618-2622
28. Eghiaian, F., Daubenfeld, T., Quenet, Y., van Audenhaege, M., Bouin, A. P., van der Rest, G., Grosclaude, J., and Rezaei, H. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7414-7419
29. Baskakov, I. V., and Bocharova, O. V. (2005) *Biochemistry* **44**, 2339-2348
30. Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., and Singh, S. (2005) *J Struct Biol* **151**, 229-238
31. Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001) *Nature* **411**, 810-813
32. Novitskaya, V., Bocharova, O. V., Bronstein, I., and Baskakov, I. V. (2006) *J Biol Chem* **281**, 13828-13836
33. Kazlauskaitė, J., Young, A., Gardner, C. E., Macpherson, J. V., Venien-Bryan, C., and Pinheiro, T. J. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 292-305

34. Pisalyaput, K., and Tenner, A. J. (2008) *J Neurochem* **104**, 696-707
35. Sorgjerd, K., Klingstedt, T., Lindgren, M., Kagedal, K., and Hammarstrom, P. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 1072-1078
36. Shin, T., Isas, J. M., Hsieh, C. L., Kaye, R., Glabe, C. G., Langen, R., and Chen, J. (2008) *Mol Neurodegener* **3**, 16
37. Carrell, R. W., Mushunje, A., and Zhou, A. (2008) *FEBS Lett* **582**, 2537-2541

## FOOTNOTES

We are indebted to Adrienn Biro (Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) for providing us with the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer. We thank Marc Jamin (Unit of Virus and Host Cell Interaction, Grenoble, France) for help with MALLS experiments, and Camille Rak for technical assistance.

The abbreviations used are: PrP<sup>c</sup>, cellular prion protein; PrP<sup>Sc</sup>, Scrapie prion protein; TSE, transmissible spongiform encephalopathy; SEC, size exclusion chromatography; ThT, Thioflavin T; GH, globular heads of C1q.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Small oligomers efficiently trigger C1 activation (A) Size exclusion chromatography elution profile of mouse recombinant PrP after incubation for 18 h at 40°C (dashed line) or 70°C (plain line) in the presence of 100 mM NaCl. Three types of oligomers can be purified (oligomers I, I' and II). (B) C1 activation assay under different conditions. The C1s-C1r-C1r-C1s tetramer was incubated for 90 min at 37°C in the presence of C1q alone (lane 1), C1q + C1 inhibitor (lane 2), C1q + C1 inhibitor + PrP monomer (lane 3), C1q + C1 inhibitor + oligomer I (lane 4), C1q + C1 inhibitor + oligomer I' (lane 5), C1q + C1 inhibitor + oligomer II (lane 6), or C1q + C1 inhibitor + PrP fibrils (lane 7). Each sample was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and C1s was revealed by Western blot. The presence of the C1s A chain indicates complement activation. The gel shown is representative of three independent measurements.

**Fig. 2.** Aggregation kinetics of recombinant mouse PrP monitored by Thioflavin T fluorescence. Fluorescence was measured for 18 h as detailed in the Materials and methods section. The PrP concentration was 5 mg/ml in 10 μM ThT, in the presence of 100 mM NaCl. Aggregation kinetics of PrP alone (empty circles) (A, B), or in the presence of C1q (A) or C1q globular domain (B), at varying concentrations: 0.2 mg/ml (open triangles), 0.3 mg/ml (inverted open triangles) and 0.4 mg/ml (open diamonds). C1q and its globular domain alone do not bind to ThT (open squares) (A, B). All experiments were performed triplicate using a microplate reader.

**Fig. 3.** Analysis by size-exclusion chromatography of PrP aggregation in the presence of C1q. End-point products from kinetic analyses shown in Figure 2 were analyzed by SEC. (A) PrP alone (dashed line) aggregated into two types of oligomers, I' and II. C1q alone eluted as a single peak around 32 min (plain line and filled area). C1q/PrP co-aggregation (plain line) led to the formation of two types of oligomers: oligomers II that were superimposed on their PrP counterpart, and a larger heterogeneous peak starting to elute in the void volume of the column. (C) The same analysis was performed using C1q globular domain/PrP co-aggregation mixtures (plain line). There is no major differences in the elution profile. (B) Fourteen 500-μl fractions encompassing the C1q/PrP complexes peak were collected from 25 to 39 min. Fractions were assayed for C1q by dot blot analysis using an anti-C1q antibody (histogram bars).

**Fig. 4.** Electron microscopy analysis of SEC-purified C1q/PrP complexes. Samples were negatively stained using 2% uranyl acetate or 1% ammonium molybdate. (A-B) PrP oligomers, (C-E) C1q alone, (F-K) C1q/PrP complexes. The scale bar represents 20 nm.

**Fig. 5.** PrP-bound C1q retains the ability to trigger C4 cleavage. Fractions 1-4 containing PrP-bound C1q (Figure 3B) were subjected to a C4 cleavage assay to assess the functionality of C1q in the

complexes (open squares). As a control, oligomer II did not activate complement in C1q-depleted serum (inverted open triangles), but was an efficient activator when incubated in the presence of normal human serum (NHS) (crosses). C1q- Serum: C1q-depleted human serum.

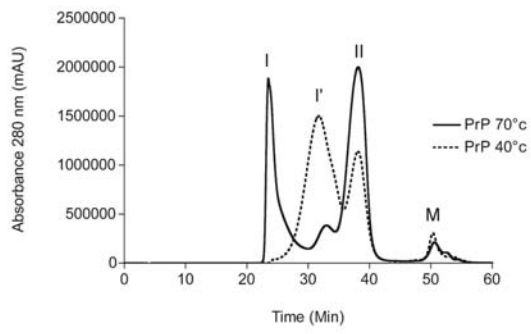
Fig. 6. Oligomer II is toxic to cultured cells. Neuronal cells from PrP<sup>+/+</sup> or PrP<sup>0/0</sup> mice were exposed for 24 h to purified PrP isoforms ranging at 1  $\mu$ M (white histograms), 1.5  $\mu$ M (grey histograms) and 2  $\mu$ M (black histograms). Cell viability was then measured using the WST-1 assay. (A) PrP<sup>+/+</sup> N2aD11 cells, (B) PrP<sup>0/0</sup> NpII hippocampal cells. Untreated cells (hatched histograms) and cells treated with equivalent volumes of vehicle buffer were used as controls. Statistical analysis was performed using student T test with Welsh correction.

Fig. 7. C1q-PrP complexes inhibit oligomer II-induced cell toxicity. Cells were treated with SEC-purified C1q-PrP complexes at 1  $\mu$ M (white histograms), 1.5  $\mu$ M (grey histograms) and 2  $\mu$ M (black histograms) and cell viability was measured using the WST-1 assay. Data from cells incubated with PrP oligomers II are shown for comparison. (A) PrP<sup>+/+</sup> N2aD11 cells, (B) PrP<sup>0/0</sup> NpII hippocampal cells.



Figure 1

**A**



**B**

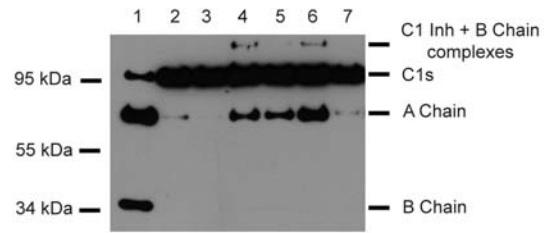


Figure 2

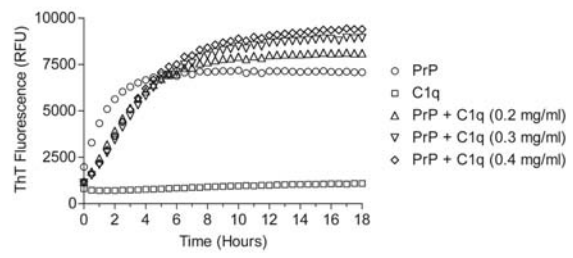
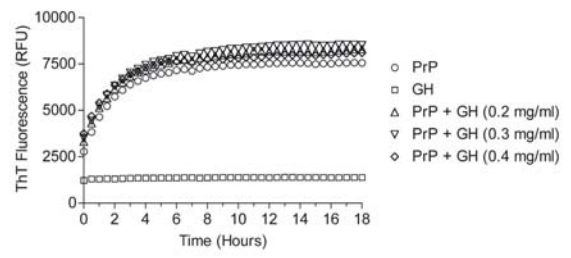
**A****B**

Figure 3

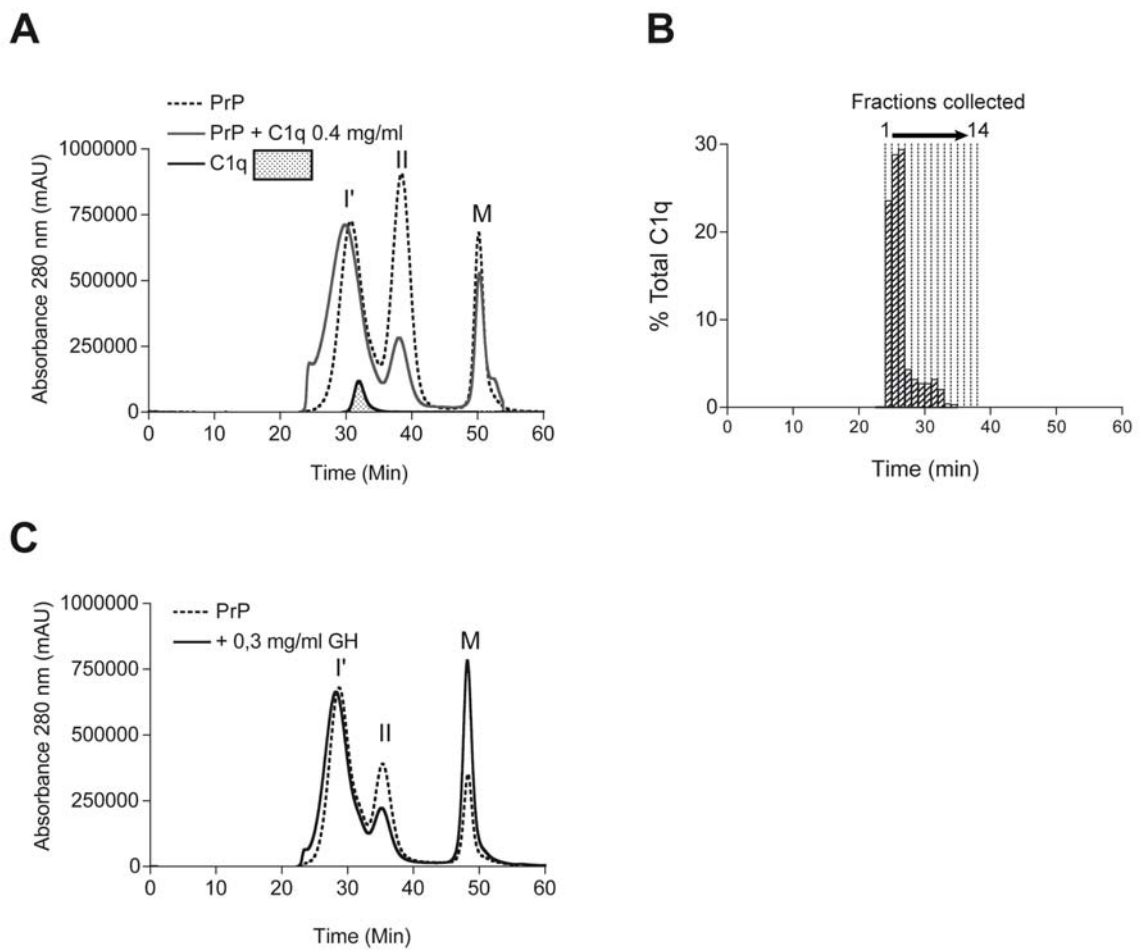


Figure 4

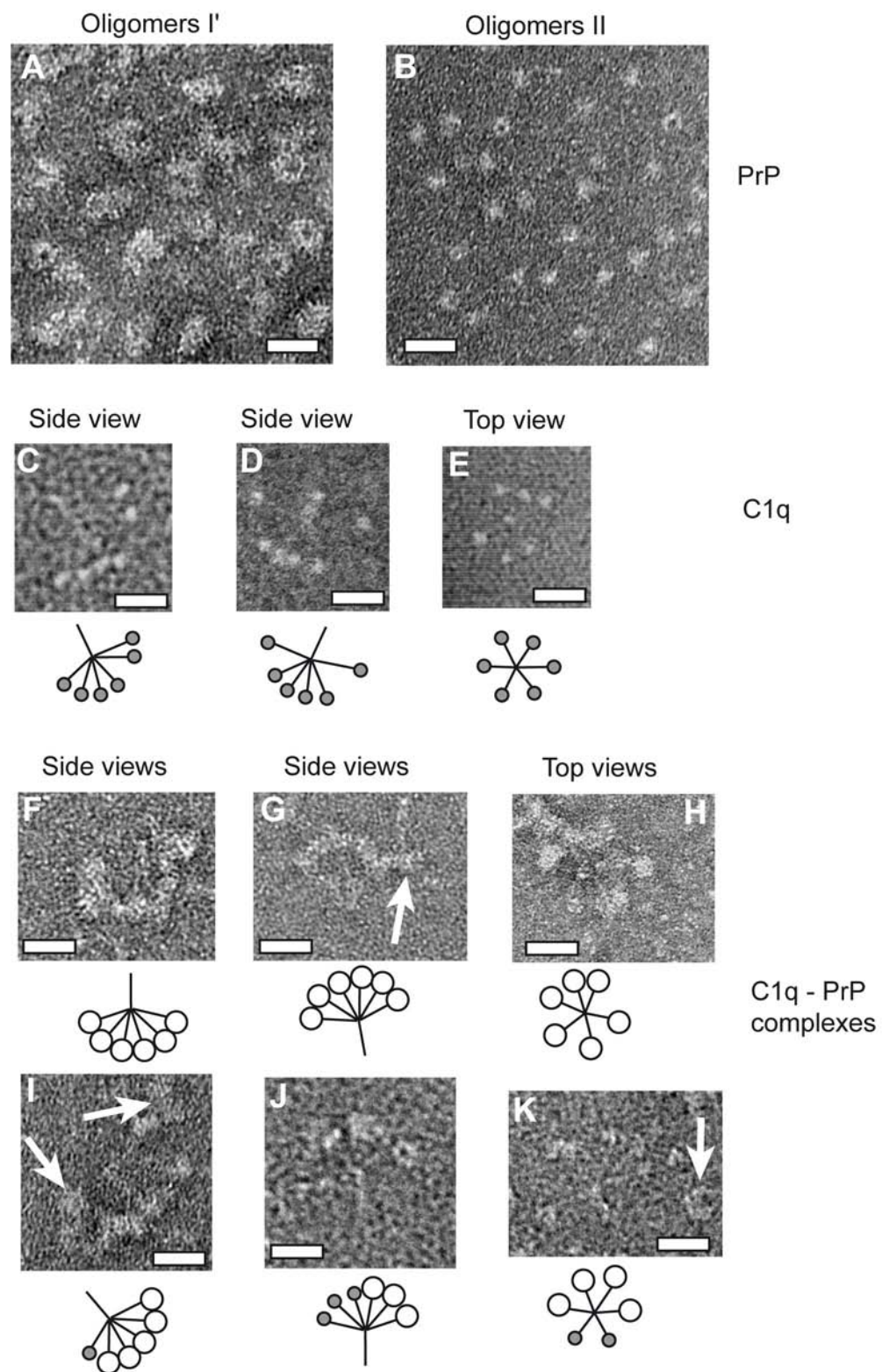


Figure 5

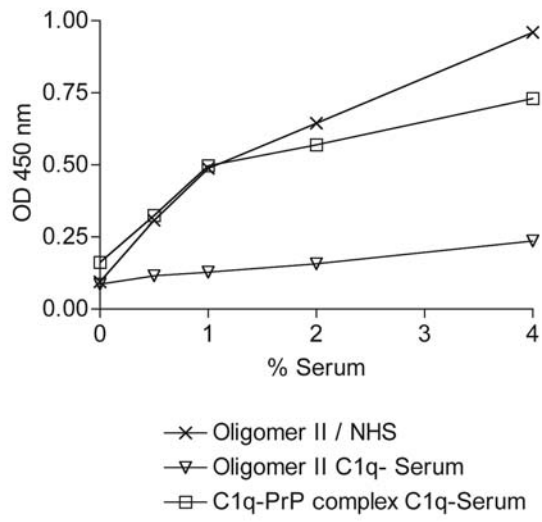


Figure 6

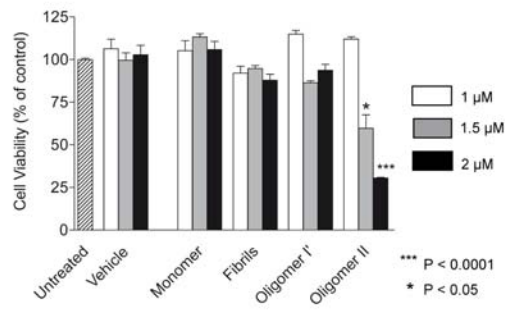
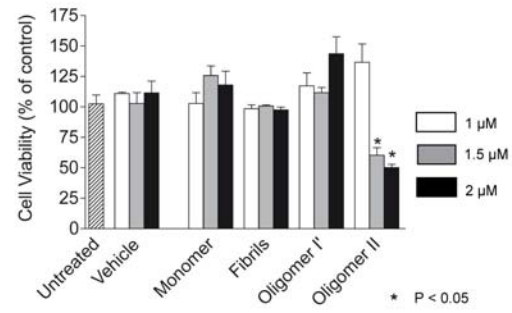
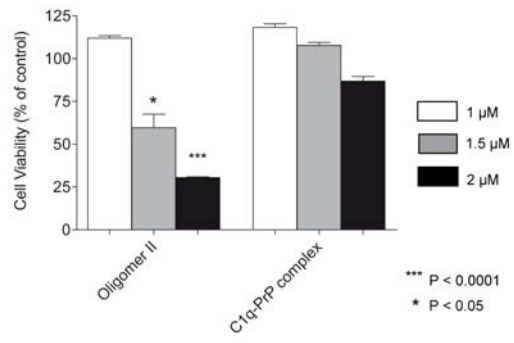
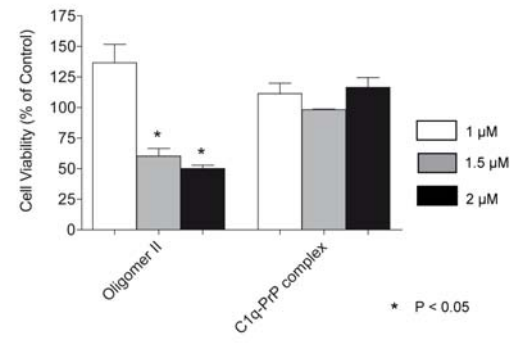
**A****B**

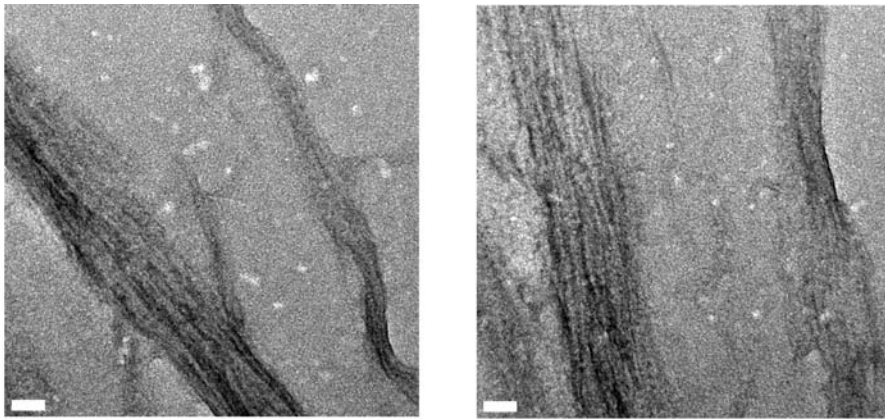
Figure 7

**A****B**

## SUPPLEMENTAL DATA

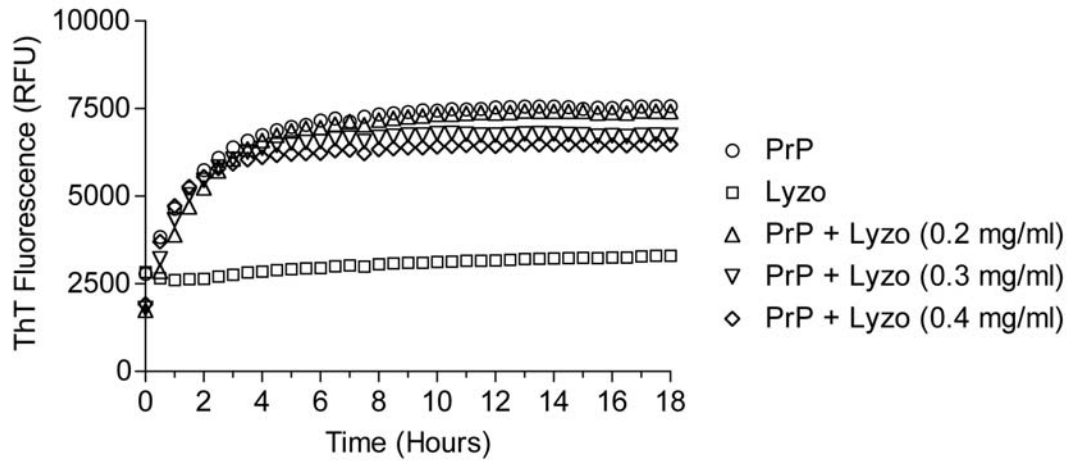
### COMPLEMENT PROTEIN C1q FORMS A STABLE COMPLEX WITH CYTOTOXIC PRION PROTEIN OLIGOMERS

Paul Erlich, Chantal Dumestre-Pérard, Wai Li Ling, Catherine Lemaire-Vieille,  
Gérard J. Arlaud, Nicole M. Thielens, Jean Gagnon and Jean-Yves Cesbron

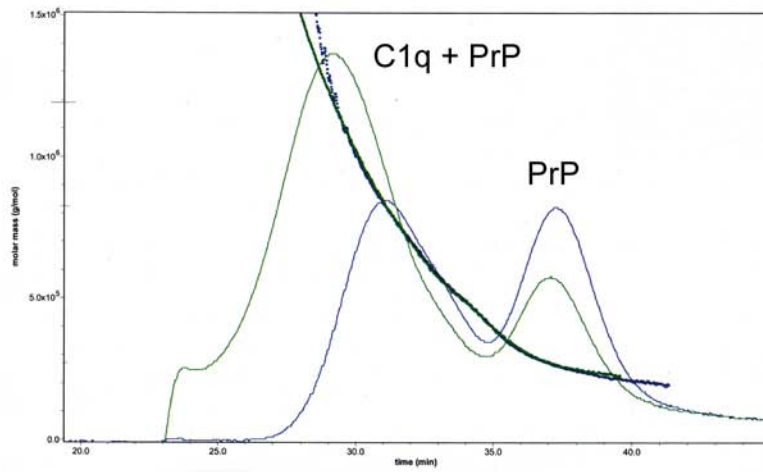


**Figure S1.** Electron microscopy analysis of aged PrP fibrils. Fibrils were obtained by leaving monomeric PrP at 4°C in its storage buffer (20 mM sodium acetate, pH 3.5) for at least 10 weeks. Samples were negatively stained using 2% uranyl acetate. Scale bar represents 50 nm.





