

## Synthèse en français

Les pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et les maladies à prion sont caractérisées par l'accumulation progressive d'agrégats protéiques dans des zones définies du cerveau. Dans chaque maladie, les agrégats sont dus au mauvais repliement d'une ou de plusieurs protéines spécifiques : l'amyloïde  $\beta$  et tau dans la maladie d'Alzheimer,  $\alpha$ -synuclein dans la maladie de Parkinson, huntingtin dans la maladie de Huntington et la protéine du prion (PrP) dans la maladie du prion (revu dans Ross et Poirier, 2004). Bien que ces protéines soient très diverses dans leur séquence primaire, elles partagent toutes la même propriété : elles sont solubles et bénignes pendant des dizaines d'années mais se replient de façon anormale et s'assemblent en dépôts pseudo-amyloïdes dans les neurones vieillissants. Selon la pathologie incriminée, les dépôts peuvent être intranucléaires (huntingtin), cytoplasmiques ( $\alpha$ -synuclein) ou extracellulaire (amyloïde  $\beta$ ) mais ils sont en commun une structure tertiaire similaire, l'amyloïde, qui consiste en des arrangements ordonnés de feuillets beta (Luhers et collaborateurs, 2005 ; Sunde et collaborateurs, 1997). Par conséquent, il semble qu'il y ait d'importantes similarités entre les structures moléculaires des maladies liées aux amyloïdes.

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (TSE) également connues sous le nom de maladies du prion sont des maladies neurodégénératives fatales présentes autant chez l'homme que chez l'animal et qui peuvent survenir génétiquement de manière transmissible, spontanément, ou par infection (Prusiner 1998).

Parmi les maladies neurodégénératives, les maladies du prion sont uniques car elles sont infectieuses, la transmission de la pathologie survient donc entre individus et entre espèces (Aguzzi et Calella, 2009). Il est à présent largement accepté que l'agent infectieux est formé d'agrégats protéiques appelées 'prions' (de « particules de protéines infectieuses ») qui proviennent d'une modification de la structure d'une protéine endogène, la protéine cellulaire (PrPC) en sa forme pathologique, la PrPSc ou Protéine Prion Scrapie (Prusiner 1998). Une preuve importante de cette théorie a été apportée par l'étude de Weissmann et collaborateurs, montrant que les souris dont la PrPC est invalidée sont totalement résistantes à l'infection par le prion (Bueler et collaborateurs, 1992). Les maladies du prion héréditaires dérivant de mutations dans le gène de la protéine du prion (PRNP) se déclarent généralement plus précocement que les formes sporadiques, et sont liées à un phénotype plus sévère que celles-ci (Aguzzi et Calella, 2009).

La PrPC est une glycoprotéine omniprésente exprimée précocement dans l'embryogénèse. Elle est aussi fortement exprimée dans le système nerveux central de l'adulte, particulièrement dans les neurones mais aussi dans les cellules gliales et dans les cellules immunes (Manson et collaborateurs 1992 ; Harris et collaborateurs 1993 ; Moser et collaborateurs 1995 ; Ford et collaborateurs 2002). La PrPC est normalement localisée dans la couche extracellulaire de la membrane plasmique où elle s'associe des radeaux lipidiques enrichis en cholestérol. La PrPSc est par contre insoluble dans les détergents non ioniques et elle est partiellement résistante au clivage protéolytique.

En effet, le traitement à la protéinase K supprime un fragment d'environ 12 kDa de la partie N terminal de la PrP<sup>Sc</sup> (Parchi et collaborateurs, 1996) laissant un noyau résistant à la protéase, et contenant l'infectivité (Cronier et collaborateurs, 2008). Ce fragment protéique correspond à la PrP<sup>res</sup>, ou PrP<sup>27-30</sup>, et est défini ainsi du fait de la taille apparente du monomère en Western Blots. La digestion limitée par la protéinase K est un bon outil de détection la PrP<sup>Sc</sup> car dans ces conditions la PrP<sup>C</sup> est totalement hydrolysée, ce qui permet de discriminer les deux formes. Des études par Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) et dichroïsme circulaire ont démontré que contrairement à la PrP<sup>C</sup> qui est principalement  $\alpha$ -hélicoïdale, la PrP<sup>Sc</sup> isolée de cerveaux de malades est hautement enrichie en feuillets- $\beta$  (45% comparé à 3% dans PrP<sup>C</sup>) (Grasset et collaborateurs, 1992 ; Pan et collaborateurs, 1993). En effet, la PrP<sup>Sc</sup> a une structure de fibrilles  $\beta$  croisées similaire à celle des fibrilles amyloïdes (Eanes and Glenner, 1968) (Wille et collaborateurs, 2009).

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (TSE) telles que la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la tremblante du mouton ou la maladie débilitante chronique peuvent être acquises par la consommation d'aliments contaminés. De nombreuses études ont démontré que l'infection par le prion débute principalement par l'ingestion de prions par les voies digestives ou par la scarification des gencives, de la peau ou de la conjonctive (Beekes and McBride, 2007).

Malgré le nombre de paramètres impliqués dans la propagation du prion, de par les données substantielles présentes dans la littérature (revue par Beeks et McBride (2007)), il est possible de suivre précisément la voie des agents TSE à travers le corps à des stades caractéristiques précis. Particulièrement : (A) l'accumulation de prions dans les tissus lymphoïdes; (B) la neuroinvasion, qui consiste en la propagation à partir des tissus lymphoïdes vers le système nerveux périphérique (PNS) ; (C) la dissémination dans le cerveau et dans la moelle épinière (système nerveux central, CNS)) et (D) la propagation centrifuge du CNS vers des zones périphériques telles que les muscles (Beekes et McBride, 2007).

Suite à l'exposition orale, les prions pénètrent dans l'organisme hôte à travers l'intestin avant d'envahir les tissus lymphoïdes drainants où a lieu la première amplification de la PrP<sup>Sc</sup> (Andréoletti et collaborateurs, 2000 ; Heggebo et collaborateurs, 2002 ; Aguzzi, 2003). Le mécanisme par lequel les prions se propagent de l'appareil digestif vers les tissus lymphoïdes n'est pas encore bien défini mais différents intervenants ont été identifiés. Un nombre important d'études ont montré que principalement GALT et, dans une moindre mesure, d'autres tissus lymphoïdes jouent un rôle pivot dans l'amplification des prions et agissent comme un pont vers le CNS (Aguzzi et Calella 2009). Un certain nombre d'études supposent une implication importante de FDCs (cellules folliculaires dendritiques), tels les composants GALT, dans la réplication du prion (Montrasio et collaborateurs, 2000 ; Mabbott et collaborateurs, 2003, 2000). Cependant, les mécanismes permettant aux prions de se répandre de l'appareil gastrointestinal vers les FDCs et des tissus lymphoïdes vers le système nerveux central sont encore méconnus (Mabbott et collaborateurs 2000 ; Montrasio et collaborateurs 2000 ; Mabbott et collaborateurs 2003). Les FDCs sont des cellules stromales différenciées non mobiles qui expriment de hauts niveaux de PrP<sup>C</sup> (Brown et collaborateurs, 1999). Elles résident dans les follicules et les centres germinaux et possèdent de fines extensions

dendritiques utilisés pour capter et retenir les antigènes à l'état natif (Imazeki et collaborateurs, 1992 ; Kapasi et collaborateurs, 1993 ; Shortman et Liu, 2002).