**Figure S2.** Aggregation kinetics of recombinant mouse PrP in presence of lysozyme, as monitored by Thioflavin T fluorescence. Fluorescence was measured for 18 hours as detailed in the material and method section. PrP concentration was 5 mg/ml in 10  $\mu$ M ThT, in presence of 100 mM NaCl. Aggregation kinetics of PrP alone (empty circles), or in presence of increasing concentrations of lysozyme: 0.2 mg/ml (open triangles), 0.3 mg/ml (inverted open triangles) or 0.4 mg/ml (open diamond-shapes). Lysozyme alone do not bind to ThT over time (open squares).



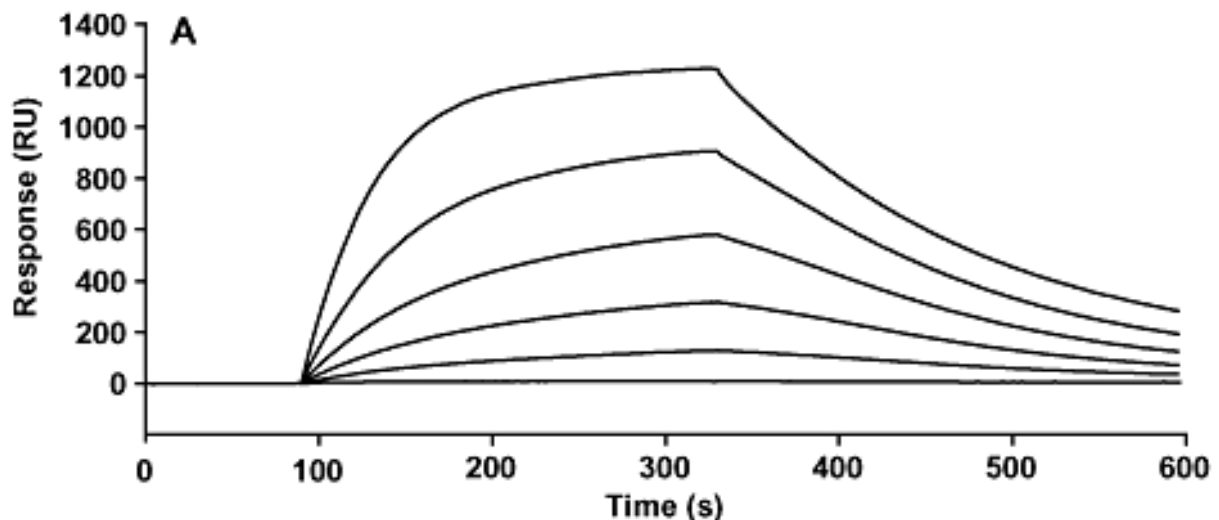
**Figure S3.** Size exclusion chromatography. Elution profiles of PrP or C1q + PrP aggregated at 40°C for 18h. Molecular masses were determined by MALLS, using detectors at 60°, 69°, 80°, 90°, 100°, 111° and 121°. PrP (plain line); C1q + PrP (dashed line).

### 3.4.2) Résultats complémentaires et conclusion

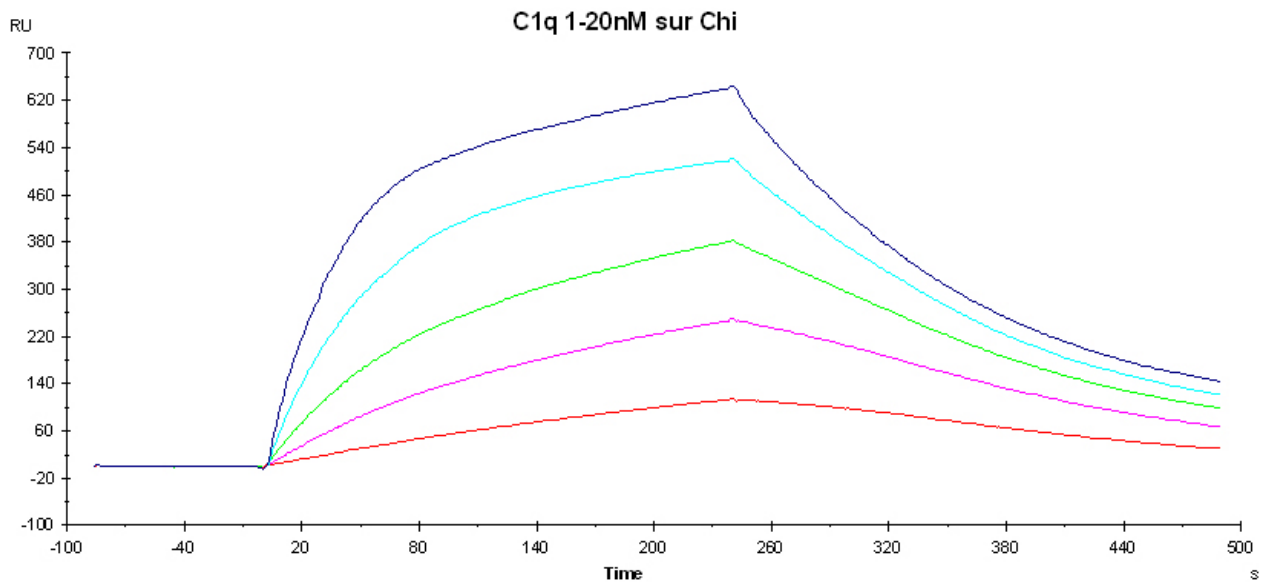
L'ensemble des données obtenues sur la relation entre la PrP et C1q nous a amenés à vérifier si les protéines chimériques pouvaient se comporter comme PrP vis-à-vis du complément. Les résultats complémentaires ci-dessous ne concernent que la chimère 1 PrP<sup>23-125</sup> / Dpl<sup>54-154</sup>. Le matériel et méthode utilisé pour cette partie fait référence à la publication (Dumestre-Perard et al, 2007) ainsi qu'à l'**article 2**.

#### 3.4.2.1) C1q se lie à la chimère 1 immobilisée...

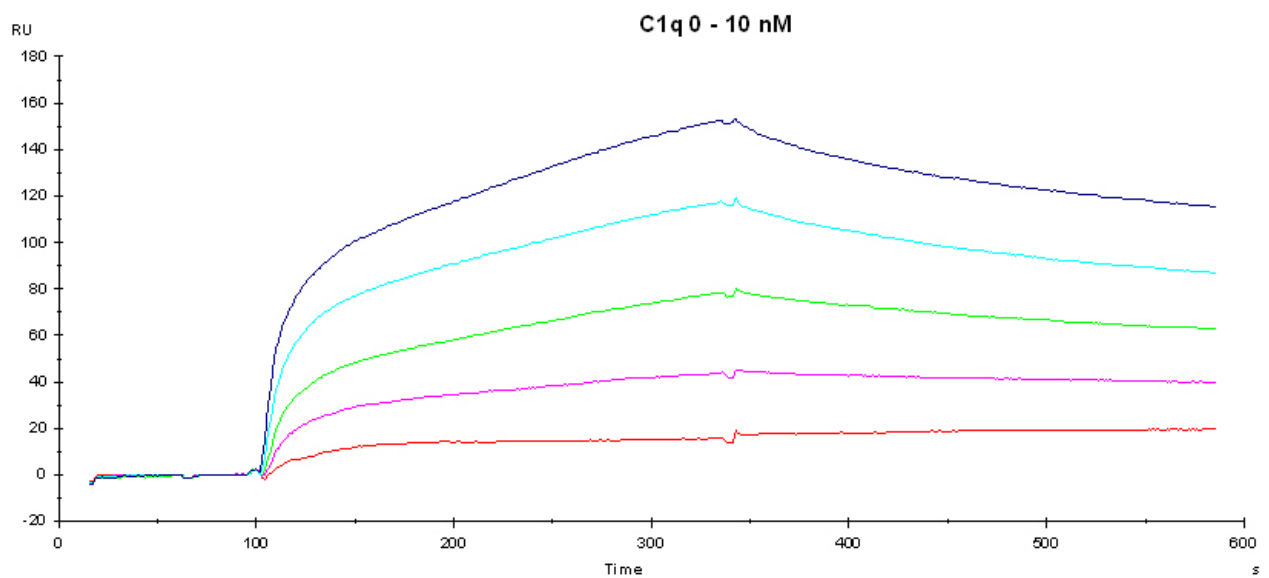
Dans nos précédents travaux, nous avons montré que la PrP immobilisée à la surface d'une sensor chip de SPR interagissait avec le C1q humain soluble avec une affinité d'environ 5.5 nM (Dumestre-Perard et al, 2007) (**Figure 26**). Deux protéines, Chimère (**Figure 27**) et Dpl (**Figure 28**) ont été traitées de façon similaire pour tester leur capacité à se fixer à C1q.



**Figure 26 : Analyse de la fixation de C1q sur PrP immobilisée par SPR.** La PrP a été immobilisée sur une chip de SPR et C1q est injecté à des concentrations croissantes (0, 1, 2.5, 5, 10, 20 nM). La fixation non spécifique de C1q sur la BSA comme contrôle négatif est soustraite. Figure extraite de (Dumestre-Perard et al, 2007).

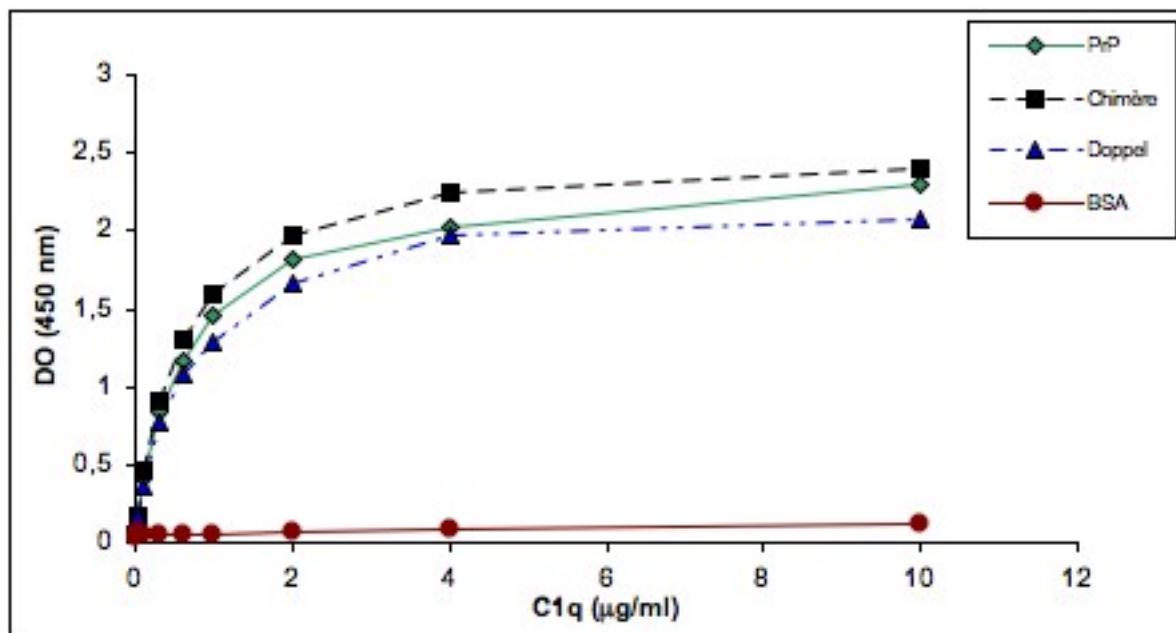


**Figure 27 : Analyse de la fixation de C1q sur la chimère 1 immobilisée par SPR.** La chimère 1 a été immobilisée sur une chip de SPR et C1q est injecté à des concentrations croissantes (0, 1, 2.5, 5, 10, 20 nM). La fixation non spécifique de C1q sur la BSA comme contrôle négatif est soustraite.



**Figure 28 : Analyse de la fixation de C1q sur Dpl immobilisée par SPR.** Dpl a été immobilisée sur une chip de SPR et C1q est injecté à des concentrations croissantes (0, 1, 2.5, 5, 10 nM). La fixation non spécifique de C1q sur la BSA comme contrôle négatif est soustraite.

Les courbes de fixation de C1q sur Chimère 1 sont très ressemblantes à celles de la PrP, et le  $K_D$  calculé est d'environ 5.7 nM. Pour Dpl, la fixation est beaucoup plus faible, indiquant qu'un nombre moins élevé de molécules de C1q se sont fixées sur Dpl. Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences ELISA où PrP, Chimère et Dpl ont été déposées sur une plaque. Des doses croissantes de C1q humain ont été ajoutées (0 à 10  $\mu\text{g/ml}$ ) et sa fixation révélée par un anticorps anti-C1q et un conjugué peroxydase (**Figure 29**).



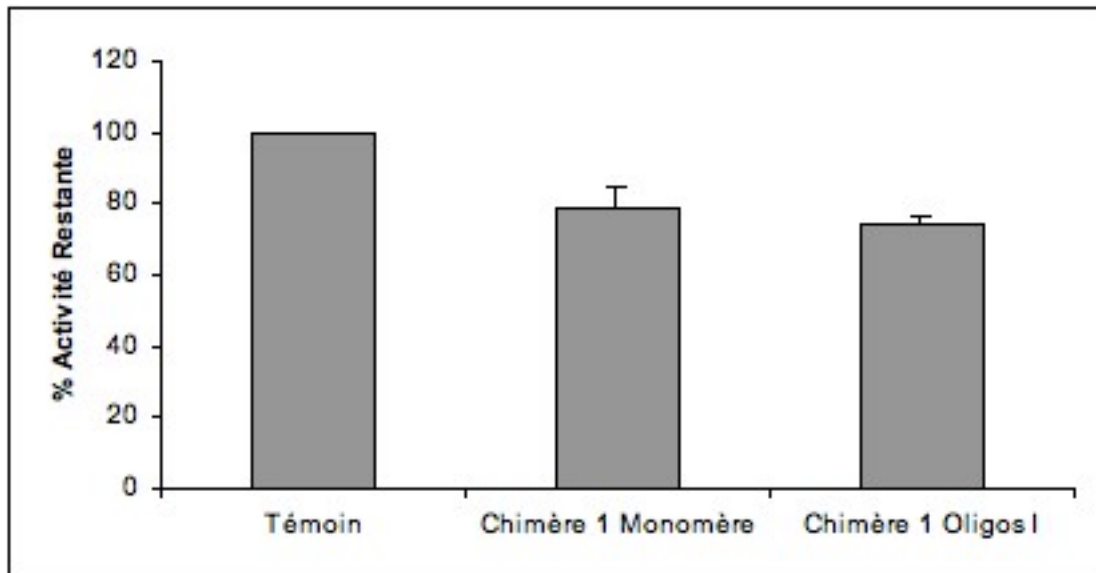
**Figure 29 : Analyse de la fixation de C1q sur les différentes constructions par ELISA.** La PrP, Chi1, Dpl et le N-terminal de PrP ont été déposés à 5  $\mu\text{g/ml}$  et C1q est ajouté à des concentrations croissantes (0-10  $\mu\text{g/ml}$ ). La BSA est utilisée comme contrôle négatif. C1q est révélé par un anticorps polyclonal de lapin anti-C1q humain et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La D.O est lue à 450 nm.

C1q interagit de façon similaire avec PrP, Dpl et Chimère 1. Le domaine N-terminal seul de la PrP présente un niveau de fixation plus faible (Dumestre-Perard et al, 2007). Ensemble, les données de SPR et ELISA confirment que la chimère N-ter PrP / C-ter Dpl présente des propriétés de fixation identiques à celles de la PrP vis-à-vis de C1q.

#### 3.4.2.2) ... Mais cette interaction n'active pas le complément

La fixation de C1q à ses ligands n'est pas forcément suffisante pour déclencher l'activation de la voie classique du complément (Groeneveld et al, 2005). Nous avons donc testé la protéine chimère 1, pour sa capacité à activer le complément, par deux tests :

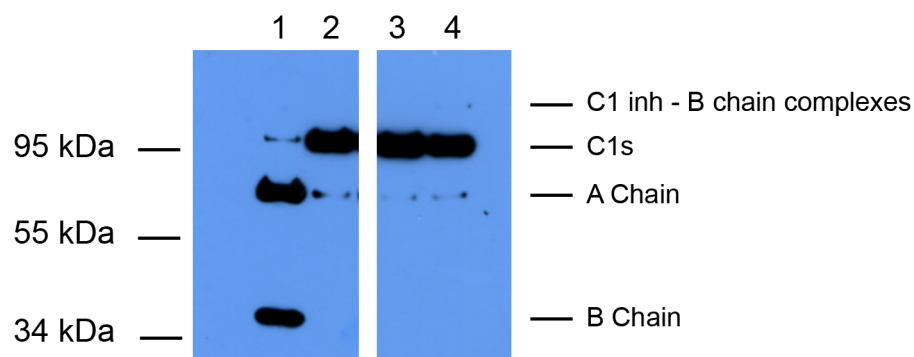
- Hémolytique (TH50), en utilisant la chimère 1 chauffée en présence de 100 mM NaCl, mais non purifiée par SEC (**Figure 30**).
- Coupure de C1, en purifiant les oligomères I de chimère 1 par SEC (**Figure 31**).



**Figure 30 : Analyse de l'activation de la voie classique du complément par la chimère 1 en TH50.** La chimère 1 sous forme de monomère ou chauffée à 70°C en présence de 100 mM NaCl est incubée avec du Sérum Humain Normal 1h à 37°C et l'activité résiduelle dans le sérum est ensuite mesurée par TH50. La Lyse des globules rouges de mouton (GRM) est mesurée par DO à 660 nm en fonction du temps. L'activité résiduelle du complément est exprimée par le ratio : (contrôle TH50 sans protéine)/(TH50 de la protéine testée) x 100. Les barres d'erreur représentent la moyenne +/- la déviation standard de trois expériences indépendantes.

Dans le premier test réalisé, l'incubation du sérum humain normal avec le monomère de chimère conduit à une lyse rapide des GRM, indiquant qu'il n'y a pas eu consommation des facteurs du complément pendant l'incubation initiale avec la protéine. La chimère sous forme monomérique n'active donc pas le complément, comme le monomère de PrP. La chimère chauffée à 70°C en présence de NaCl (production d'oligomères de type I) présente un niveau d'activation très faible, similaire à celui de la PrP.

Pour confirmer ce résultat en utilisant les oligomères purifiés de chimères, nous avons réalisé un test de coupure de C1 (voir **article 2** pour le matériel et méthode).



**Figure 31 : Test de coupure de C1 par la chimère 1.** Le tétramère  $(C1s)_2-(C1r)_2$  a été incubé pendant 90 min à 37°C en présence de C1q seul (piste 1), ou C1q + C1 inhibiteur (piste 2), ou C1q + C1 inhibiteur + Monomère de Chimère 1 (piste 3), ou oligomère I de Chimère 1 (piste 4). Chaque espèce a été séparée par SDS-PAGE en conditions dénaturantes et C1s a été révélé par Western Blot. La présence de la chaîne A de C1s indique qu'il y a eu activation du complément. La figure est représentative de deux essais indépendants.

Le monomère et les oligomères I de chimère 1 ne semblent pas activer la voie classique du complément comme l'indique l'intensité de la bande représentant la chaîne A de C1s (pistes 3 et 4 respectivement), identique à celle du contrôle négatif (piste 2). Les deux tests d'activations convergent vers le même résultat, c'est-à-dire que les oligomères de chimère 1, à l'inverse de ceux de la PrP, ne déclenchent pas une activation du complément.

#### 3.4.2.3) En guise de conclusion

L'étude des relations entre les isoformes oligomériques de PrP et la protéine C1q nous permet de mieux cerner les propriétés biologiques des protéines chimériques. Ainsi, s'il est possible d'obtenir une activation très importante de la voie classique avec de petits oligomères de PrP, les oligomères de chimères ne sont pas de bons activateurs. Au vu des données de l'article 2 ce phénomène pourrait s'expliquer par la différence de structure entre les oligomères de PrP et de Chimère 1. En effet, nous avons montré que les formes fibrillaires de PrP interagissaient mal avec C1q. Les oligomères de chimères ayant une structure protofibrillaire, on peut s'attendre à ce qu'ils se comportent comme des fibrilles de la PrP. Ce résultat confirme l'idée que, pour obtenir un prion synthétique ressemblant à la PrP, cette

protéine chimérique doit pouvoir former des intermédiaires oligomériques au cours de son assemblage. Ces oligomères possèdent des propriétés bien particulières, notamment vis-à-vis du complément. Si ces particules « les plus toxiques » sont transmises par voie de leur interaction avec le complément, un prion synthétique doit pouvoir mimer cette propriété pour exercer sa neurotoxicité, et peut-être même son infectiosité.



# CHAPITRE 4

-

## DOMAINES FONCTIONNELS DE LA PRP ET AGREGATION IN VIVO

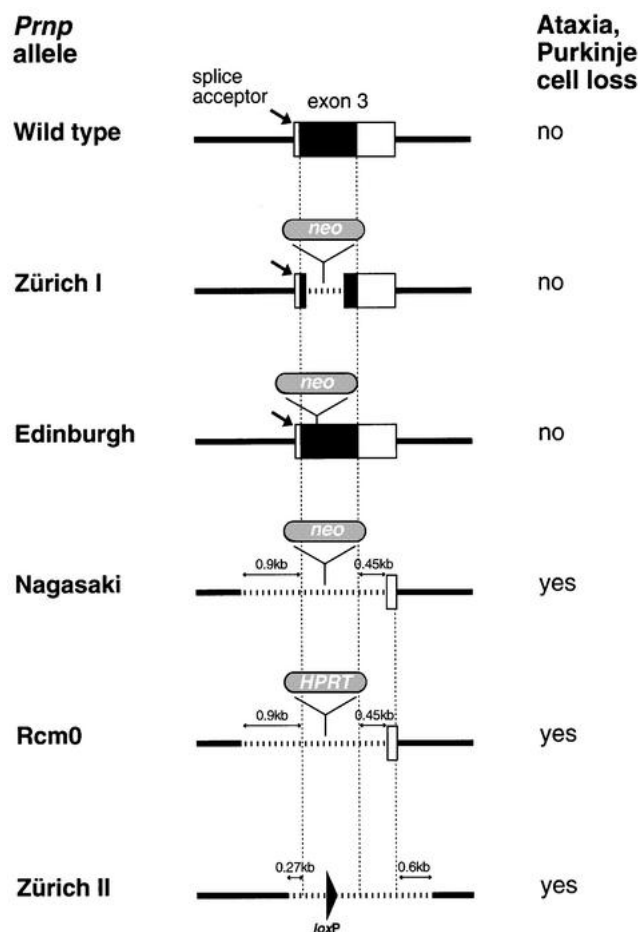
## 4) DOMAINES FONCTIONNELS DE LA PRP ET AGREGATION IN VIVO

### 4.1) Modèles d'animaux transgéniques pour l'étude de la fonction de la PrP<sup>c</sup>

#### 4.1.1) Souris déficientes pour la PrP

Six lignées de souris transgéniques invalidées pour le gène *prnp* ont été générées par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires, par des stratégies différentes selon les équipes. La stratégie conservatrice implique l'altération de la phase ouverte de lecture, soit par délétion, soit par insertion d'une cassette de sélection. Cette stratégie a permis d'obtenir les lignées baptisées Zürich I et Edinburgh (Bueler et al, 1992; Manson et al, 1994). Une autre stratégie plus radicale consiste en la délétion de la phase ouverte de lecture mais aussi des régions flanquantes et en particulier du site accepteur d'épissage du troisième exon. Les souris ainsi générées sont les lignées Nagasaki, Rcm0 et Zürich II (Rossi et al, 2001; Sakaguchi et al, 1996).

Selon la stratégie employée pour l'obtention des souris PrP<sup>0/0</sup>, les phénotypes observés sont différents. Tandis que les souris Zürich I ou Edinburgh se développent et se reproduisent normalement (Bueler et al, 1992; Manson et al, 1994), les autres lignées présentent une ataxie sévère et tardive accompagnée d'une dégénérescence des cellules de Purkinje (Moore et al, 1999; Sakaguchi et al, 1996; Silverman et al, 2000). Ce phénotype est aboli par la réintroduction d'une seule copie du gène *prnp* (Nishida et al, 1999) (**Figure 32**).



**Figure 32 : Les différentes souris  $PrP^{0/0}$  et les stratégies de construction.** Noir: phase ouverte de lecture ; Blanc: régions non codantes de *prnp* ; Pointillé: séquences délétées. Neo: néomycine phosphotransférase ; HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase. D'après (Rossi et al, 2001).

Dans un premier temps, le phénotype observé a été expliqué par l'absence de la  $PrP^c$ . Cependant, l'absence de syndromes cérébelleux chez les animaux Zürich I et Edinburgh indiquait que ce phénotype était vraisemblablement la conséquence de la délétion des séquences flanquantes de la phase ouverte de lecture de la *PrP* (Weissmann, 1996). La découverte du gène *prnd*, situé en aval de *prnp*, a permis d'expliquer ce phénomène. Chez les souris Nagasaki, Rcm0 et Zürich II, le gène *prnd* se retrouve artéfactuellement sous le contrôle du promoteur du gène *prnp*, ayant pour conséquence une expression ectopique de Dpl dans le SNC (Moore et al, 1999) et causant ainsi le phénotype ataxique observé.

L'absence de défauts phénotypiques majeurs dans les souris  $PrP^{0/0}$  de type Zürich I et Edinburgh est surprenante étant donné l'expression massive de la  $PrP^c$  dans les structures cérébrales. Toutefois, certains dysfonctionnements mineurs ont été constatés chez ces souris. Les études comportementales et électrophysiologiques ont révélé une altération du rythme circadien et des troubles du sommeil (Tobler et al, 1997; Tobler et al, 1996), certaines

anomalies de la fonction synaptique (Collinge et al, 1994), une altération de la potentialisation à long terme (Manson et al, 1995), ainsi qu'un dysfonctionnement des courants potassiques calcium-dépendants dans certains types cellulaires (Colling et al, 1996; Herms et al, 2001).

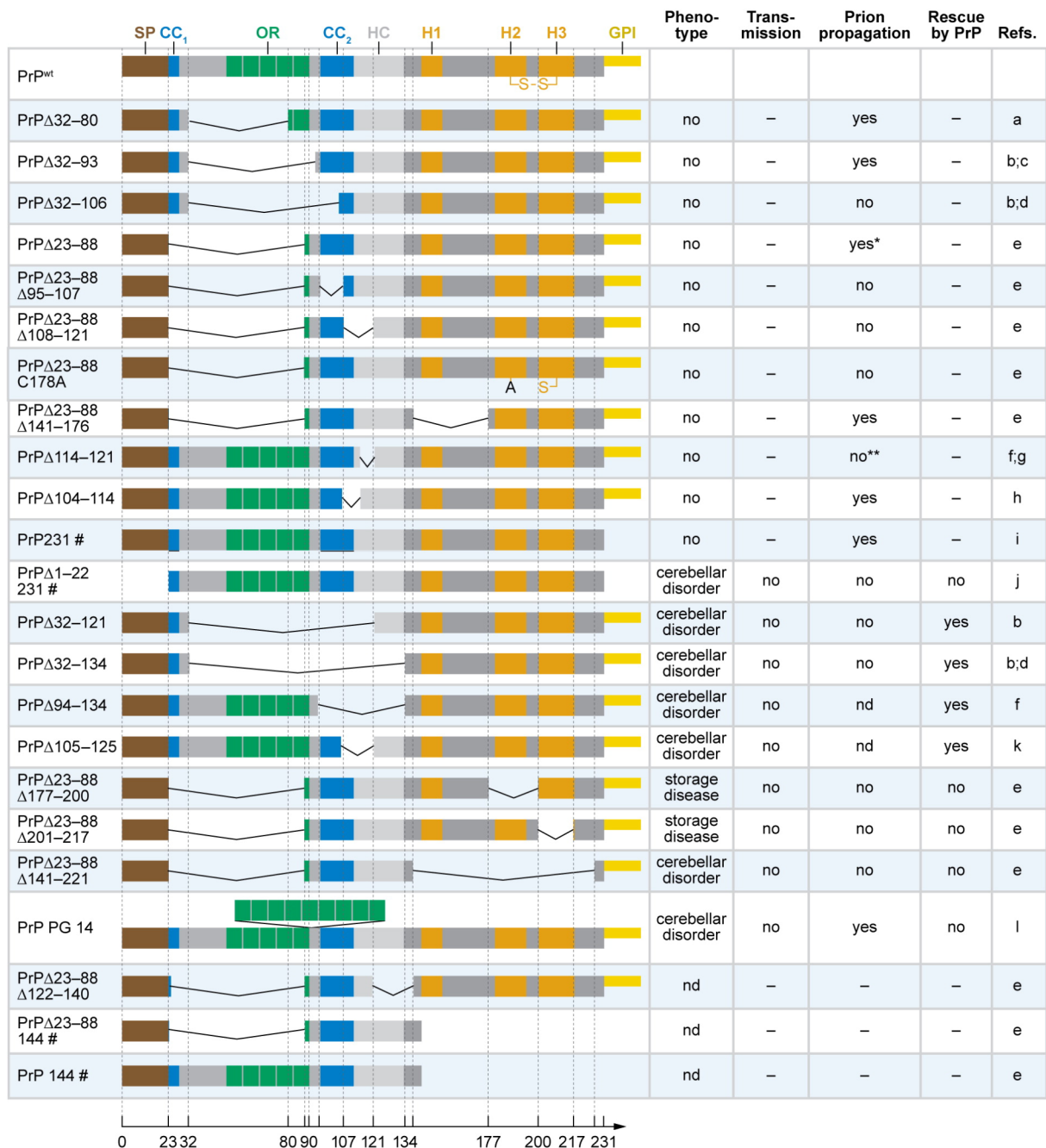
Les souris PrP<sup>0/0</sup> sont totalement résistantes à une infection par la Scrapie (Bueller et al, 1993), démontrant la nécessité de l'expression de la PrP<sup>c</sup> pour le développement des EST.

#### 4.1.2) Mutants pour les délétions amino-terminales

Les expériences de troncature permettent de mettre en évidence les domaines essentiels aux fonctions physiologiques de la PrP<sup>c</sup>. Certains mutants partiellement délétés dans le gène *Prnp* ont été initialement créés pour identifier les domaines nécessaires à l'infectiosité. Plusieurs de ces mutants ont spontanément développé des maladies neurodégénératives (**Figure 33**). Ces syndromes sont pour la plupart partiellement ou complètement antagonisés par la co-expression de la PrP<sup>c</sup> sauvage.

La région répétée des octapeptides (OR) est capable d'influencer la conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Flechsig et al, 2000). Si les souris déficientes pour cette région ne développent pas de pathologie (Fischer et al, 1996; Muramoto et al, 1997; Shmerling et al, 1998), des mutants exprimant 9 copies surnuméraires de cette région développent une ataxie et une atrophie cérébelleuse accompagnée d'astroglie (Chiesa et al, 2000; Chiesa et al, 1998). Les données *in vivo* concernant le rôle de la région des octapeptides sont peu nombreuses. Aussi, la fonction de cette région dans la fixation du cuivre et la protection contre le stress oxydant a essentiellement été décrite *in vitro* (Brown et al, 2001; Klamt et al, 2001; Wong et al, 2001; Wong et al, 2000a; Wong et al, 2000b).

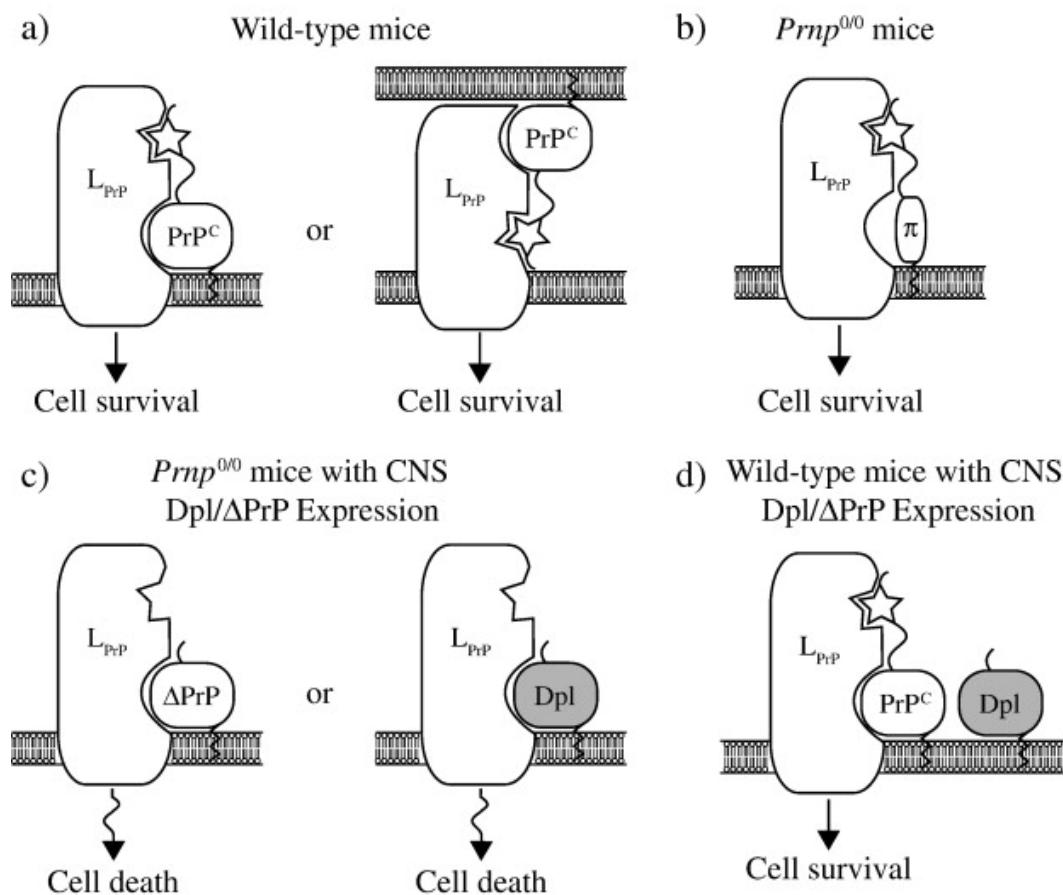
La fonction de la PrP<sup>c</sup> est probablement dépendante de la région hydrophobe (HC) en combinaison avec le cluster chargé 2 (CC2). Les souris  $\Delta 32-121$  et  $\Delta 32-134$  développent des syndromes ataxiques et présentent une perte neuronale apoptotique dans la couche granulaire du cervelet dès l'âge de 2 mois (Radovanovic et al, 2005; Shmerling et al, 1998). Ce phenotype est également observé dans des souris exprimant des délétions partielles ( $\Delta 105-125$ ) ou totales ( $\Delta 94-134$ ) du domaine central (Baumann et al, 2007; Li et al, 2007). Ces pathologies sont radicalement différentes de celles observées dans les infections à prions, et elles ne sont pas accompagnées de dépôt agrégé de PrP.



**Figure 33 : PrP<sup>c</sup> murine et les mutants transgéniques.** Représentation schématique de la PrP<sup>c</sup> murine, incluant le peptide signal (SP), les clusters chargés (CC1-CC2), la région répétée d'octapeptide (OR), les trois hélices  $\alpha$  (H1-H2-H3) et l'ancre GPI (GPI). La colonne de gauche représente les mutants individuels décrits dans le texte. Les colonnes de droite indiquent les anomalies phénotypiques dans les souris transgéniques, lorsqu'elles sont sur un fond PrP<sup>0/0</sup>, leur transmissibilité et enfin la susceptibilité aux prions après inoculation intracérébrale par des souches de scrapie adaptées à la souris. Références : a, (Fischer et al, 1996); b, (Shmerling et al, 1998); c, (Flechsigs et al, 2000); d, Flechsigs et al., résultats non publiés; e, (Muramoto et al, 1997); f, (Baumann et al, 2007); g, (Holscher et al, 1998); h, (Hegde et al, 1998); i, (Chesebro et al, 2005); j, (Ma & Lindquist, 2001); k, (Li et al, 2007); l, (Chiesa et al, 1998). D'après (Aguzzi et al, 2008a).

Les phénotypes pathologiques des souris tronquées sont complètement abolis par la réintroduction d'un seul allèle *prnp* sauvage, alors que les quantités de PrP tronquées exprimées restent inchangées (Nishida et al, 1999; Rossi et al, 2001). Globalement, ces phénotypes évoquent ceux observés dans les souris *prnp0/0* de type Nagasaki et Zurich II, chez lesquelles l'expression ectopique de Dpl dans le cerveau provoque une perte des cellules de Purkinje et une dégénérescence de la couche granulaire du cervelet. Au niveau structural, Dpl est très proche du domaine globulaire de la PrP et s'apparente à une PrP tronquée. Dans ce contexte, le mécanisme pathologique associé aux souris *prnp0/0* de type Nagasaki et aux souris exprimant les formes  $\Delta 32-121$  ou 134 pourrait être le même. Ces résultats ont permis d'imaginer un modèle théorique dans lequel la PrP<sup>c</sup> tronquée ( $\Delta$ PrP) ou Dpl se comporteraient en dominants négatifs et induiraient un signal de mort cellulaire (**Figure 34**).