Mais comment des FDCs non mobiles peuvent permettre le passage de la PrPSc de la barrière intestinale vers les nerfs périphériques? L'absence de synapses neuroimmunes entre les FDCs résidents et les fibres nerveuses excluent un mécanisme de transfert direct du prion entre ces deux types cellulaires (Defaweux et collaborateurs, 2007 ; von Poser-Klein et collaborateurs, 2008 ; Prinz et collaborateurs, 2003). Les FDCs pourraient transmettre le prion à des cellules proximales ou à des terminaisons nerveuses par le relargage d'exosomes ou des vésicules de sécrétion (von Poser-Klein et collaborateurs, 2008 ; Prinz et collaborateurs, 2003). Alternativement, les cellules M et les cellules hématopoïétiques dendritiques mobiles (DCs) pourraient transmettre les prions de la barrière intestinale au FDCs et des FDCs aux terminaisons nerveuses (Mabbott et MacPherson, 2006). Les cellules M sont situées entre l'épithélium des villosités et l'épithélium des patches du Peyer associé aux follicules et sont spécialisées dans la transcytose de macromolécules et de particules. De ce fait, la PrPSc pourrait traverser l'épithélium de l'intestin via ce type particulier de cellules. Les cellules dendritiques sont situées sous les cellules M dans la poche intraépithéliale où elles peuvent assimiler des antigènes qui ont été transcytosés par les cellules M, puis les livrer aux organes lymphoïdes (Shortman et Liu, 2002). Alternativement, les DCs peuvent directement assimiler des antigènes du lumen intestinal en ouvrant les jonctions étroites de la barrière intestinale et y insérant leurs dendrites (Rescigno et collaborateurs, 2001), elles sont de ce fait spécialisées dans la capture d'antigènes de la périphérie. Huang et collaborateurs (2002) ont montré que les DCs sont en effet capables de transporter la PrPSc de l'intestin vers le tissu lymphoïde qui serait le siège de la réplication du prion. De même, des dépôts de PrPSc ont été détectés dans les DCs des patches de Peyer, dans les ganglions lymphatiques mésentériques et la rate, après une exposition orale aux prions (Defaweux et collaborateurs, 2005 ; Dorban et collaborateurs, 2007). De plus, chez les souris dépourvues de DCs, la neuroinvasion est partiellement affectée du fait que l'accumulation de PrPSc dans les tissus lymphoïdes n'a pas lieu après une infection périphérique par le prion (Aucouturier et collaborateur, 2001 ; Raymond et collaborateurs, 2007 ; Cordier-Dirikoc et Chabry, 2008). En outre, Les DCs peuvent transmettre les prions vers les cellules nerveuse à la fois par contact direct avec les fibres nerveuses (Defaweux et collaborateurs, 2005 ; Dorban et collaborateurs, 2007) ou bien encore par Nanotubes (TNTs) (voir ci-dessous) (Gousset et collaborateurs, 2009 ; Dorban et collaborateurs, 2007). En effet, Gousset et ses collaborateurs ont montré que les DCs dérivés de la moelle osseuse (BMDCs) étaient capables de transférer des prions à des neurones primaires en condition de co-culture. Ceci aboutit à une infection des cultures neuronales. Les auteurs ont également montré que dans ces co-cultures, les BMDCs étaient en contact avec les neurones par des structures ressemblant aux TNTs (Gousset et collaborateurs, 2009).

La première partie de mon travail de thèse a permis une meilleure caractérisation du rôle et des mécanismes de transfert du prion des BMDCs aux neurones primaires. Ce travail s'est fait en collaboration avec le Dr Langevin (ancien post-doc dans le laboratoire du dr Zurzolo) et s'est terminé par une publication (Langevin et collaborateurs, 2010) qui est décrite en annexe à la fin de la session « Results 1 » de ma thèse.