Ce modèle présuppose l'existence d'un ligand commun de la PrP<sup>c</sup> et de Dpl (LPrP). La liaison de la PrP<sup>c</sup> à LPrP induirait une signalisation de survie cellulaire (Aguzzi & Polymeridou, 2004). En l'absence de PrP<sup>c</sup>, Doppel ou  $\Delta$ PrP se lieraient également à LPrP, mais ces deux dernières étant dépourvues du domaine effecteur situées dans la portion centrale de la PrP<sup>c</sup>, cette liaison aurait pour conséquence soit de bloquer la voie de signalisation soit d'induire une signalisation non appropriée. La PrP<sup>c</sup> aurait une affinité pour son ligand supérieure à celles de Dpl et  $\Delta$ PrP, ce qui permet d'expliquer que la présence de PrP<sup>c</sup> suffit à bloquer l'initiation du phénotype toxique. Une autre supposition de ce modèle est l'existence d'une protéine « PrP-like », nommée  $\pi$ , capable de se lier à LPrP et d'induire une signalisation positive, ce qui expliquerait l'absence de troubles chez les souris n'exprimant pas la PrP<sup>c</sup>. En terme d'affinité pour LPrP, l'ordre serait donc le suivant : PrP<sup>c</sup>  $\Delta$ PrP, Dpl et  $\pi$ . Si cette théorie semble satisfaisante, il faudrait pour la confirmer identifier les protéines LPrP et  $\pi$ . Un candidat intéressant pour la protéine  $\pi$  vient d'être mis à jour : il pourrait s'agir du troisième et dernier membre dans la famille des protéines prions, Shadoo. Dans des neurones granulaires du cervelet préparés à partir de souris *prnp0/0*, il a été montré que Shadoo, de la même façon que la PrP<sup>c</sup>, était capable de bloquer l'effet neurotoxique induit par l'expression de Dpl (Watts et al, 2007). De plus, après délétion de son domaine hydrophobe, Shadoo perd ses propriétés neuroprotectrices.



**Figure 34 : Modèle théorique de récepteur pour la PrP<sup>c</sup>** (a) Chez la souris sauvage (*prnp*<sup>+/+</sup>), la PrP<sup>c</sup> se lie à un ligand hypothétique (LPrP) et initie une signalisation de survie cellulaire. Cette liaison pourrait se présenter à la fois dans les configurations en *cis* et/ou en *trans*. Deux sites de liaison sont impliqués : un site d’ancrage C-terminal et un site effecteur de signalisation N-terminal. (b) Chez les souris *Prnp*<sup>0/0</sup>, c’est une protéine hypothétique «PrPc-like»,  $\pi$ , qui assure la liaison et la signalisation de survie.  $\pi$  et PrPc ont en commun le domaine effecteur en N-terminal et peuvent ainsi induire une signalisation à travers LPrP. (c) La liaison de Doppel ou de  $\Delta$ PrP à LPrP chez les souris *Prnp*<sup>0/0</sup> induit une signalisation anormale en raison de l’absence du domaine effecteur N-terminal nécessaire à la signalisation de survie. (d) Quand Doppel et  $\Delta$ PrP sont exprimées chez une souris sauvage, la PrPc prévient la toxicité provoquée par la liaison de Doppel/  $\Delta$ PrP à Lprp en raison de l’affinité supérieure de la PrP<sup>c</sup> pour Lprp. D’après (Watts & Westaway, 2007).

Comme nous venons de le voir, les expériences de mutations des domaines amino-terminal et central de la PrP<sup>c</sup> ont permis de mettre en exergue l’importance du domaine hydrophobe et central pour la fonctionnalité de la PrP<sup>c</sup>. Seules les mutations touchant à ces domaines sont porteuses d’effets délétères. Ces résultats permettent de confirmer que le domaine central de la PrP<sup>c</sup> est le déterminant principal des fonctions neuroprotectrices et/ou neurotoxiques de la PrP<sup>c</sup>.

## 4.2) Deux exemples de fonctions pour la PrP<sup>c</sup> : anti-apoptotique et anti-oxydante

### 4.2.1) Fonction anti-apoptotique

Les neurones dérivés des souris PrP<sup>0/0</sup> ont été originellement décrits comme plus susceptibles à une apoptose induite par la déprivation en sérum que des neurones issus de souris sauvages (Kuwahara et al, 1999). Plusieurs études indiquent que la PrP<sup>c</sup> a une fonction cytoprotective en diminuant le taux d'apoptose dans des cellules neuronales soumises à des stimuli apoptotiques tels que la surexpression de Bax ou du TNF- $\alpha$  (Bounhar et al, 2001). De plus, dans des cellules cancéreuses MCF-7 résistantes à une apoptose induite par le TNF- $\alpha$ , une équipe a montré que la PrP<sup>c</sup> était surexprimée 17 fois (Diarra-Mehrpour et al, 2004). Enfin, la fonction neuroprotectrice de la PrP<sup>c</sup> après des dommages postischémiques chez le rat a été largement étudiée, ou il a été montré que l'expression de la PrP<sup>c</sup> était fortement augmentée (Shyu et al, 2005; Weise et al, 2004). Ces résultats ont été confirmés chez la souris. Après ischémie, des souris déficientes pour la PrP<sup>c</sup> ont une activation de la voie des caspases plus importante que les souris sauvages (Spudich et al, 2005; Weise et al, 2006).

### 4.2.2) Rôle de la PrP<sup>c</sup> dans l'homéostasie oxydative

De nombreux investigateurs pensent que la fonction principale de la PrP<sup>c</sup> consiste en la protection contre le stress oxydant. De nombreuses observations *in vitro* ont montré que les cellules déficientes en PrP<sup>c</sup> étaient plus susceptibles à un traitement par des agents induisant un stress oxydatif par rapport à des cellules sauvages (Brown et al, 2002; Brown et al, 1997b; Brown et al, 1997c; White et al, 1999). Ces résultats indiquaient que la résistance au stress oxydant était reliée à l'expression de la PrP, à travers une augmentation de l'activité de certaines enzymes anti-oxydante, comme la superoxyde dismutase (SOD). *In vivo*, ces résultats ont été confirmés chez les souris PrP<sup>0/0</sup>. Les niveaux de dommages oxydatifs des protéines et des lipides dans le cerveau de ces animaux sont plus élevés en comparaison aux animaux sauvages (Klamt et al, 2001; Wong et al, 2001). Plus récemment, il a été démontré que la PrP<sup>c</sup> stabilise également l'homéostasie du cuivre dans des conditions de stress oxydant (Sakudo et al, 2004). Enfin, de nombreuses études démontrent la présence d'un stress oxydant au cours de la pathologie des EST (Milhavet & Lehmann, 2002). Des cellules neuronales infectées chroniquement ont une sensibilité accrue au stress oxydant par rapport à des cellules saines, indiquant que les infections à prions altèrent les mécanismes moléculaires de résistance aux espèces réactives à l'oxygène (Milhavet et al, 2000).



### **4.3) Partie 3 des résultats : fonction et agrégation d'un prion synthétique Nt<sup>er</sup> PrP/C<sup>ter</sup> Dpl**

#### 4.3.1) Avant-propos

Dans la dernière partie de mon travail de thèse, nous avons utilisé les modèles d'animaux transgéniques pour étudier la fonction et l'agrégation des protéines chimériques PrP/Dpl *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons généré, par transgénèse additive, des lignées de souris exprimant la chimère 1 (PrP<sup>1-125</sup>/Dpl<sup>58-179</sup>) sous le contrôle du promoteur endogène de la PrP<sup>c</sup>. Nous avons utilisé deux types de transgènes, comprenant des régions régulatrices de la PrP différentes, et permettant ainsi l'expression des chimères dans des types cellulaires variés. Dans l'étude de ces souris et pour répondre à la question principale de ce travail « peut-on créer un prion synthétique », nous avons cherché à répondre aux problématiques suivantes :

- L'expression tissulaire et la localisation cellulaire des protéines chimériques sont-elles similaires à celle de la PrP<sup>c</sup> ?
- Quel est le phénotype des animaux obtenus? La chimère comprenant la partie C-terminale de Dpl dans le cerveau, nos souris pourraient développer un phénotype ataxique similaire aux lignées Nagasaki et Zurich II (voir paragraphe 4.1). Si le phénotype est viable, les chimères peuvent-elles remplacer la PrP<sup>c</sup> dans sa fonction ?
- Enfin, peut-on obtenir un isoforme « chim<sup>Sc</sup> » après infection de ces souris par des souches de prions murinisées ?

L'ensemble des résultats de cette partie est présenté sous forme d'une ébauche d'article pour la chimère 1. Des résultats complémentaires sur des lignées de souris transgéniques obtenues récemment sont également discutés.

**Article 3 : « Characterization of a synthetic prion N<sup>ter</sup> PrP/C<sup>ter</sup> Doppel in mice »**

Paul Erlich, Catherine Lemaire-Vieille, Corinne Loeuillet, Bertrand Favier, Aude Salomon,  
Christophe Ribuot, Jean Gagnon and Jean-Yves Cesbron

Statut :

**Ebauche d'article**

# Characterization of a synthetic prion N<sup>ter</sup> PrP/C<sup>ter</sup> Dpl in mice

Paul Erlich<sup>1,2, \*</sup>, Catherine Lemaire-Vieille<sup>1,2, \*</sup>, Corinne Loeuillet<sup>1,2</sup>, Bertrand Favier<sup>1,2</sup>, Aude Salomon<sup>1,2</sup>, Christophe Ribuot<sup>4</sup>, Jean Gagnon<sup>1,2</sup> and Jean-Yves Cesbron<sup>1,2, 3,\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France;* <sup>2</sup> *CNRS, UMR 5163*

<sup>3</sup> *Laboratoire d'Immunologie, Département de Biologie, CHU Grenoble, BP217, 38043 Grenoble cedex 9, France*

<sup>4</sup> *Laboratoire HP2, EA 3745, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble I, France*

\* Corresponding author. Tel: +33 4 76 63 71 60.

E-mail address: jean-yves.cesbron@ujf-grenoble.fr

• Authors contributed equally to the work

## Abstract

We have recently shown that a chimeric protein composed of the N-terminal part of PrP and the C-terminal domain of Doppel behaves similarly to full length PrP. The chimera can form soluble  $\beta$ -sheet-rich oligomers which acquire partial resistance to pepsin proteolysis *in vitro*, as do PrP. As a next step of this study, we have engineered transgenic (tg) mice expressing this chimeric protein under the control of the endogenous promoter of PrP. Our data indicates that the Chi protein is correctly expressed in the brain of tg mice, and localizes in membrane rafts. However, these mice failed to promote neurodegenerative disease upon infection with murine-adapted prion strain Me7. Finally, the chimeric protein do not play a role in oxidative homeostasis *in vivo*, as does PrP.

**Keywords:** doppel, prion, transgenic mice, hypoxia

## **Abstract**

We have recently shown that a chimeric protein composed of the N-terminal part of PrP and the C-terminal domain of Doppel behaves similarly to full length PrP. The chimera can form soluble  $\beta$ -sheet-rich oligomers which acquire partial resistance to pepsin proteolysis *in vitro*, as does PrP. As a next step of this study, we have engineered transgenic (tg) mice expressing this chimeric protein under the control of the endogenous promoter of PrP. Our data indicate that the Chi protein is expressed in the brain of tg mice, and localizes in membrane rafts. However, these mice failed to promote neurodegenerative disease upon infection with murine-adapted prion strain Me7. Finally, the chimeric protein does not play a role in oxidative homeostasis *in vivo*, as does PrP.

**Keywords:** doppel, prion, transgenic mice, hypoxia,

## Introduction

The key molecular event in Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) is the conformational conversion of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) into the abnormal pathogenic scrapie isoform (PrP<sup>Sc</sup>) (Prusiner, 1998). The misfolded PrP<sup>Sc</sup> shows several structural and biochemical differences from PrP<sup>C</sup>, including a high percentage of  $\beta$ -sheet, partial resistance to proteolysis, insolubility in detergents, and a propensity to polymerize into amyloid-like fibrils (Pan et al, 1993). The cellular host encoded PrP<sup>C</sup> is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane glycoprotein expressed most abundantly in neurons (Bailly et al, 2004), and to a less extent in other non-neuronal tissues including heart, lung and kidney. To date, the physiological function of PrP<sup>C</sup> remains largely unknown (Zomosa-Signoret et al, 2008).

Doppel (Dpl) has been identified as a PrP<sup>C</sup> paralog, and both proteins were shown to share common biochemical and structural properties. Dpl and the C-terminal domain of PrP<sup>C</sup> have approximately 25% of primary amino acids sequence identity, yet their tertiary structure is very similar, and both share the same secondary structure consisting of a common  $\alpha$ -helical scaffold and two short  $\beta$ -strands (Mo et al, 2001). In contrast to PrP<sup>C</sup>, Dpl mRNA is mainly expressed in testis during development and at very low levels in other peripheral organs as well as brain of adult wild-type mice. Dpl primary function is elusive, but recent investigations clearly define it as a critical regulator of male gametogenesis (Behrens, 2003). Three transgenic (tg) mice lines ablated for the PrP gene, Ngsk, Rcm0 and Zurich II, develop late-onset ataxia as well as Purkinje cells and granule cells degeneration in the cerebellum (Rossi et al, 2001; Sakaguchi et al, 1996). In these tg lines, Dpl is ectopically upregulated in the central nervous system (CNS) (Moore et al, 1999). In these mice, the onset of disease is inversely correlated with the expression level of Dpl in brain, and this phenotype is strikingly rescued by co-expression of at least one copy of PrP<sup>C</sup> (Weissmann & Flechsig, 2003). In contrast, other *Prnp0/0* mice, in which Dpl expression in the brain is absent, develop normally. In mice defective or overexpressing Dpl, neither the time course of prion disease nor the generation of the pathogenic PrP<sup>Sc</sup> are significantly modified (Tuzi et al, 2002).

Dpl is commonly depicted as the “N-terminally truncated” version of PrP that might in principle be converted into a protease-resistant multimeric  $\beta$ -sheet rich isoform “Dpl<sup>Sc</sup>” (Behrens, 2003; Behrens & Aguzzi, 2002). We have recently presented *in vitro* evidences that such isoform could be obtained (Erlich et al, 2008). Indeed, we have constructed a murine recombinant chimeric protein composed of the N-terminal domain of PrP<sup>C</sup> (amino acids [23-125]) grafted to the C-terminal part of Dpl (amino acids [58-154]), and showed that this chimera is capable of forming soluble  $\beta$ -sheet-rich oligomers that are resistant to limited proteolysis with pepsin, as does recombinant PrP. This result, which suggests that the chimera displays PrP<sup>Sc</sup>-like biochemical and biophysical properties led us to investigate the potential relevance of this model *in vivo*.

In the present work, we generated tg mice, expressing this PrP/Dpl chimeric protein under the control of the endogenous *Prnp* promoter. These tg mice were further bred on the *Zrch I PrP<sup>0/0</sup>* genetic background. We investigated whether or not the chimeric protein could be transconformed into a proteinase K (PK) resistant isoform upon infection with prions strains. Moreover, we explored the ability of the chimeric protein to mimic PrP<sup>C</sup> function in oxidative homeostasis.

## **Material and Methods**

### Construction of transgenes

Cloning of the cDNA fragment encoding the chimeric PrP<sup>1-125</sup>/Dpl<sup>58-179</sup> protein into the intermediate pCR2.1 vector (Invitrogen) has been previously described (Erlich et al, 2008). The cosmid vector Cos6-1 (Fischer et al, 1996) (EMBL U29187) has been modified to replace the original PrP open reading frame (ORF) by a rare MluI restriction site. Briefly, a 13.7 kb PmeI-AgeI fragment was subcloned and subjected to serial PCR steps to delete the 5' end of the PrP ORF, introducing a unique MluI site. A second AgeI-SalI 3.5 kb fragment was subcloned similarly to remove the 3' end of the ORF. Both fragments were ligased and the resulting PmeI-SalI fragment was re-introduced in the Cos6-1 backbone to replace the original PmeI-SalI fragment. The PrP/Dpl chimeric ORF was excised from the pCR2.1 vector using flanking MluI restriction sites, and introduced in the modified cosmid.

The phgPrP vector (Fischer et al, 1996) has been mutated to leave a unique NarI restriction site in the 3' untranslated region (UTR) of the *Prnp* gene. The

resulting vector (phgPrPmutNarI) thus contains a unique AgeI site located at the beginning of the PrP ORF (ATG codon), and a unique NarI site in the 3' UTR. The AgeI-NarI fragment (1097 bp) was excised, and replaced by the chimeric construct matching the N-terminal AgeI cleavage, and generated using several steps of PCR and cloning into an intermediate pCR2.1 vector.

#### Generation of transgenic mice and breeding procedures

Cosmid and phgPrP plasmid containing the chimera coding sequence were propagated in Escherichia coli XL10 ultra competent cells, the gene excised respectively with *NotI* or *NotI/SalI*, purified using a 15% sucrose gradient, and injected into fertilized *Prnp*<sup>+/+</sup> oocytes (C57BL/6 x DBA/2 cross) by standard procedures (Rulicke, 2004). Transgenes were identified by PCR on tail-extracted genomic DNA using primers CL20/02 (5'-GCG GCG CCA TCC CCA AAC AGT GGC TTC -3') and CL29/03 (5'-CCT AGG AGC CTT CAT CAA GCA AGG CCG G- 3') giving a product of 770bp for the PrP/Dpl transgene. Transgenic founders were serially crossed with C57BL/6J *ZrchI Prnp*<sup>0/0</sup>. To test for the presence of *Prnp* alleles, additional PCR was carried out using primers BF03/02 (5'-TCA TGC CCA TTT CCA AAT TCC ACT ACA-3'), BF07/02 (5'-GGG TAG CGG TAC ATG TTT TCA CGG TAG-3') and BF09/02 (5'-ACG CGT CAC CTT AAT ATG CGA AGT GGA-3'). A fragment of 566 bp indicates the presence of *Prnp*<sup>0/0</sup> allele, whereas a product of 779 bp is detected for the *Prnp*<sup>+/+</sup> allele. Heterozygous mice display both amplicons.

#### Copy number determination

Purified genomic DNA (5 µg) was denatured at 100°C, diluted in 20x cold SSC and vacuum dot-blotted on a charged nylon membrane (Hybond N+, Amersham). Membranes were incubated with 0.4M NaOH, then 1h at 42°C in hybridization buffer (HB: 20x SSC, 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 10% SDS, 50x Denhardt's solution, 40% formamide, 10 mg/ml of salmon sperm DNA). After hybridization (overnight, 42°C) with a <sup>32</sup>P dCTP (Megaprime DNA Labeling System, Amersham) labeled probe (PrP N-terminal fragment of 300 bp), membranes were washed twice at 65°C (0.5x SSC, 0.1 % SDS) and subjected to autoradiography (Amersham Hyperfilm MP) in a cassette at -80°C. Films were developed and signals quantified using ImageJ (NIH).

### Antibodies

Anti-PrP monoclonal antibodies were gifts from Jacques Grassi (CEA, Gif sur Yvette). SAF 32 (0.4 µg/ml) recognizes amino acids 59-89 in the N-terminal domain of murine PrP, thus can also detect the chimeric protein. SHA 31 targets the C-terminal domain of PrP (amino acids 145-152), and is suitable for detection of PrP<sup>Sc</sup> (Western blotting, 0.32 µg/ml). Rabbit polyclonal anti-Dpl “Dpl1” was obtained by immunizing rabbits with recombinant full length Dpl (Expression and purification of Dpl has been described in previous work (Erlich et al, 2008)). Sera were tested by Western blotting using total protein extracts from mouse testis for their ability to detect cellular Dpl (dilution, 1 :7,500). Commercial (Sigma Aldrich) monoclonal anti flotillin (1 :5,000) and anti-β-actin (1 :10,000) antibodies were used for controls.

### Western Blotting

Brain homogenates (10% w/v) were prepared in a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 µM of protease inhibitors pepstatin and leupeptin. After 10 min of centrifugation at 3,000 g, the supernatant was collected and its total protein concentration was determined by the bicinchoninic (BCA) protein assay (Uptima, Interchim). For PrP<sup>c</sup> and Chimera detection, the equivalent of 30 µg of total protein was mixed with reducing Laemmli buffer, boiled at 100°C for 5 min and subjected to 15% SDS-PAGE electrophoresis. For PrP<sup>Sc</sup> and Chim<sup>Sc</sup> detection, the equivalent of 1 mg of total protein was incubated with 20µg/ml of Proteinase K (PK, Roche) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 4 mM PMSF (Roche). Proteins were centrifuged for 1h at 240,000 g on a 10% sucrose cushion, and the pellet was resuspended in reducing Laemmli buffer, boiled at 100°C for 5 min and loaded onto a 15% SDS-PAGE gel.

In both cases, the proteins were transferred (400 mA for 60 min) onto a nitrocellulose membrane (Trans-Blot Transfer Medium, 0.2 µm, Bio-Rad). After transfer, the membrane was rinsed in PBS for 5 min and blocked with 3% BSA in PBS-0.1% Tween 20. The next day, the membrane was rinsed 2 times each for 10 min in PBS-0.1% Tween 20, and incubated for one hour at room temperature with the appropriate primary antibody diluted in PBS-0.1% Tween 20. After washing, the membrane was incubated with the secondary antibody (goat anti-mouse HRP



conjugate (1:2,500), or goat anti-rabbit HRP conjugate (1:2,500) for 45 min (Jackson). Blots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia) and exposed on X-Ray film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia).

#### Deglycosylation assay

For deglycosylation, 50 µg of denatured total protein from brain lysates was incubated at 37°C for 4 h with 500U PNGase F (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions, in the presence of protease inhibitors leupeptin and pepstatin (10 µg/ml). Reaction was stopped by adding reducing Laemmli buffer, and samples were analyzed by Western blotting as described above.

#### Lipid raft isolation

Appropriate brain homogenates were extracted for 2 h on ice in cold lysis buffer (150mM NaCl, 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM EDTA, 1% Triton X-100; total protein: 1mg in 1.5 ml). Extracts were mixed with one volume (1.5 ml) of 90% sucrose in TNE (150mM NaCl, 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM EDTA) to reach a final concentration of 45%. All lysates were loaded at the bottom of Beckman ultracentrifuge tubes. A 5–35% saccharose in TNE was then overlaid onto the lysate (6 ml of 35% and 3 ml of 5% saccharose). Tubes were centrifuged for 19 h at 4°C in a TLS55 Beckman rotor at 200,000 g. Twelve fractions (1 ml) were collected from the bottom of the tube. The equivalent of 300 µl of each fraction was treated with 3 volumes of methanol (900 µl), one volume of chloroform (300 µl) and 3 volumes of milliQ H<sub>2</sub>O, and centrifuged for 5 min at 4°C, 10,000 g. The aqueous upper phase was eliminated, proteins were precipitated with 3 volumes of methanol, and centrifuged as above. The pellet was dried and resuspended in reducing Laemmli buffer, and processed for immunoblotting with anti-PrP SAF 32 and anti-flotillin antibodies.

#### Inoculation of mice

Four week-old mice were inoculated intracerebrally with 30 µl of appropriate inoculum injected in the right parietal lobe using a 26-gauge needle mounted on an insulin syringe. The syringe was placed in an automatic dispenser allowing constant flow of 1 µl per second. For the first passage, mice were inoculated using 10% (w/v) brain homogenate prepared from terminally-ill C57BL/6 mice inoculated

with Me7 scrapie strain. For the second passage, 10% (w/v) brain homogenates were prepared from terminally-sick tg mice inoculated with Me7. Finally, Mice were inoculated with 25  $\mu$ M of soluble oligomers of recombinant chimera, prepared in 20 mM Na Acetate pH3.5 accordingly to Erlich et al, 2008. Mice were killed on the day of onset of terminal clinical signs of scrapie, brains removed and stored at -80°C until analysis.

#### *Intermittent hypoxia and protein oxydation*

Four months old and sex-matched mice of appropriate genotypes were housed in regular cages on a ventilated shelf that was customized to deliver an intermittent hypoxia (IH). A gas control delivery system regulated the flow of nitrogen and oxygen in cages housing the mice. Inspired oxygen was regulated to drop from 21% to 5% over a 1 min period with a rapid reoxygenation to room air levels in the following minute. Events occurred at a rate of one per minute throughout the 12 h light period from 8 am to 8 pm. During the dark period, from 8 pm to 8 am, the animals were maintained in a constant undisturbed room air environment. Normoxic control animals received the same gas flow exposure as the IH, but using only room air. Animals were exposed to 2 consecutive days, and sacrificed. Brains were removed and quickly frozen in liquid nitrogen. Brain lysates were prepared accordingly to the Western blot procedure described above, except that lysis buffer contained 0.5% of  $\beta$ -mercaptoethanol. Protein oxidation in total brain homogenates were measured by assaying the amount of carbonyl groups on proteins using the OxyBlot Detection Kit (Chemicon International). The procedure was performed according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 20  $\mu$ g of total brain lysate was derivatized with or without 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), precipitated using 3 volumes of cold methanol and resuspended samples loaded onto a reducing 15% SDS-PAGE gel. After separation, proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane and incubated with antibody raised against the derivatized carbonyl groups. Films were developed, and the relative optical densities were quantified using ImageJ software.

## Results

### *Generation and characterization of tg mice*

In order to extend our previous *in vitro* findings that a recombinant chimeric (Chi) protein composed of the PrP N-terminal residues 23-125 fused to the C-terminal domain of Dpl (58-154) can display PrP<sup>Sc</sup>-like characteristics, we have generated several transgenic mouse lines expressing the chimeric protein (Figure 1A). The coding sequence of Chi was inserted into two different backbones: a cosmid vector (Cos6-1) containing all regulatory regions of the *Prnp* gene, and the half genomic construct phgPrP from which the large intron is deleted (Fischer et al, 1996). Both constructs allow the expression of the chimeric protein under the control of the murine PrP promoter (Figure 1B). Microinjection of transgenes into fertilized eggs of C57BL/6 x DBA mice yielded 4 founders for the phgPrP vector (Hg10, Hg17, Hg30, Hg47), and 1 founder for the cosmid transgene (Cos14). All of these founders successfully transferred the transgenes into their offspring. These tg mice were successively intercrossed with non-ataxic ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup> mice to eliminate endogenous expression of PrP<sup>C</sup>. Quantitative dot blotting analysis revealed that the number of transgenic copies varied between 1 and 4 per haploid genome (Table 1). No tg mice on PrP<sup>0/0</sup> background showed any abnormal symptoms including ataxia up to 800 days after birth (data not shown). This indicates that the PrP/Dpl protein might be non-toxic especially in the absence of PrP<sup>C</sup>.

The expression of the chimeric protein in the brain was confirmed by Western blotting. As shown in Figure 2A, the chimeric protein was detected in the brain homogenate of all 5 mouse lines using a monoclonal antibody raised against the N-terminal part of PrP (SAF 32). However, the expression level in tg mice was relatively low compared to WT mice. Quantification of optical densities indicated that expression was comprised between 12% for Hg17 and 20% for Hg20 (Table 1). Upon PNGase-F treatment, the Chimera displayed enhanced electrophoretic motility similar to PrP<sup>C</sup> (Figure 2B), suggesting that the chimeric protein was N-glycosylated to a similar extent. Finally, we analyzed detergent-resistant membranes from WT, tg Cos14 and Hg10 mice brains by step density-gradient centrifugation. The buoyancy of Chi was similar to that of PrP<sup>C</sup> and flotillin (Figure 2C) suggesting that they all reside in similar membrane microdomains. Therefore, most aspects of Chi biogenesis appear similar to those of PrP<sup>C</sup>.

### ***Expression of Chi do not delays the onset of disease upon infection with prions***

Consistent with our previous finding that the chimeric protein could form *in vitro* soluble  $\beta$ -sheet rich oligomers resistant to partial proteolysis by pepsin (Erlich et al, 2008), we investigated the infectivity potential of our chimeric tg mice. First, we inoculated tg mice Cos14 and Hg30 on various PrP genetic backgrounds intracerebrally with the Me7 prion strain (Figure 3). Latency in control Wild-type mice was dependent on the *Prnp* status, with PrP<sup>+0</sup> mice surviving longer (290  $\pm$ 12 days) than PrP<sup>+/+</sup> mice (162  $\pm$ 4 days, Figure 3A). As shown in Figure 3B, Cos14 tg mice displayed similar incubation times, their onset of disease also corresponded to the presence of 1 or 2 alleles of the *Prnp* gene (respectively 289  $\pm$ 15 days for tg PrP<sup>+0</sup> mice and 162  $\pm$ 4 days for tg PrP<sup>+/+</sup> mice). Hg30 mice displayed the same survival rate (Figure 3C). None of the inoculated *Prnp0/0* tg mice developed any signs of the disease for a period >600 days after challenge. Similar results were found with remaining inoculated tg Hg10, Hg17 and Hg47 mice line (Table 2). Brains from first-passaged tg Cos14 and Hg30 mice were used to prepare inocula for second serial passage. Cos14 and Hg30, on various PrP genetic backgrounds, were inoculated intracerebrally with corresponding inoculum. At the time of writing, the experiment is still on-going (data not shown). However, preliminary results showed that mice on a PrP<sup>+/+</sup> genetic background died with incubation times similar to WT mice (respectively 167 $\pm$ 3 days for Cos14 and 164 $\pm$ 10 days for Hg30). The most stringent criteria for judging whether prion infectivity is generated *in vitro de novo* is a bioassay in animals (Legname et al, 2004). Therefore, we inoculated intracerebrally tg mice Hg10 with *in vitro* formed purified oligomers of recombinant Chi. Ten mice of two groups (PrP<sup>0/0</sup> or PrP<sup>+0</sup> backgrounds) were inoculated with 25  $\mu$ M of Chi oligomers, but none were found to develop any clinical signs of neurological disease, up to 600 days post inoculation (Table 2).

### ***Transgenic mice do not accumulate the PK resistant isoform of Chi***

To determine if inoculated tg mice accumulated a PK resistant isoform of the chimeric protein, we performed immunoblot analysis of brain homogenates (Figure 4). First passaged *Prnp+/+* tg mice died from scrapie, as indicated by the presence of PrP<sup>Sc</sup> in their brains (Figure 4A). In our previous findings, we showed that oligomers of recombinant Chi assemble through the C-terminal domain of Dpl (Erlich et al,

2008). Therefore, we probed the brain samples with a rabbit polyclonal anti-Dpl antibody. This antibody is able to recognize the cellular form of Dpl, as shown by the control lane where total protein lysate from mouse testis was blotted. However, no detectable sign of PK-resistant Chi was seen. Samples from second passage experiment were analyzed under the same conditions (Figure 4B). Presence of PrP<sup>Sc</sup> was confirmed using anti-PrP antibody, and no detectable signal was observed for membranes probed with the anti-Dpl antibody. Together, these results indicate that tg mice do not accumulate PK resistant PrP/Dpl, or at least in quantities below the detection level of the anti-Dpl antibody.

### ***The chimeric protein does not play a role in oxidative homeostasis***

Various findings are indicative of a protective role of PrP in oxidative homeostasis *in vivo* (Brown et al, 2001; Klamt et al, 2001; Wong et al, 2001). We addressed the question whether or not Chi could mimic PrP<sup>c</sup> function against oxidative damage. Therefore, we used a model of intermittent hypoxia (IH) to induce oxidative stress in the brain of WT, tg Hg10 and PrP<sup>0/0</sup> mice. Mice were exposed to 48 hours of hypoxic or normoxic cycles, as described in the material and method section. Protein oxidation in total brain homogenates was measured by assaying the amount of carbonyl groups on proteins by Western blotting (Figure 5A). In normoxic control groups, WT, PrP<sup>0/0</sup> and tg mice displayed similar levels of protein oxidation (Figure 5B, white histogram bars). This result indicated that upon normal housing conditions, mice devoid of PrP<sup>c</sup> did not exhibit altered balance in oxidative homeostasis. When mice were exposed to IH, all three groups accumulated higher levels of carbonyl groups than for normoxic controls, indicating that hypoxic cycles efficiently induced oxidative damages in the brain. PrP<sup>0/0</sup> mice displayed much higher levels of oxidation than WT mice (black histogram bars,  $p < 0.05$ ). This result was consistent with the fact that PrP<sup>c</sup> plays a role in protection against oxidative damage in the brain. Surprisingly, *Prnp0/0* tg mice displayed similar levels of carbonyl groups than PrP<sup>0/0</sup> mice. This result indicated that the expression of the chimeric PrP/Dpl protein in the brain of tg mice could not antagonize the susceptibility of the *Prnp0/0* mice to oxidative stress, unlike WT PrP<sup>c</sup>.

## Discussion

Dpl, the first identified structural homologue of the C-terminal domain of PrP<sup>C</sup> is neurotoxic causing ataxia and Purkinje cell degeneration in mice (Moore et al, 1999; Yamaguchi, 2004; Anderson, 2004). Whether or not Dpl could be converted into a protease-resistant isoform “Dpl<sup>Sc</sup>” (Behrens, 2003; Behrens & Aguzzi, 2002) remains to be determined. To investigate this question, we have previously developed a chimeric protein, composed of the N-terminal domain of PrP (amino acids 1-25) and the C-terminal structured domain of Dpl (amino acids 58-179). Our previous findings indicated that this protein displays PrP<sup>Sc</sup>-like properties *in vitro*, i.e. the ability to form, upon incubation at 40°C in 100 mM NaCl, soluble  $\beta$ -sheet rich oligomers that are resistant to limited proteolysis (Erlich et al, 2008). In the present study, we have generated and characterized transgenic mice expressing the chimeric PrP/Dpl protein under the control of the endogenous promoter of PrP. We showed that Chi is expressed as fully N-glycosylated in the brain of all five tg mice lines and that its expression was non-toxic when mice were intercrossed on the *Zrch1 Prnp*<sup>0/0</sup> background. In addition, Chi localizes in detergent resistant microdomains of the membrane (DRM), as does PrP<sup>C</sup>. Membrane-bound expression of such PrP/Dpl protein has recently been described in cell culture (Lee et al, 2006). We microinjected transgene constructs that contained different regulatory regions, thus we expected the chimeric protein to be expressed in different cell types for Cos and Hg mice (for example granule cell layer and Purkinje cell layer). Such investigations are currently ongoing, using immunohistochemistry.

Intracerebral inoculations of tg mice with Me7 strain did not generate detectable PK-resistant Chi isoform, nor did second passage. This might be due to low expression levels of the chimeric protein in the brain, as well as the fact that inoculated mice were heterozygous for the transgene. However, it is possible that the anti-Dpl antibody we used is not suitable to probe for an aggregated form of Dpl. While this antibody detect *in vitro*-formed soluble oligomers of Chi (data not shown), as well as cellular Dpl, we cannot exclude that epitopes on aggregated Chi are buried, as it is seen for various epitopes in PrP<sup>Sc</sup> that require guanidinium denaturation to be accessible. Similar results were obtained with several other commercially available anti-Dpl antibodies (data not shown). Inoculation of tg mice with *in vitro* formed Chi oligomers resulted in a normal lifespan, without any clinical signs of

neurodegenerative diseases. This indicates that our recombinant oligomers are not neurotoxic. The question bears on their ability to be infectious, thus we planned to performed serial passages.

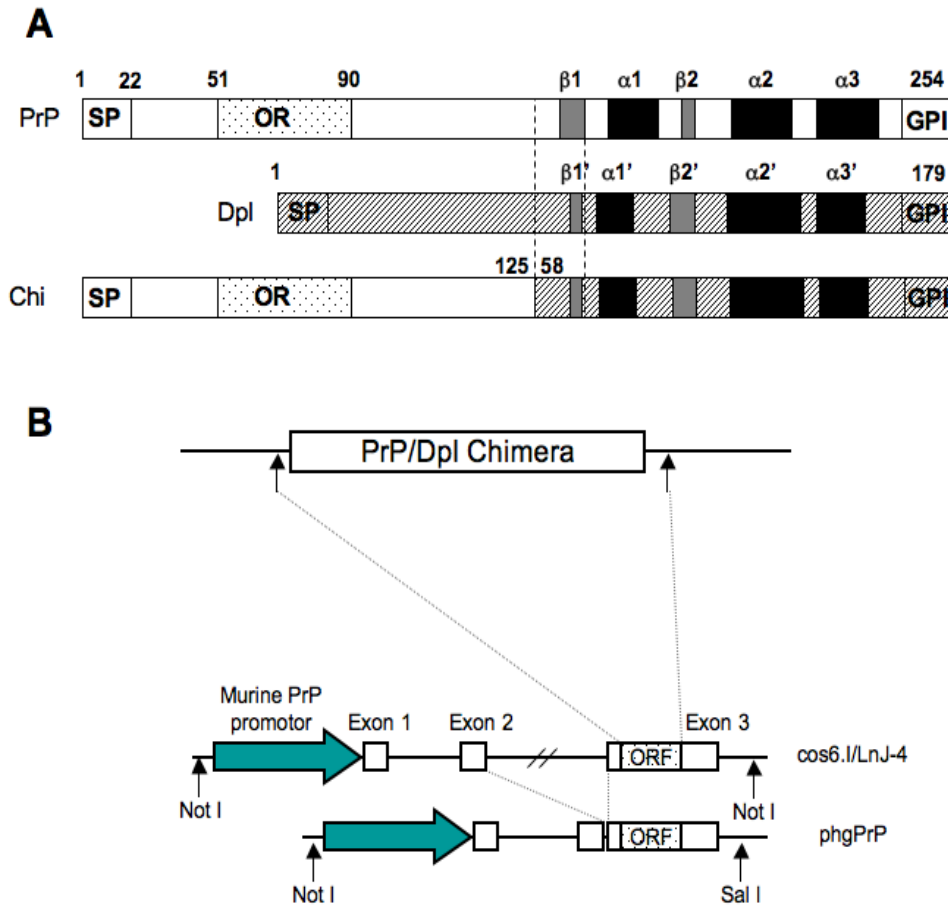
We have tested the anti-oxidant ability of the chimeric protein, upon exposure of mice to oxidative stress. Intermittent hypoxia has been shown to trigger high levels of protein oxidation in mice brain (Xu et al, 2004). PrP<sup>0/0</sup> mice were more susceptible to oxidative damage than WT mice expressing PrP<sup>c</sup>, as it has been previously described (Brown et al, 2001; Klamt et al, 2001; Wong et al, 2001). Chimeric mice displayed similar levels of protein oxidation than PrP<sup>0/0</sup> mice, suggesting that expression of the chimera was not sufficient to regulate oxidative homeostasis. However, we cannot exclude that higher level of expression of Chi in tg mice would antagonize this phenomenon, as seen in WT mice. PrP<sup>c</sup> functionally antagonizes the neurotoxicity of Dpl, when it is expressed ectopically in the brain of tg mice (Moore et al, 1999; Yamaguchi, 2004; Anderson, 2004). Thus, one other possible experiment to determine if the chimeric protein could mimic PrP function would be to intercross chimeric mice with Dpl-induced ataxic mice. Recently, Yoshikawa and colleagues have described such experiment. When intercrossed with mice expressing exogenous Dpl in the brain, the fusion PrP/Dpl protein prolonged the onset of ataxia (Yoshikawa et al, 2008). This indicated that the chimeric protein possesses, to some extent, a neuroprotective potential similar to PrP<sup>c</sup>.

Level of expression of the chimeric protein in the brain is a critical parameter to study the infectious potential and the physiological role of the mutant protein. We have developed new mice lines that display higher levels of protein expression. In addition, the chimeric construct used to generate these mice carries two amino-acid substitutions (M108L and M11V) creating a hamster epitope recognized by the monoclonal antibody 3F4. Such a tool will be useful to distinguish between Chi and endogenous PrP<sup>c</sup> in future investigations, including infections. Also we intend to use brain extracts from tg mice as template in Protein Cyclic Misfolding Assays to further characterize the infectious potential of the chimeric PrP/Dpl protein.

## **Acknowledgment**

We thank The Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) for excellent animal care.

**Figure 1**



**Figure 1. A.** Schematic representation of PrP, Dpl and Chi proteins. Chi is a fusion protein consisting of the N-terminal residues 1-125 of PrP and the residues 58-179 of Dpl. Arabic numbers represent the codon numbers. SP, signal peptide; OR, octapeptide repeat; GPI, GPI anchor signal;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -helix;  $\beta$ ,  $\beta$ -strand; hatched, Dpl. **B.** Construction of transgenes for micro-injection. The DNA fragment encoding the chimeric protein replaces the open reading frame of PrP in the cos6.I/LnJ-4 or in the phgPrP vectors carrying the murine PrP promoter. *Not I* digested fragments for cos6.I and *Not I* - *Sal I* digested fragments for phgPrP were purified and used as transgenes.