Les TNTs ont été récemment identifiés comme une nouvelle forme de communication de cellule à cellule (Rustom et collaborateurs, 2004). Ils ont tout d'abord été décrits dans des cultures de cellules neuronales PC12, comme de longs et étroits ponts d'actine qui ne sont pas en contact avec le substratum et s'étendent jusqu'à 100µm en longueur avec un diamètre allant de 50 à 200 nm (Rustom et collaborateurs, 2004). Depuis, les TNT ont été trouvés dans plusieurs types cellulaires, des cellules neuronales et primaires aux cellules immunes et épithéliales en culture, agissant comme des conduits pour les échanges de molécules d'origine cytosolique ou membranaire, d'organelles, ainsi que pour la propagation de pathogènes (Abounit et Zurzolo, 2012 ; Marzo et collaborateurs, 2012). Récemment Wang et collaborateurs (2011) ont montré que des structures ressemblant aux TNTs se forment entre astrocytes primaires et neurones de rat. Deux mécanismes potentiels de formation des TNT ont été décrits : i) formation de novo via l'actine à partir de protrusions ressemblant aux filopodes (dans la majorité des cas) et ii) formation après délogement de cellules précédemment en contact (7% des cas) (Rustom et collaborateurs, 2004 ; Bukoretshliev et collaborateurs, 2009 ; Abounit et Zurzolo, 2012). La majorité des TNTs neuronaux se forment à partir de structures ressemblant aux filopodes détachées du substratum alors que dans les cellules immunitaires, la formation des structures apparentées aux TNTs se fait principalement après détachement de cellules en contact (Davis et Sowinski, 2008). Les nanotubes ont démontré un fort degré d'hétérogénéité d'un point de vue fonctionnel et structurel. Différents composants semblent être sélectivement transférés via les TNTs par différents types cellulaires. Ceci inclut des signaux (signaux liés au calcium et signaux de mort), des organelles et des pathogènes (revues par Abounit et Zurzolo (2012) et Marzo et collaborateurs (2012)). Les nanotubes ont de plus été décrits dans certains cas comme étant des autoroutes pour le transfert de pathogènes, conduisant à la diffusion de l'infection. Le détournement de ces structures peut être précédé par l'induction de la formation des TNTs, comme il a été démontré pour les particules HIV, optimisant ainsi le transfert des pathogènes et leur dissémination. En particulier, il a été démontré que le virus HIV pouvait se propager au travers de TNTs dans des macrophages primaires en surfant sur la membrane (Eugenin et collaborateurs, 2009) soit en s'associant à des structures endosomales (Kadiu et Gendelman, 2011). Récemment notre laboratoire a démontré que les TNTs formés dans les cellules neuronales CAD pouvaient transférer la protéine cellulaire du prion PrPC ainsi que des particules infectieuses de prion rendues fluorescentes PrPSc (des prions exogènes) (Gousset et collaborateurs, 2009). De plus, comme mentionné ci-dessus, le transfert de particules infectieuses du prion via les TNTs est aussi observé entre les cellules dendritiques de moelle osseuse (BMDCs) et les neurones primaires (Gousset et collaborateurs, 2009). Toutes ces études suggèrent que les TNTs pourraient jouer un rôle critique *in vivo* dans la diffusion du prion dans le système nerveux central (CNS) et à la périphérie (Gousset et Zurzolo, 2009).

Récemment, Wang et ses collègues ont démontré que des protéines intracellulaires amyloïde  $\beta$  étaient capables de se diffuser rapidement de cellule à cellule via des structures apparentées aux TNTs, suggérant que les maladies du prion et d'autres maladies neurologiques pouvaient utiliser les TNTs comme mécanisme de diffusion intercellulaire. Si ces observations peuvent être étendues à Parkinson ou Huntington, elles pourraient ouvrir de nouvelles voies d'étude des maladies neurodégénératives et

pourraient conduire à de nouvelles stratégies pour les combattre. Ceci a été un des sujets d'étude de ma thèse (voir la partie « Results 2 » de ma thèse).