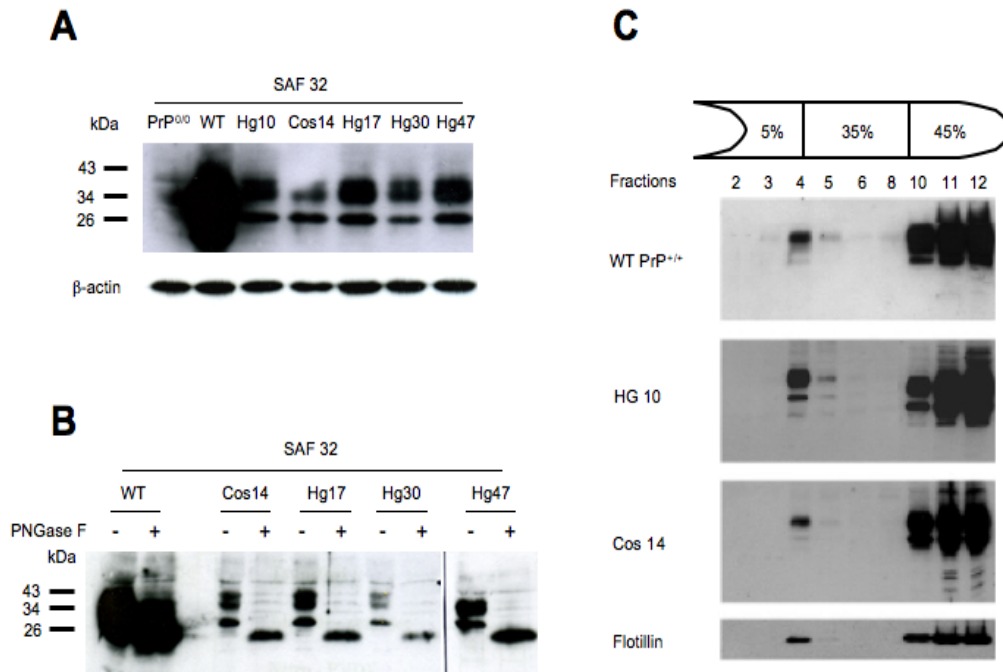


**Table 1**

Table 1: Characteristics of chimeric Tg mice.				
Tg line	Vector	genetic background	Copy number	Expression Level (fold) <sup>1</sup>
Cos 14	cos6.l/LnJ-4	Tg <sup>+0</sup> Zrch I PrP <sup>0/0</sup>	1	0.13
Hg 10	phgPrP	Tg <sup>+0</sup> Zrch I PrP <sup>0/0</sup>	4	0.2
Hg 17	phgPrP	Tg <sup>+0</sup> Zrch I PrP <sup>0/0</sup>	1	0.12
Hg 30	phgPrP	Tg <sup>+0</sup> Zrch I PrP <sup>0/0</sup>	2	0.15
Hg 47	phgPrP	Tg <sup>+0</sup> Zrch I PrP <sup>0/0</sup>	2	0.14

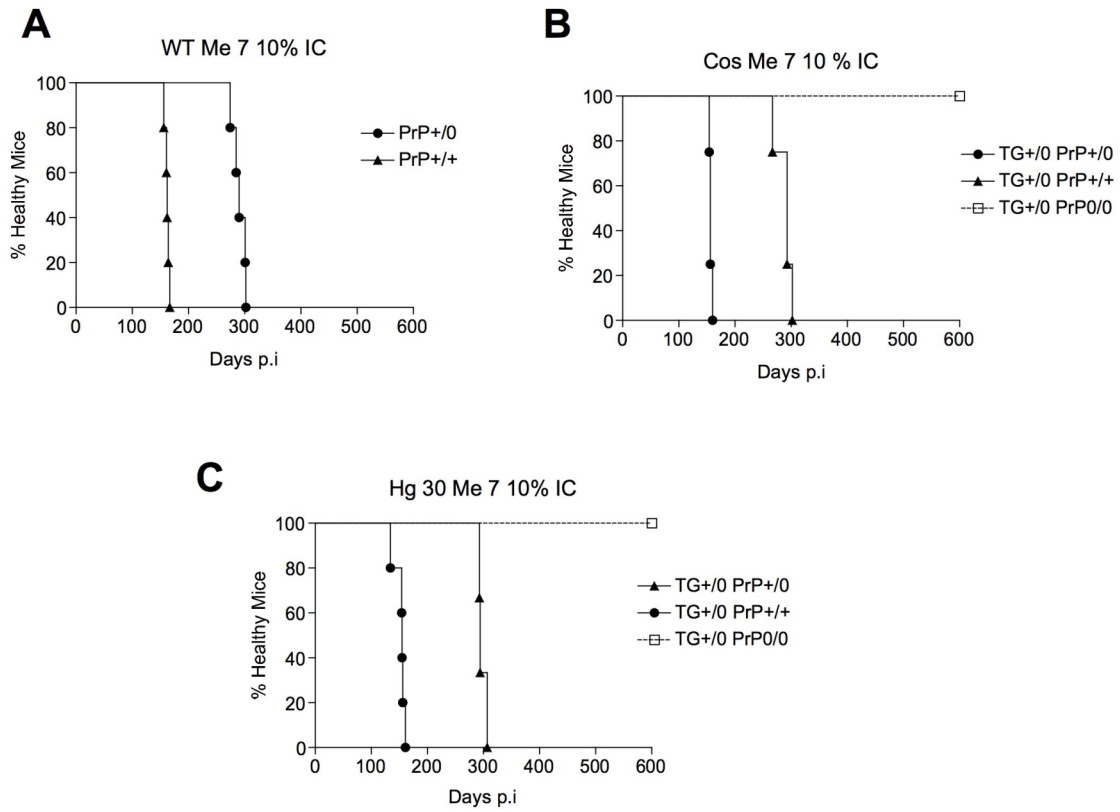
<sup>1</sup> Expression levels were compared to those of PrP in WT mice using Western blotting

**Figure 2**



**Figure 2.** Expression of chimera in the brain of tg mice. Western blots were revealed using anti-PrP antibody SAF32, raised against the N-terminal domain, thus recognizing the N-terminal part of the chimera. **A.** Western Blot of total brain lysate, 30  $\mu$ g of the total proteins were loaded onto each lane. **B.** Similar glycosylation patterns of WT PrP and Tg mice expressing the chimeric protein. Brain homogenates were subjected to PNGase F treatment as indicated and analyzed by Western blotting. **C.** Density gradient analysis of detergent-resistant membrane (DRM) preparations from the brains of wild-type, Cos14 and Hg10 transgenic mice. Fractions 1-12 of the step gradient were analyzed by Western blotting. PrP and Chi were detectable to a similar extent in the upper fractions, indicating that they all localize to DRMs similar to flotillin (48 kDa). For WT, each fraction was diluted 10 fold prior electrophoresis.

**Figure 3**



**Figure 3.** Survival of WT, Cos 14 and Hg 30 transgenic mice upon 10% intracerebral infection with prion strain Me7. **A.** WT mice. **B.** Cos 14 mice, on various genetic backgrounds. **C.** Hg 30 mice, on various genetic backgrounds. Mice were scored for neurological signs, and killed if bilateral hind limb paralysis lasted >4 days. Longevity was dependent on the *Prnp* status, with PrP+/0 mice surviving longer than PrP+/+ mice. Each line represents 3-5 individuals.

**Table 2**

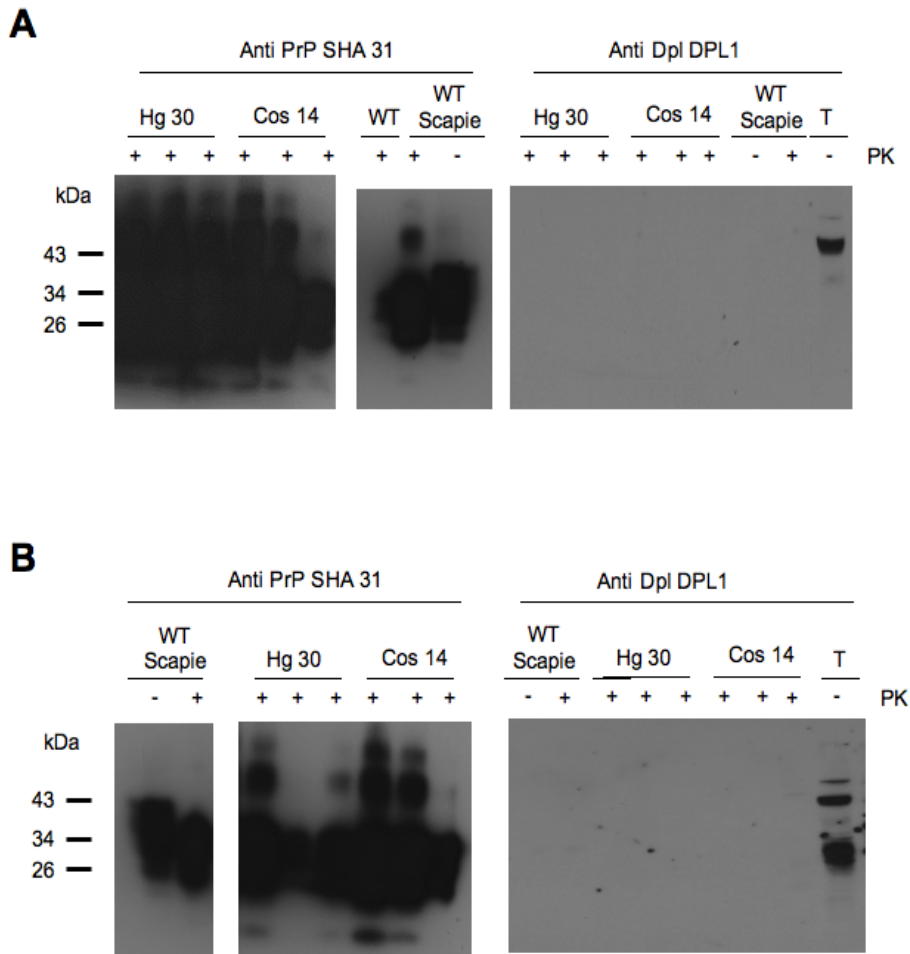
Tg line <sup>1</sup>	PrP genetic background	Inoculum	Attack Rate	Days $\pm$ s.d.	Presence <sup>2</sup> of Chim <sup>Sc</sup>
Hg17	PrP <sup>+/+</sup>	10% Me7	7/7	165 $\pm$ 6	No
Hg47	PrP <sup>+/0</sup>	10% Me7	6/6	283 $\pm$ 5	No
Hg10	PrP <sup>+/0</sup>	10% Me7	3/3	284 $\pm$ 15	No
Cos14, Hg30, Hg10	PrP <sup>0/0</sup>	10% Me7	0/12	>600	No
Hg10	PrP <sup>+/0</sup> , PrP <sup>0/0</sup>	25 $\mu$ M Chi oligomer <sup>3</sup>	0/20	>600	N.D

<sup>1</sup> All mice were heterozygous for the transgene

<sup>2</sup> As determined by Western blotting using anti-Dpl antibody

<sup>3</sup> Oligomers were prepared and purified accordingly to *Erlich et al., 2008*

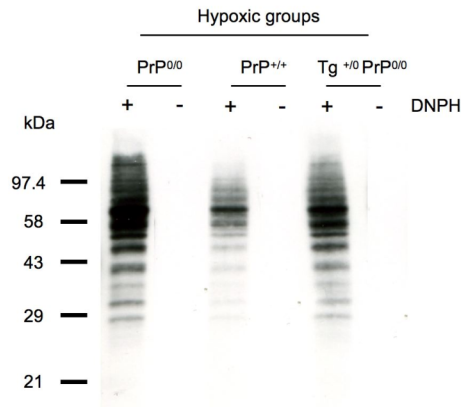
**Figure 4**



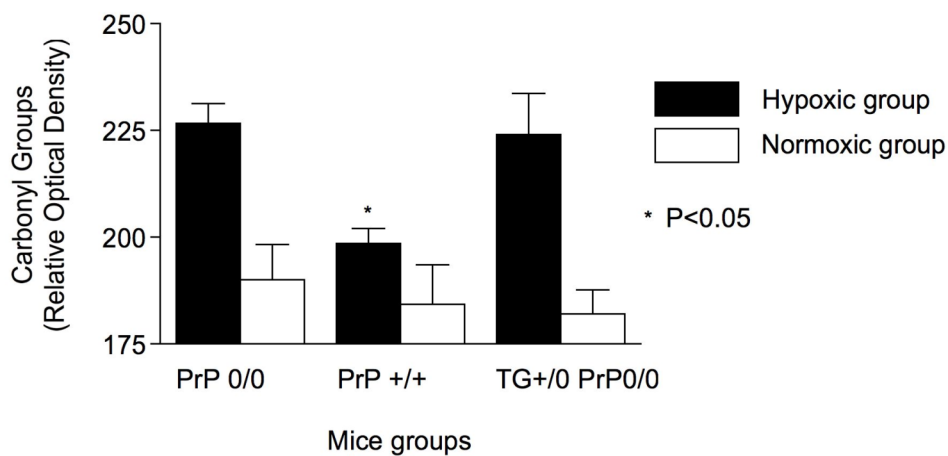
**Figure 4.** Immunoblot analysis of brain homogenates from inoculated mice. **A.** Mice inoculated in a first passage experiment with Me7 strain were probed for the presence of PK resistant PrP<sup>Sc</sup> using anti-PrP monoclonal antibody SHA31, or for the presence of PK resistant chimera using anti-Dpl polyclonal antibody DPL1. **B.** WT, and Tg mice Hg30 and Cos14 were inoculated intracerebrally using inoculum prepared with brain from first-passaged mice, and probed for the presence of PrP<sup>Sc</sup> and Chim<sup>Sc</sup> as described above. All Tg mice shown in the figure were on a PrP<sup>+0</sup> genetic background.

## Figure 5

**A**



**B**



**Figure 5.** Protein oxidation (reactive carbonyl groups) in the brain lysates of WT, PrP<sup>0/0</sup> or Hg 10 mice, after exposure to intermittent hypoxia (IH). **A.** Carbonyl assay using 20  $\mu$ g total brain lysates derivatized without (-) or with (+) 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), followed by electrophoretic separation on a 15% gradient SDS-PAGE and immunoblotted against the derivatized carbonyl groups. **B.** The relative optical density on the level of reactive carbonyl groups detected in brain lysates (After exposure to IH, black histogram bars; or for the normoxic control group, white histogram bars). Data are mean + SEM of three independent experiments using three age-matched mice (n= 3, 4 months old). \*p<0.05 compared to PrP<sup>0/0</sup> mice. Quantification was performed by plot profiling whole series of bands for each lane in a prefixed area using ImageJ software.

## References

Bailly Y, Haeberle AM, Blanquet-Grossard F, Chasserot-Golaz S, Grant N, Schulze T, Bombarde G, Grassi J, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C (2004) Prion protein (PrP<sub>c</sub>) 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): 244-269

Behrens A (2003) Physiological and pathological functions of the prion protein homologue Dpl. *Br Med Bull* 66: 35-42

Behrens A, Aguzzi A (2002) Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP(C) and its homologue Dpl. *Trends Neurosci* 25(3): 150-154

Brown DR, Clive C, Haswell SJ (2001) Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* 76(1): 69-76

Erlich P, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C, Curt A, Andrieu JP, Schoehn G, Jamin M, Gagnon J (2008) PrP N-terminal domain triggers PrP(Sc)-like aggregation of Dpl. *Biochem Biophys Res Commun* 365(3): 478-483

Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* 15(6): 1255-1264

Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota MJ, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, Fonseca Moreira JC (2001) Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 30(10): 1137-1144

Lee DC, Sakudo A, Kim CK, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Chen SG, Itohara S, Onodera T (2006) Fusion of doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation. *Microbiol Immunol* 50(3): 203-209

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305(5684): 673-676

Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ (2001) Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2352-2357

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* 292(4): 797-817

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10962-10966

Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13363-13383

Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *Embo J* 20(4): 694-702

Rulicke T (2004) Pronuclear microinjection of mouse zygotes. *Methods Mol Biol* 254: 165-194

Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380(6574): 528-531

Tuzi NL, Gall E, Melton D, Manson JC (2002) Expression of doppel in the CNS of mice does not modulate transmissible spongiform encephalopathy disease. *J Gen Virol* 83(Pt 3): 705-711

Weissmann C, Flechsig E (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66: 43-60

Wong BS, Liu T, Li R, Pan T, Petersen RB, Smith MA, Gambetti P, Perry G, Manson JC, Brown DR, Sy MS (2001) Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* 76(2): 565-572

Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, Luo C, Kheirandish L, Gozal D, Liu R (2004) Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience* 126(2): 313-323

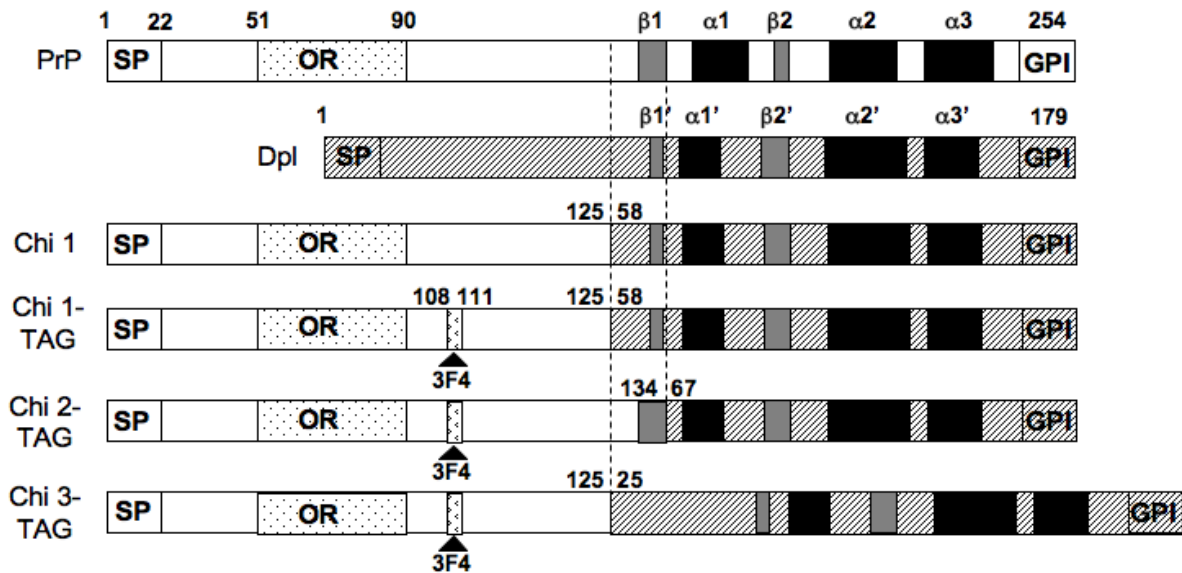
Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, Yamaguchi Y, Mori T, Miyata H, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S (2008) Dominant-negative effects of the amino-terminal half of prion protein on neurotoxicity of PrP-like protein/doppel in mice. *J Biol Chem*

Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Fontes P, Alvarez-Martinez MT, Liautard JP (2008) Physiological role of the cellular prion protein. *Vet Res* 39(4): 9



#### 4.3.2) Résultats complémentaires et conclusion

En parallèle de ce travail, nous avons généré d'autres lignées de souris transgéniques, exprimant les protéines chimériques 2 et 3 (**Figure 35**). Les constructions des chimères 2 et 3 ont été insérées dans le vecteur phgPrP (voir matériel et méthode **article 3**). Pour faciliter l'analyse de ces nouvelles lignées, les séquences des chimères 2 et 3 sont mutées en position 108 et 111 (M108L et M111V), ce qui permet la reconnaissance de cet épitope par l'anticorps 3F4, originellement produit contre la PrP de hamster (Lund et al, 2007). Nous avons également taggé et micro-injecté la construction de la chimère 1 pour obtenir des lignées de cette construction possédant un niveau d'expression plus important.



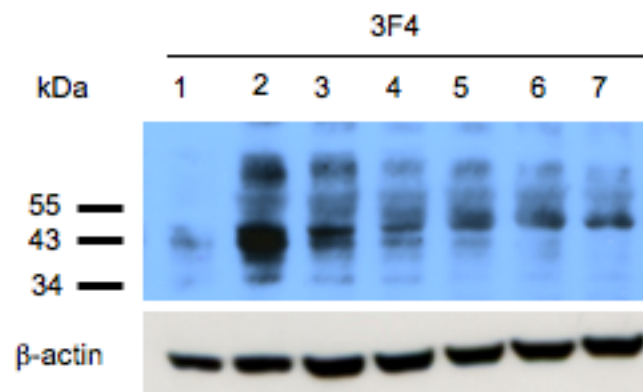
**Figure 35 : Représentation schématique des constructions chimériques.** Les nouvelles constructions possèdent un tag qui permet la reconnaissance par l'anticorps 3F4.

Nous avons obtenu 4 souris fondatrices pour la construction Chi1TAG (N°5, 19, 32, 53), une pour la construction Chi2TAG (N°12) et enfin une fondatrice pour la construction Chi3TAG (N°13). Les caractéristiques de ces lignées sont indiquées dans le **tableau 5**. Le nombre de copies de transgènes insérés dans le génome de ces souris a été déterminé par dot blot (voir matériel et méthode **article 3**).