Bien que le défaut de repliement et l'agrégation des protéines sont des caractéristiques communes aux maladies neurodégénératives, le concept de diffusion de l'infectivité des agrégats dans le système nerveux central a été limité jusqu'à présent aux maladies du prion (Lee et collaborateurs, 2010 ; Brundin et collaborateurs, 2010). Le mécanisme moléculaire de l'infectivité du prion est sa capacité à s'auto propager via la conversion en PrP<sup>Sc</sup> de la PrP<sup>C</sup> endogène (Prusiner, 1998). A l'exception des amyloïdes AA qui se transmettent parmi les guépards via le féces (Zhang et collaborateurs, 2008), la diffusion inter-organisme de maladies basées sur un défaut de repliement protéique n'a été observée que pour la PrP (Guest et collaborateurs, 2011). Même si la plupart des maladies neurodégénératives ne sont pas transmises d'un individu à un autre comme de vrais prions, elles peuvent se propager suivant un mode analogue au prion dans un organisme isolé. En effet, des études récentes suggèrent que les mécanismes de transmission intercellulaire ressemblant à celui du prion peuvent être responsables de la propagation des protéines mal repliées dans des maladies neurodégénératives non dues au prion, impliquant à la fois des protéines sécrétées comme l'amyloïde  $\beta$  et des protéines cytosoliques comme tau, huntingtin et  $\alpha$ -synuclein. Ceci suggère l'existence d'un principe général pathogénique dans les protéinopathies neurodégénératives (Frost et Diamond, 2010, 2009). Ces découvertes troublent la distinction entre la transmissibilité et l'infectivité et donc entre le prion et les amyloïdes (Cushman et collaborateurs, 2010). La transmissibilité qui correspond à une transmission hôte à hôte reste à ce jour caractéristique des pathologies du prion tandis que l'infectivité semble être une propriété générale des amyloïdes (Moreno-Gonzales et Soto, 2011). Les agrégats protéiques anormalement repliés sont infectieux s'ils se propagent d'une cellule à une autre et dans les cellules réceptrices ils agissent comme une « graine » initiant la formation d'agrégats par recrutement des molécules correctement repliées ou d'oligomères de la même protéine (Brundin et collaborateurs, 2010). Le phénomène 'prion-like' dans d'autres maladies neurodégénératives peut être considéré à différents niveaux : (i) niveau tissulaire avec propagation progressive de la pathologie dans le tissu infecté ; (ii) niveau intercellulaire avec propagation des agrégats entre les cellules infectées et leurs voisines ; (iii) niveau moléculaire avec agrégation type graine et l'auto-propagation des agrégats.

La maladie de Huntington (HD) est une pathologie neurodégénératives fatale à transmission autosomale dominante. Elle progresse lentement au cours des années avec des symptômes apparaissant typiquement, mais pas toujours, entre 35 et 50 ans. La maladie de Huntington est causée par l'expansion d'une répétition CAG dans l'exon 1 du gène huntingtin qui induit une répétition de polyglutamines (polyQ) dans la partie N-terminal de la protéine codée. Les symptômes cliniques de la maladie peuvent être résumés dans la triade clinique HD et comportent des perturbations cognitives, et des anomalies des fonctions motrices et du comportement.

HD se caractérise par une perte massive des neurones GABAergic épineux moyens dans le striatum (noyau caudal et putamen) des ganglions basaux qui sont responsables des symptômes typiques de la maladie (Reiner et collaborateurs, 1998). Cependant, il est maintenant établi qu'une dégénération plus massive survient dans les

cerveaux malades et progresse d'une manière topologique prédictible incluant des structures corticales avant la survenue des symptômes cliniques. Dans les états les plus tardifs, le globus pallidus, thalamus, le noyau subthalamique, la substantia nigra, la matière blanche et le cerebellum sont fortement affectés (Vonsattel et DiFiglia, 1998). Plusieurs études resumées en détail par Zuccato et collaborateurs (Zuccato et collaborateurs, 2010) montrent que la huntingtin a une variété de fonctions cellulaires qui sont diminuées et dérégées en présence de la protéine mutante. La signature pathologique de l'HD est la formation d'agrégats intracellulaires de huntingtin mutante appelés inclusion bodies (IBs). Ils surviennent à la fois dans le noyau et le cytoplasme des neurones infectés et montrent une immunoréactivité à l'ubiquitine (Davies et collaborateurs, 1997).

Comme mentionné ci-dessus, le concept de la propagation et de l'infectivité d'agrégats protéiques dans le système nerveux central a été récemment étendu au-delà des maladies du prion. Cependant, le fait que la propagation des agrégats protéiques soit liée à la neurotoxicité n'est pas encore clairement défini (Brundin et collaborateurs, 2010 ; Lee et collaborateurs, 2010). Dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et les pathologies du prion, la neurodégénérescence affecte des régions distinctes du cerveau reflétant une vulnérabilité de neurones spécifiques à une maladie en particulier (Ellison et collaborateurs, 2004). Cependant, de toutes les maladies citées précédemment, la corrélation entre les régions du cerveau qui dégèrent et la présence de dépôts d'agrégats protéiques est faible (Lee et collaborateurs, 2010 ; Treusch et collaborateurs, 2009).