Lignée	Vecteur	Fond génétique	Copies du Tg
Chi1TAG5	phgPrP	PrP <sup>+/+</sup>	5
Chi1TAG19	phgPrP	PrP <sup>+/+</sup>	2
Chi1TAG32	phgPrP	PrP <sup>+/+</sup>	2
Chi1TAG53	phgPrP	PrP <sup>+/+</sup>	15
Chi2TAG12	phgPrP	PrP <sup>+/+</sup>	10
Chi3TAG13	phgPrP	PrP <sup>+/+</sup>	15

**Tableau 5 : Principales caractéristiques des lignées de chimères 1, 2 et 3 TAG**

L'expression des protéines chimériques dans le cerveau des différentes lignées a été confirmé par Western blotting, en utilisant l'anticorps 3F4 (**Figure 36**). Pour la chimère 1, les niveaux d'expression sont très variables (faible pour Chi1TAG5 mais fort pour Chi1TAG53). Pour les deux autres chimères, les niveaux d'expression sont similaires et faibles.



**Figure 36 : Expression des protéines chimériques dans le cerveau des souris Tg.** Trente µg d'extrait protéique total du cerveau et du cervelet des différentes lignées de souris tg sont analysées par Western blot à l'aide de l'anticorps 3F4. Piste control 1: cerveau humain; piste 2: Chi1TAG53; piste 3: Chi1TAG19; piste 4: Chi2TAG12; piste 5: Chi3TAG13; piste 6: Chi1TAG32; piste 7: Chi1TAG5.

Les lignées de souris chimériques sont actuellement en croisement avec des souris ZrchI PrP<sup>0/0</sup>. Notre stratégie serait d'obtenir rapidement des lignées homozygotes pour le transgène et déficientes pour la PrP.

D'un point de vue phénotypique, la lignée Chi3TAG13 semble être la plus intéressante pour les futures investigations. En effet, si les autres lignées se développent normalement, les souris Chi3TAG13 développent des signes cliniques apparentés à une ataxie cérébelleuse 150

jours après la naissance. De façon intéressante, cette ataxie se développe alors que les animaux sont sur un fond PrP<sup>+/+</sup>. Ces animaux sont en cours d'analyse plus approfondie pour l'expression tissulaire du transgène. Pour vérifier si cette ataxie peut être abolie par la co-expression plus importante de PrP<sup>c</sup>, les animaux ont été croisés avec des lignées Tga20, surexprimant la PrP.

Pour conclure sur cette partie, nous avons développé un outil transgénique permettant d'aborder plusieurs questions. Tout d'abord, ces animaux permettent de mieux cerner les mécanismes de conversion conformationnelle dans les EST. Pour conclure définitivement sur la possibilité d'obtenir un prion synthétique infectieux PrP/Dpl, nos premières données concernant la chimère 1 doivent être complétées par d'autres passages successifs, mais également par l'inoculation des nouvelles lignées de souris transgéniques qui présentent des niveaux d'expression plus importants. Aussi, l'utilisation d'outils de conversion *in vitro* (PMCA) nous permettra de tester différentes souches, et de détecter de faibles quantités de chimère résistante à la protéolyse.

Les constructions chimériques pourront également apporter des informations sur la fonction de la PrP<sup>c</sup>. Ici encore, les nouvelles lignées chimériques vont pouvoir nous indiquer si le domaine amino-terminal de la PrP, greffé à Dpl, est suffisant pour conserver la capacité anti-oxydante de la PrP. Finalement, de tels animaux pourront également permettre d'étudier les relations qui peuvent exister entre la PrP et Dpl, d'un point de vue fonctionnel, comme les interactions entre les deux protéines, mais aussi la signalisation cellulaire induite par l'expression de ces deux protéines dans le SNC. Les voies de signalisation impliquées dans la mort neuronale des animaux PrP déficients ataxiques sont mal connues. Si les souris de la lignée CHI3TAG13 développent un désordre ataxique similaire, leur analyse approfondie pourrait apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de ces mécanismes.

# CHAPITRE 5

-

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## 5) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux propriétés physico-chimiques et biochimiques de protéines chimériques, composées de la région non structurée amino-terminale de la PrP et du domaine C-terminal globulaire de Dpl. Nous avons cherché à créer un prion synthétique, qui posséderait les propriétés suivantes: 1) capable de mimer la conversion conformationnelle de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>; 2) infectieux; 3) capable de présenter des propriétés fonctionnelles et physiologiques similaires à celles de la PrP<sup>c</sup>.

### **La protéine chimérique PrP/Dpl : un nouveau prion ?**

L'approche *in vitro* nous a permis de montrer, par comparaison avec les propriétés de PrP recombinante, que les protéines chimériques forment en solution des agrégats ordonnés riches en feuillets  $\beta$  et résistants à la protéolyse ménagée. Ce résultat est la toute première démonstration que Dpl peut subir une conversion conformationnelle, comme la PrP. Les oligomères obtenus sont de masse moléculaire élevée, apparaissent sous forme de protofibrilles, et s'agrègent rapidement. Cependant et contrairement à la PrP, nous n'avons pas réussi à obtenir des oligomères de chimère de taille plus faible. Les trois protéines chimériques étudiées s'agrègent de façon similaire, ce qui semble indiquer que la variabilité dans la région N-terminale de PrP ajoutée à Dpl (acides aminés 1-125 ou 1-134) influence peu le processus d'oligomérisation. Il reste encore à vérifier que les oligomères chimériques sont capables, *in vitro*, de convertir la forme native  $\alpha$  hélicale de la chimère en une forme agrégée, de façon catalytique et sans l'aide de dénaturants chimiques : cette propriété est à l'origine même du concept des prions.

Il semble que ces oligomères produits *in vitro* ne sont pas infectieux, car ils n'induisent pas de dysfonctionnement neurologique transmissible lors d'une injection intra-cérébrale chez des souris transgéniques surexprimant la chimère. Dans l'approche *in vivo*, nous avons établi 11 lignées de souris transgéniques, et vérifié l'expression des trois protéines chimériques dans le cerveau de ces animaux. Toutefois, à ce stade du travail, nous ne pouvons pas conclure sur la capacité des protéines chimériques à être converties *in vivo* en un isoforme infectieux ou à mimer les fonctions de la PrP<sup>c</sup>. Les faibles rendements d'expression dans les premières lignées de souris constituent un frein évident au phénomène de conversion et à l'étude de la fonction de la PrP. Aussi, l'analyse et l'inoculation de nouvelles lignées, qui présentent un nombre de copies des transgènes chimériques plus important, ainsi que l'utilisation d'outils

d'agrégation *ex vivo* (PMCA), nous permettront de déterminer si les chimères peuvent se comporter comme des prions synthétiques.

### **C1q, un partenaire particulier de la PrP<sup>Sc</sup>**

Les oligomères de chimères diffèrent également de ceux de la PrP. Nous avons pu montrer que la protéine C1q du complément se fixait de préférence sur des oligomères de petite taille (8-15 mers de PrP), et ne fixait que faiblement les agrégats plus importants comme les fibres amyloïdes. Ce résultat met en avant l'importance des espèces oligomériques intermédiaires dans la pathogénicité de la PrP<sup>Sc</sup>. Ces oligomères présentent des propriétés bien distinctes (toxicité, interactions avec des partenaires protéiques, structure), ce qui ouvre de nouvelles voies pour comprendre les mécanismes de toxicité et de mort neuronal au cours de la pathologie des EST. L'un des résultats des plus inattendus reste sans doute la capacité de C1q à interagir de manière coopérative avec la PrP au cours de son agrégation et à promouvoir ce processus. La validité de ce modèle *in vitro* devra être testé chez l'animal. C1q est-il un catalyseur du mécanisme de conversion conformationnelle ? Peut-on trouver des complexes PrP<sup>Sc</sup>-C1q *in vivo* ? Ces questions sont en cours d'étude au laboratoire. Finalement, l'étude de cette propriété de C1q pourra également être envisagée dans d'autres modèles d'amyloïdoses.

En outre, la découverte des oligomères II comme partenaires préférentiels de C1q ouvre de nouvelles perspectives pour cerner les mécanismes structurels de l'activation de la voie classique du complément. En effet, les oligomères II de PrP sont de bons candidats pour la cristallisation d'une molécule de C1q attachée à son ligand, complexe qui n'a jamais été déterminé.

### **Prions et informations codées dans une conformation**

Si notre approche a consisté à créer un prion synthétique *de novo*, de récents exemples dans la littérature permettent de penser que la capacité des protéines à adopter des conformations transmissibles n'est plus restreinte aux seuls prions de mammifère et de levure (Toupet & Lehmann, 2009). Ainsi, Clavaguera et collègues ont montré que l'agrégation de la protéine Tau, responsable de d'inclusions intracellulaires filamenteuses dans la maladie d'Alzheimer, pouvait être transmise entre des lignées de souris transgéniques (Clavaguera et al, 2009). Les structures amyloïdes retrouvées dans les protéinopathies ont toutes une architecture commune, qui résulte de l'association en parallèle de plusieurs feuillets  $\beta$ . Si les différences conformationnelles qui existent entre les fibres amyloïdes sont encore mal connues, il est maintenant admis qu'une protéine peut donner, en s'agrégant, des fibres

présentant des ultrastructures différentes : on parle de polymorphisme des amyloïdes. Cette propriété pourrait être à l'origine des phénomènes de souches dans les maladies à prions. De plus, dans une récente étude, Wiltzius et collègues décrivent des structures en feuillets  $\beta$  très complémentaires appelés « Steric zippers » et capables de s'assembler de façon combinatoire en utilisant des forces de Van der Waals (Wiltzius et al, 2009). Ces structures pourraient ainsi être, notamment pour les prions, responsable des polymorphismes transmissibles observés.

### **La partie N-terminale de la PrP : un rôle encore mal compris**

Pour conclure, l'ensemble de nos données montre que la partie N-terminale de la PrP ne suffit pas à elle seule à transformer Dpl en un prion synthétique. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure cette région puisse intervenir dans des événements plus discrets au cours du mécanisme de conversion, tel que le dépliement partiel initial de la PrP, ou la formation du noyau de nucléation oligomérique stable au début du processus de formation des fibres amyloïdes.

# CHAPITRE 6

-

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## 6) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abid K, Soto C (2006) The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci* **63**(19-20): 2342-2351

Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008a) The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* **31**: 439-477

Aguzzi A, Heikenwalder M (2006) Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol* **4**(10): 765-775

Aguzzi A, Polymenidou M (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* **116**(2): 313-327

Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M (2008b) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol* **3**: 11-40

Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G, Darlix JL, Leblanc P (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* **100**(10): 603-615

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**(5090): 764-766

Alper T, Haig DA, Clarke MC (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**(3): 278-284

Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**: 199-225

Anguiano M, Nowak RJ, Lansbury PT, Jr. (2002) Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry* **41**(38): 11338-11343

Apetri AC, Surewicz WK (2002) Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *J Biol Chem* **277**(47): 44589-44592

Aruna B, Islam A, Ghosh S, Singh AK, Vijayalakshmi M, Ahmad F, Ehtesham NZ (2008) Biophysical Analyses of Human Resistin: Oligomer Formation Suggests Novel Biological Function. *Biochemistry*

Asante EA, Linehan JM, Gowland I, Joiner S, Fox K, Cooper S, Osiguwa O, Gorry M, Welch J, Houghton R, Desbruslais M, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J (2006) Dissociation of pathological and molecular phenotype of variant Creutzfeldt-Jakob disease in transgenic human prion protein 129 heterozygous mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10759-10764

Aucouturier P, Geissmann F, Damotte D, Saborio GP, Meeker HC, Kascak R, Carp RI, Wisniewski T (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest* **108**(5): 703-708

Bailly Y, Haerberle AM, Blanquet-Grossard F, Chasserot-Golaz S, Grant N, Schulze T, Bombarde G, Grassi J, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C (2004) Prion protein (PrP<sup>c</sup>) 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): 244-269

Baldauf E, Beekes M, Diringer H (1997) Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* **78** ( Pt 5): 1187-1197

Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, Fontes P, Aucouturier P, Hivroz C, Carnaud C (2006) Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol* **176**(12): 7254-7262

Barmada S, Piccardo P, Yamaguchi K, Ghetti B, Harris DA (2004) GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiol Dis* **16**(3): 527-537

Baskakov IV (2004) Autocatalytic conversion of recombinant prion proteins displays a species barrier. *J Biol Chem* **279**(9): 7671-7677

Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE (2002) Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem* **277**(24): 21140-21148

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**(3): 417-428

Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo J* **26**(2): 538-547

Baybutt H, Manson J (1997) Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene* **184**(1): 125-131

Beekes M, Baldauf E, Diringer H (1996) Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* **77** ( Pt 8): 1925-1934

Beekes M, McBride PA (2000) Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* **278**(3): 181-184

Behrens A, Brandner S, Genoud N, Aguzzi A (2001) Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. *EMBO Rep* **2**(4): 347-352

Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rulicke T, Janett F, Heppner FL, Ledermann B, Aguzzi A (2002) Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *Embo J* **21**(14): 3652-3658

Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**(1): 149-156

Beringue V, Mallinson G, Kaiser M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, Anstee D, Collinge J, Hawke S (2003) Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* **126**(Pt 9): 2065-2073

Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, Regli F, Rabinowicz T, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. (1977) Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* **1**(8009): 478-479

Blanquet-Grossard F, Thielens NM, Vendrely C, Jamin M, Arlaud GJ (2005) Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* **44**(11): 4349-4356

Blattler T, Brandner S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtlander T, Weissmann C, Aguzzi A (1997) PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* **389**(6646): 69-73

Bocharova OV, Breydo L, Parfenov AS, Salnikov VV, Baskakov IV (2005) In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J Mol Biol* **346**(2): 645-659

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**(4579): 1309-1311

Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276**(42): 39145-39149

Brown DR, Clive C, Haswell SJ (2001) Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* **76**(1): 69-76

Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* **67**(2): 211-224

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**(6661): 684-687

Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997b) Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci* **15**(8): 961-972

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997c) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**(1): 104-112

Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P (1987) The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* **37**(6): 895-904

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**(6650): 498-501

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**(7): 1339-1347

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**(6370): 577-582

Burthem J, Urban B, Pain A, Roberts DJ (2001) The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* **98**(13): 3733-3738

Capellari S, Cardone F, Notari S, Schinina ME, Maras B, Sita D, Baruzzi A, Pocchiari M, Parchi P (2005) Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene. *Neurology* **64**(5): 905-907

Cardone F, Pocchiari M (2001) A role for complement in transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med* **7**(4): 410-411

Carrell RW, Mushunje A, Zhou A (2008) Serpins show structural basis for oligomer toxicity and amyloid ubiquity. *FEBS Lett* **582**(17): 2537-2541

Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**(2): 195-206

Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**: 267-298

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* **63**(1): 175-181

Caughey B, Raymond GJ (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): 18217-18223

Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA (1998) Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* **273**(48): 32230-32235

Chabry J, Caughey B, Chesebro B (1998) Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* **273**(21): 13203-13207

Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* **270**(32): 19173-19180

Chesebro B (1998) BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science* **279**(5347): 42-43

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**(6017): 331-333

Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**(5727): 1435-1439

Chiesa R, Drisaldi B, Quaglio E, Migheli A, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA (2000) Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5574-5579

Chiesa R, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* **21**(6): 1339-1351

Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* **424**(6950): 805-808

Cho HJ (1976) Is the scrapie agent a virus? *Nature* **262**(5567): 411-412

Cisse MA, Sunyach C, Lefranc-Jullien S, Postina R, Vincent B, Checler F (2005) The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem* **280**(49): 40624-40631

Clarke MC, Haig DA (1971) Multiplication of scrapie agent in mouse spleen. *Res Vet Sci* **12**(2): 195-197

Clarke MC, Kimberlin RH (1984) Pathogenesis of mouse scrapie: distribution of agent in the pulp and stroma of infected spleens. *Vet Microbiol* **9**(3): 215-225

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* **11**(7): 909-913

Colling SB, Collinge J, Jefferys JG (1996) Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci Lett* **209**(1): 49-52

Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ (1991) Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **337**(8755): 1441-1442

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**(6602): 685-690

Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP (2006) Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**(9528): 2068-2074

Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**(6487): 295-297

Cordeiro Y, Kraineva J, Gomes MP, Lopes MH, Martins VR, Lima LM, Foguel D, Winter R, Silva JL (2005) The amino-terminal PrP domain is crucial to modulate prion misfolding and aggregation. *Biophys J* **89**(4): 2667-2676

Deleault NR, Geoghegan JC, Nishina K, Kasczak R, Williamson RA, Supattapone S (2005) Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* **280**(29): 26873-26879

Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, Pinson X, Gaudin C, Pietu G, Pitaval A, Ripoche H, Eloit M, Dormont D, Chouaib S (2004) Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res* **64**(2): 719-727

Dodelet VC, Cashman NR (1998) Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* **91**(5): 1556-1561

Dumestre-Perard C, Osmundson J, Lemaire-Vieille C, Thielens N, Grives A, Favier B, Csopaki F, Jamin M, Gagnon J, Cesbron JY (2007) Activation of classical pathway of complement cascade by soluble oligomers of prion. *Cell Microbiol* **9**(12): 2870-2879

Durig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmucker U, Bieschke J, Duhrsen U, Kretschmar HA (2000) Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br J Haematol* **108**(3): 488-495

Eghiaian F, Daubenfeld T, Quenet Y, van Audenhaege M, Bouin AP, van der Rest G, Grosclaude J, Rezaei H (2007) Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18): 7414-7419

Erlich P, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C, Curt A, Andrieu JP, Schoehn G, Jamin M, Gagnon J (2008) PrP N-terminal domain triggers PrP(Sc)-like aggregation of Dpl. *Biochem Biophys Res Commun* **365**(3): 478-483

Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Cause C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* **31**(4): 642-648

Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* **15**(6): 1255-1264

Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, Pasquali C, Abrami L, Bickel PE, Parton RG, van der Goot FG (2002) Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *Embo J* **21**(15): 3989-4000

Flechsig E, Shmerling D, Hegyi I, Raeber AJ, Fischer M, Cozzio A, von Mering C, Aguzzi A, Weissmann C (2000) Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* **27**(2): 399-408

Flores-Langarica A, Sebti Y, Mitchell DA, Sim RB, MacPherson GG (2009) Scrapie pathogenesis: the role of complement C1q in scrapie agent uptake by conventional dendritic cells. *J Immunol* **182**(3): 1305-1313

Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, Podevin-Dimster V, Lehmann S, Chauvin JP, Decavel JP, Varea R, Grassi J, Fontes M, Cesbron JY (2002) PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *J Virol* **76**(5): 2434-2439

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM (2002) Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **113**(1): 177-192

Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III* **318**(3): 339-344

Frankenfield KN, Powers ET, Kelly JW (2005) Influence of the N-terminal domain on the aggregation properties of the prion protein. *Protein Sci* **14**(8): 2154-2166

Fraser H, Dickinson AG (1970) Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature* **226**(5244): 462-463

Fraser H, Dickinson AG (1978) Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus. *J Comp Pathol* **88**(4): 563-573

Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6617-6621

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**(5025): 794-796

Gajdusek DC, 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): 974-978

Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**(839): 388-389

Glatzel M, Aguzzi A (2000) PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* **81**(Pt 11): 2813-2821

Glatzel M, Aguzzi A (2001) The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* **36**(2-3): 241-248

Glockshuber R (2001) Folding dynamics and energetics of recombinant prion proteins. *Adv Protein Chem* **57**: 83-105

Goldrath AW, Luckey CJ, Park R, Benoist C, Mathis D (2004) The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(48): 16885-16890

Groeneveld TW, Oroszlan M, Owens RT, Faber-Krol MC, Bakker AC, Arlaud GJ, McQuillan DJ, Kishore U, Daha MR, Roos A (2005) Interactions of the extracellular matrix proteoglycans decorin and biglycan with C1q and collectins. *J Immunol* **175**(7): 4715-4723

Gruschus JM (2008) Do amyloid oligomers act as traps for misfolded proteins? A hypothesis. *Amyloid* **15**(3): 160-165

Haik S, Faucheux BA, Sazdovitch V, Privat N, Kemeny JL, Perret-Liaudet A, Hauw JJ (2003) The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med* **9**(9): 1121-1123

Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT (1997) Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* **4**(2): 119-125

Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R (1993) Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* **32**(4): 1009-1016

Hart T, Hosszu LL, Trevitt CR, Jackson GS, Waltho JP, Collinge J, Clarke AR (2009) Folding kinetics of the human prion protein probed by temperature jump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(14): 5651-5656

Heckmann JG, Lang CJ, Petruch F, Druschky A, Erb C, Brown P, Neundorfer B (1997) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**(3): 388-390

Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**(5352): 827-834

Heggebo R, Gonzalez L, Press CM, Gunnes G, Espenes A, Jeffrey M (2003) Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* **84**(Pt 5): 1327-1338

Heikenwalder M, Zeller N, Seeger H, Prinz M, Klohn PC, Schwarz P, Ruddle NH, Weissmann C, Aguzzi A (2005) Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* **307**(5712): 1107-1110

Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP, Aguzzi A (2001) Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* **7**(9): 976-977

Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA (2001) Prion protein affects Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis* **8**(2): 324-330

Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10248-10253

Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J (1997) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* **349**(9045): 99-100



Holscher C, Delius H, Burkle A (1998) Overexpression of nonconvertible PrP<sup>c</sup> delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol* **72**(2): 1153-1159

Hope J, Reekie LJ, Hunter N, Multhaup G, Beyreuther K, White H, Scott AC, Stack MJ, Dawson M, Wells GA (1988) Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* **336**(6197): 390-392

Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H, Sato T (2000) Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* **55**(5): 718-721

Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**(9234): 999-1000

Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* **83**(Pt 1): 267-271

Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Brauer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A (2004) Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* **199**(3): 303-313

Hunter N (2007) Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 619-628

Hunter N, Houston F (2002) Can prion diseases be transmitted between individuals via blood transfusion: evidence from sheep experiments. *Dev Biol (Basel)* **108**: 93-98

Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* **283**(5409): 1935-1937

Jain S, Udgaonkar JB (2008) Evidence for stepwise formation of amyloid fibrils by the mouse prion protein. *J Mol Biol* **382**(5): 1228-1241

Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**(6): 1055-1058

Jeffrey M, McGovern G, Goodsir CM, Brown KL, Bruce ME (2000) Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol* **191**(3): 323-332

Jimenez-Huete A, Lievens PM, Vidal R, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Frangione B, 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): 1561-1572

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 CL, Favier A, Naquet P, Cesbron JY, Marche PN (2006) Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J Immunol* **176**(6): 3490-3497

Kimberlin RH, Walker CA (1986) Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol* **67** ( Pt 2): 255-263

Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* **65**(11): 6292-6295

Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota MJ, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, Fonseca Moreira JC (2001) Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* **30**(10): 1137-1144

Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A (1997) A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390**(6661): 687-690

Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, Weyd H, Xenarios I, Zinkernagel RM, Carroll MC, Verbeek JS, Botto M, Walport MJ, Molina H, Kalinke U, Acha-Orbea H, Aguzzi A (2001) Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* **7**(4): 488-492

Knight R (2006) Creutzfeldt-Jakob disease: a rare cause of dementia in elderly persons. *Clin Infect Dis* **43**(3): 340-346

Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**(6489): 471-474

Kovacs GG, Gasque P, Strobel T, Lindeck-Pozza E, Strohschneider M, Ironside JW, Budka H, Guentchev M (2004) Complement activation in human prion disease. *Neurobiol Dis* **15**(1): 21-28

Kovacs GG, Head MW, Hegyi I, Bunn TJ, Flicker H, Hainfellner JA, McCardle L, Laszlo L, Jarius C, Ironside JW, Budka H (2002) Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol* **12**(1): 1-11

Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van Duijn C, Collins SJ, Boyd A, Giulivi A, Coulthart M, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Zerr I, Kretzschmar HA, de Pedro-Cuesta J, Calero-Lara M, Glatzel M, Aguzzi A, Bishop M, Knight R, Belay G, Will R, Mitrova E (2005) Genetic prion disease: the EUROCDJ experience. *Hum Genet* **118**(2): 166-174

Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ (1986) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**(4): 315-324

Kubosaki A, Yusa S, Nasu Y, Nishimura T, Nakamura Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T (2001) Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **282**(1): 103-107

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**(6741): 225-226

Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1): 105-132

Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT, Jr. (2002) Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* **418**(6895): 291

Lasmezas CI, Cesbron JY, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Rioux R, Lemaire C, Loch C, Dormont D (1996) Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* **70**(2): 1292-1295

Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**(5298): 402-405

Lawson VA, Priola SA, Meade-White K, Lawson M, Chesebro B (2004) Flexible N-terminal region of prion protein influences conformation of protease-resistant prion protein isoforms associated with cross-species scrapie infection in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **279**(14): 13689-13695

Lawson VA, Priola SA, Wehrly K, Chesebro B (2001) N-terminal truncation of prion protein affects both formation and conformation of abnormal protease-resistant prion protein generated in vitro. *J Biol Chem* **276**(38): 35265-35271

Lehmann S, Milhavet O, 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 JP, Heinen E, Cesbron JY (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): 5422-5427

Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *Embo J* **26**(2): 548-558

Li R, Liu D, Zanusso G, Liu T, Fayen JD, Huang JH, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS (2001) The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol* **207**(1): 49-58

Li R, Liu T, Wong BS, Pan T, Morillas M, Swietnicki W, O'Rourke K, Gambetti P, Surewicz WK, Sy MS (2000) Identification of an epitope in the C terminus of normal prion protein whose expression is modulated by binding events in the N terminus. *J Mol Biol* **301**(3): 567-573

Liu T, Li R, Wong BS, Liu D, Pan T, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS (2001) Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J Immunol* **166**(6): 3733-3742

Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**(9407): 417-421

Lu K, Wang W, Xie Z, Wong BS, Li R, Petersen RB, Sy MS, Chen SG (2000) Expression and structural characterization of the recombinant human doppel protein. *Biochemistry* **39**(44): 13575-13583

Lund C, Olsen CM, Tveit H, Tranulis MA (2007) Characterization of the prion protein 3F4 epitope and its use as a molecular tag. *J Neurosci Methods* **165**(2): 183-190

Ma J, Lindquist S (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 14955-14960

Mabbott NA, Bruce ME (2002) Follicular dendritic cells as targets for intervention in transmissible spongiform encephalopathies. *Semin Immunol* **14**(4): 285-293

Mabbott NA, Bruce ME (2004) Complement component C5 is not involved in scrapie pathogenesis. *Immunobiology* **209**(7): 545-549

Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, Walport MJ, Pepys MB (2001) Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* **7**(4): 485-487

Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME (2000a) Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* **6**(7): 719-720

Mabbott NA, MacPherson GG (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4**(3): 201-211

Mabbott NA, Williams A, Farquhar CF, Pasparakis M, Kollias G, Bruce ME (2000b) Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol* **74**(7): 3338-3344

Mabbott NA, Young J, McConnell I, Bruce ME (2003) Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol* **77**(12): 6845-6854

MacGregor I, Hope J, Barnard G, Kirby L, Drummond O, Pepper D, Hornsey V, Barclay R, Bessos H, Turner M, Prowse C (1999) Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox Sang* **77**(2): 88-96

Mackay F, Browning JL (1998) Turning off follicular dendritic cells. *Nature* **395**(6697): 26-27

Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**(36): 33311-33318

Makarava N, Baskakov IV (2008) The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J Biol Chem*

Makrinou E, Collinge J, Antoniou M (2002) Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mamm Genome* **13**(12): 696-703

Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG (1980) The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* **53**: 29-59

Mange A, Beranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S (2004) Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* **96**(2): 125-132

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**(2-3): 121-127

Manson JC, Hope J, Clarke AR, Johnston A, Black C, MacLeod N (1995) PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* **4**(1): 113-114

Manuelidis L, Yu ZX, Banquero N, Mullins B (2007) Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Massimino ML, Ballarin C, Bertoli A, Casonato S, Genovesi S, Negro A, Sorgato MC (2004) Human Doppel and prion protein share common membrane microdomains and internalization pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(10): 2016-2031

Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. (1981) Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* **104**(3): 559-588

Mastrangelo P, Westaway D (2001) The prion gene complex encoding PrP(C) and Doppel: insights from mutational analysis. *Gene* **275**(1): 1-18

McBride PA, Beekes M (1999) Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* **265**(2): 135-138

McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**(1): 57-62

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2310-2314

Milhavet O, Lehmann S (2002) Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* **38**(3): 328-339

Milhavet O, McMahon HE, Rachidi W, Nishida N, Katamine S, Mange A, Arlotto M, Casanova D, Riondel J, Favier A, Lehmann S (2000) Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13937-13942

Miller MW, Williams ES (2004) Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol* **284**: 193-214

Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou WQ, Mishra R, Li R, Chen SG, Gambetti P, Fujioka H, Singh N (2004) Protease-resistant human prion protein and ferritin are

cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci* **24**(50): 11280-11290

Mitchell DA, Kirby L, Paulin SM, Villiers CL, Sim RB (2007) Prion protein activates and fixes complement directly via the classical pathway: implications for the mechanism of scrapie agent propagation in lymphoid tissue. *Mol Immunol* **44**(11): 2997-3004

Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ (2001) Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2352-2357

Mohan J, Hopkins J, Mabbott NA (2005) Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure. *Immunology* **116**(1): 122-133

Mohri S, Handa S, Tateishi J (1987) Lack of effect of thymus and spleen on the incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Gen Virol* **68 ( Pt 4)**: 1187-1189

Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E (2003) Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* **2**(3): 167-176

Montrasio F, Cozzio A, Flechsig E, Rossi D, Klein MA, Rulicke T, Raeber AJ, Vosshenrich CA, Proft J, Aguzzi A, Weissmann C (2001) B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 4034-4037

Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A, Weissmann C (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**(5469): 1257-1259

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* **292**(4): 797-817

Muramoto T, DeArmond SJ, Scott M, Telling GC, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. *Nat Med* **3**(7): 750-755

Nagyova J, Pastorek J, Kopacek J (2004) Identification of the critical cis-acting elements in the promoter of the mouse Prnd gene coding for Doppel protein. *Biochim Biophys Acta* **1679**(3): 288-293

Nandi PK, Leclerc E, Marc D (2002) Unusual property of prion protein unfolding in neutral salt solution. *Biochemistry* **41**(36): 11017-11024

Narang H (2002) A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**(1): 4-19

Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, Erpel SP, Nakaoka R, Atarashi R, Houtani T, Torchia M, Sakaguchi S, DeArmond SJ, Prusiner SB,

Katamine S (1999) A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**(6): 689-697

O'Rourke KI, Huff TP, Leathers CW, Robinson MM, Gorham JR (1994) SCID mouse spleen does not support scrapie agent replication. *J Gen Virol* **75** ( Pt 6): 1511-1514

Oesch B, Westaway D, Prusiner SB (1991) Prion protein genes: evolutionary and functional aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**: 109-124

Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**(6333): 340-342

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 10962-10966

Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A, Raeber AJ (2001) Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *J Biol Chem* **276**(48): 44627-44632

Parkin ET, Watt NT, Turner AJ, Hooper NM (2004) Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein. *J Biol Chem* **279**(12): 11170-11178

Pauly PC, Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**(50): 33107-33110

Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**(9433): 527-529

Peoc'h K, Guerin C, Brandel JP, Launay JM, Laplanche JL (2000) First report of polymorphisms in the prion-like protein gene (PRND): implications for human prion diseases. *Neurosci Lett* **286**(2): 144-148

Peoc'h K, Serres C, Frobert Y, Martin C, Lehmann S, Chasseigneaux S, Sazdovitch V, Grassi J, Jouannet P, Launay JM, Laplanche JL (2002) The human "prion-like" protein Doppel is expressed in both Sertoli cells and spermatozoa. *J Biol Chem* **277**(45): 43071-43078

Peoc'h K, Volland H, De Gassart A, Beaudry P, Sazdovitch V, Sorgato MC, Creminon C, Laplanche JL, Lehmann S (2003) Prion-like protein Doppel expression is not modified in scrapie-infected cells and in the brains of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *FEBS Lett* **536**(1-3): 61-65

Perini F, Frangione B, Prelli F (1996) Prion protein released by platelets. *Lancet* **347**(9015): 1635-1636

Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* **162**(4): 703-717

Politopoulou G, Seebach JD, Schmutz M, Schwarz HP, Aguzzi A (2000) Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. *Haematologica* **85**(6): 580-587

Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J Neurochem* **88**(4): 769-781

Premzl M, Gready JE, Jermin LS, Simonic T, Marshall Graves JA (2004) Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins--clues from comparative genomic analysis. *Mol Biol Evol* **21**(12): 2210-2231

Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simonic T, Gready JE (2003) Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene* **314**: 89-102

Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, Fu YX, Lipp M, Aguzzi A (2003) Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* **425**(6961): 957-962

Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi A (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 919-924

Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**(4542): 136-144

Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13363-13383

Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, Burton D, Yang SL, DeArmond SJ (1993) Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10608-10612

Qin K, Yang DS, Yang Y, Chishti MA, Meng LJ, Kretschmar HA, Yip CM, Fraser PE, Westaway D (2000) Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. *J Biol Chem* **275**(25): 19121-19131

Race R, Oldstone M, Chesebro B (2000) Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* **74**(2): 828-833

Radovanovic I, Braun N, Giger OT, Mertz K, Miele G, Prinz M, Navarro B, Aguzzi A (2005) Truncated prion protein and Doppel are myelinotoxic in the absence of oligodendrocytic PrPC. *J Neurosci* **25**(19): 4879-4888

Rezaei H, Eghiaian F, Perez J, Doublet B, Choiset Y, Haertle T, Grosclaude J (2005) Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *J Mol Biol* **347**(3): 665-679



Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**(6587): 180-182

Robakis NK, Sawh PR, Wolfe GC, Rubenstein R, Carp RI, Innis MA (1986) Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6377-6381

Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF, McNicol A (2006) Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* **107**(10): 3907-3911

Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *Embo J* **20**(4): 694-702

Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**(6839): 810-813

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* **4**(10): 1157-1165

Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**(6574): 528-531

Sakudo A, Lee DC, Yoshimura E, Nagasaka S, Nitta K, Saeki K, Matsumoto Y, Lehmann S, Itohara S, Sakaguchi S, Onodera T (2004) Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4): 850-855

Sepelakova J, Takacova M, Pastorekova S, Kopacek J (2005) Involvement of upstream stimulatory factor in regulation of the mouse Prnd gene coding for Doppel protein. *Biochim Biophys Acta* **1731**(3): 209-214

Shaked Y, Hijazi N, Gabizon R (2002) Doppel and PrP(C) do not share the same membrane microenvironment. *FEBS Lett* **530**(1-3): 85-88

Shin T, Isas JM, Hsieh CL, Kaye R, Glabe CG, Langen R, Chen J (2008) Formation of soluble amyloid oligomers and amyloid fibrils by the multifunctional protein vitronectin. *Mol Neurodegener* **3**(1): 16

Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**(2): 203-214

Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **125**(6): 1239-1250

Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HI, Li H (2005) Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci* **25**(39): 8967-8977

Sigurdson CJ, Aguzzi A (2007) Chronic wasting disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 610-618

Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**(7056): 257-261

Silverman GL, Qin K, Moore RC, Yang Y, Mastrangelo P, Tremblay P, Prusiner SB, Cohen FE, Westaway D (2000) Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* **275**(35): 26834-26841

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-39

Sjoberg AP, Nystrom S, Hammarstrom P, Blom AM (2008) Native, amyloid fibrils and beta-oligomers of the C-terminal domain of human prion protein display differential activation of complement and bind C1q, factor H and C4b-binding protein directly. *Mol Immunol* **45**(11): 3213-3221

Sjoberg AP, Trouw LA, Blom AM (2009) Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* **30**(2): 83-90

Sorgjerd K, Klingstedt T, Lindgren M, Kagedal K, Hammarstrom P (2008) Prefibrillar transthyretin oligomers and cold stored native tetrameric transthyretin are cytotoxic in cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* **377**(4): 1072-1078

Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* **20**(2): 442-449

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**(2): 229-240

Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J* **22**(14): 3591-3601

Tagliavini F, Prelli F, Porro M, Salmona M, Bugiani O, Frangione B (1992) A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* **184**(3): 1398-1404

Thielen C, Melot F, Jolois O, Leclercq F, Tsunoda R, Frobert Y, Heinen E, Antoine N (2001) Isolation of bovine follicular dendritic cells allows the demonstration of a particular cellular prion protein. *Cell Tissue Res* **306**(1): 49-55

Tiveron MC, Nosten-Bertrand M, Jani H, Garnett D, Hirst EM, Grosveld F, Morris RJ (1994) The mode of anchorage to the cell surface determines both the function and the membrane location of Thy-1 glycoprotein. *J Cell Sci* **107** ( Pt 7): 1783-1796

Tobler I, Deboer T, Fischer M (1997) Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* **17**(5): 1869-1879

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**(6575): 639-642

Toupet K, Lehmann S (2009) [The information embedded into protein conformation: the mammalian prion protein is not the only one which "prionized"]. *Med Sci (Paris)* **25**(3): 307-310

Tranulis MA, Espenes A, Comincini S, Skretting G, Harbitz I (2001) The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression. *Mamm Genome* **12**(5): 376-379

Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, Dearmond SJ (2006) Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res*

Tsiroulnikov K, Rezaei H, Dalgarrondo M, Chobert JM, Grosclaude J, Haertle T (2006) Cu(II) induces small-size aggregates with amyloid characteristics in two alleles of recombinant ovine prion proteins. *Biochim Biophys Acta*

Tuzi NL, Gall E, Melton D, Manson JC (2002) Expression of doppel in the CNS of mice does not modulate transmissible spongiform encephalopathy disease. *J Gen Virol* **83**(Pt 3): 705-711

Uboldi C, Del Vecchio I, Foti MG, Azzalin A, Paulis M, Raimondi E, Vaccari G, Agrimi U, Di Guardo G, Comincini S, Ferretti L (2005) Prion-like Doppel gene (PRND) in the goat: genomic structure, cDNA, and polymorphisms. *Mamm Genome* **16**(12): 963-971

Vendrely C, Valadie H, Bednarova L, Cardin L, Padeloup M, Cappadoro J, Bednar J, Rinaudo M, Jamin M (2005) Assembly of the full-length recombinant mouse prion protein I. Formation of soluble oligomers. *Biochim Biophys Acta* **1724**(3): 355-366

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14945-14949

Wang L, Lashuel HA, Walz T, Colon W (2002) Murine apolipoprotein serum amyloid A in solution forms a hexamer containing a central channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15947-15952

Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, Sy MS, Yoong L, Young R, Mastrangelo P, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Mount HT, Schmitt-Ulms G, Westaway D (2007) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *Embo J* **26**(17): 4038-4050

Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: Diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 654-672

Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, Zerr I (2004) Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett* **372**(1-2): 146-150

Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**(5): 1296-1300

Weiss S, Proske D, Neumann M, Groschup MH, Kretzschmar HA, Famulok M, Winnacker EL (1997) RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* **71**(11): 8790-8797

Weissmann C (1996) PrP effects clarified. *Curr Biol* **6**(11): 1359

Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E (2002) Transmission of prions. *J Infect Dis* **186** Suppl 2: S157-165

White AR, Collins SJ, Maher F, Jobling MF, Stewart LR, Thyer JM, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R (1999) Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol* **155**(5): 1723-1730

Whyte SM, Sylvester ID, Martin SR, Gill AC, Wopfner F, Schatzl HM, Dodson GG, Bayley PM (2003) Stability and conformational properties of doppel, a prion-like protein, and its single-disulphide mutant. *Biochem J* **373**(Pt 2): 485-494

Wilesmith JW, Ryan JB, Hueston WD (1992) Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sci* **52**(3): 325-331

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**(9006): 921-925

Williamson RA, Peretz D, Smorodinsky N, Bastidas R, Serban H, Mehlhorn I, DeArmond SJ, Prusiner SB, Burton DR (1996) Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7279-7282

Wiltzius JJ, Landau M, Nelson R, Sawaya MR, Apostol MI, Goldschmidt L, Soriaga AB, Cascio D, Rajashankar K, Eisenberg D (2009) Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nat Struct Mol Biol*

Wong BS, Liu T, Li R, Pan T, Petersen RB, Smith MA, Gambetti P, Perry G, Manson JC, Brown DR, Sy MS (2001) Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* **76**(2): 565-572

Wong BS, Pan T, Liu T, Li R, Gambetti P, Sy MS (2000a) Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **273**(1): 136-139

Wong BS, Pan T, Liu T, Li R, Petersen RB, Jones IM, Gambetti P, Brown DR, Sy MS (2000b) Prion disease: A loss of antioxidant function? *Biochem Biophys Res Commun* **275**(2): 249-252

Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Hewitt P, Collinge J (2006) Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**(9552): 2061-2067

Wuthrich K, Riek R (2001) Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv Protein Chem* **57**: 55-82

Yadavalli R, Guttman RP, Seward T, Centers AP, Williamson RA, Telling GC (2004) Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrP<sup>Sc</sup> modulates scrapie prion propagation. *J Biol Chem* **279**(21): 21948-21956

Yang ZR, Thomson R, McNeil P, Esnouf RM (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **21**(16): 3369-3376

Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD (1993) Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* **80**(1): 34-39

Zabel MD, Heikenwalder M, Prinz M, Arrighi I, Schwarz P, Kranich J, von Teichman A, Haas KM, Zeller N, Tedder TF, Weis JH, Aguzzi A (2007) Stromal complement receptor CD21/35 facilitates lymphoid prion colonization and pathogenesis. *J Immunol* **179**(9): 6144-6152

Zahn R (2003) The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol* **334**(3): 477-488

Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1): 145-150

Zerovnik E (2009) The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *Bioessays* **31**(6): 597-599

Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, Lodish HF (2006) Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2184-2189