Les études dans des cerveaux de patients Huntington révèlent que la formation d'inclusion bodies (IBs) est dissociée de la vulnérabilité de différents types neuronaux et des régions affectées des cerveaux HD (Arrasate et Finkbeiner, 2005 ; Ross et Poirier, 2004). A l'inverse, la formation d'IBs peut être bénéfique pour la survie cellulaire. Des études menées dans le laboratoire de Steven Finkbeiner (Arrasate et Finkbeiner, 2005 ; Finkbeiner et collaborateurs, 2006) ont montré que les neurones contenant des agrégats survivaient bien plus longtemps que ceux qui n'en avaient pas. Dans la même étude, les auteurs ont démontré que la forme diffuse (soluble) de la huntingtin mutante (et pas des IBs) prédisait la mort neuronale. De plus, une baisse de la huntingtin mutante soluble a été observée au moment de la formation des IBs suggérant que les IBs pouvaient être une réponse cellulaire bénéfique qui réduit les niveaux de protéines pathologiques en les séquestrant dans des agrégats insolubles.

Des preuves récentes provenant de plusieurs études indépendantes avec différentes protéines sujettes à l'agrégation indiquent que les oligomères solubles pourraient être les espèces les plus toxiques dans le développement de la pathogénèse (revu dans Caughey et Lansbury, 2003 ; Glabe, 2006 ; Walsh et Selkoe, 2007). Les oligomères solubles sont de petits assemblages de protéines anormalement repliées qui sont présents dans la fraction soluble d'extraits de tissu. Ils incluent habituellement des structures allant du dimère au 24-mère (Glabe, 2006). Ceci corrobore l'hypothèse que la toxicité neuronale sélective est le résultat à la fois des mécanismes autonomes et non autonomes impliquant des espèces solubles plutôt que de gros agrégats. Des événements survenant indépendamment dans des cellules et / ou dus à la propagation intercellulaire d'oligomères toxiques pourraient provoquer un dysfonctionnement et des

dégâts dans d'autres types de cellules, en altérant les interactions intercellulaires. Ils résulteraient dans les patrons de neurodégénérescence qui caractériseraient une pathologie définie (Brundin et collaborateurs, 2010 ; Garden et Spada, 2012). Comprendre comment les espèces oligomériques solubles (et possiblement leur propagation intercellulaire) induisent la neurotoxicité puis la neurodégénérescence reste une question ouverte (Aguzzi et Falsig, 2012).

De récentes études ont démontré que la PrPC pourrait être un médiateur de toxicité des oligomères d'amyloïde  $\beta$  et d'autres conformères riches en feuillets  $\beta$ . En se comportant comme un récepteur pour les ligands solubles, la PrPC permet de relier les maladies à prions avec d'autres protéinopathies dues à des agrégats ( Biasini et collaborateurs, 2011 ; Bate et Williams, 2011 ; Resenberger et collaborateurs, 2011). Dans ce cadre, il est tentant de s'interroger sur l'existence d'un mécanisme commun de toxicité où la PrPC agirait comme un « détecteur de danger » (Barton et Caughey, 2011 ; Aguzzi et falsig, 2012) pour oligomères riches en feuillets  $\beta$ . De manière intéressante, la PrP<sup>Sc</sup> a besoin de la PrPC physiologique active sur la membrane cellulaire afin d'exercer sa toxicité (Harris et True, 2006). La PrPC a donc un rôle double dans la pathogénèse des maladies du prion par sa capacité à être nécessaire à la fois pour la formation de molécules PrP<sup>Sc</sup> et pour la neurodégénérescence induite par le prion. Il est possible que les formes oligomériques de plusieurs protéines neurotoxiques différentes puissent exercer leurs effets en bloquant, accroissant ou bouleversant la fonction normale de la PrPC comme le fait son homologue pathogénique, la PrP<sup>Sc</sup>. Donc, que ce soit l'A $\beta$  oligomérique, la PrP<sup>Sc</sup> ou tout autre agrégat pathogénique, leur interaction à la surface cellulaire avec la PrPC pourrait initier les signaux toxiques qui conduisent à la perte neuronale et/ou à un dysfonctionnement synaptique (Aguzzi et Falsig, 2012).

Malgré d'intenses recherches, de nombreuses questions relatives aux maladies neurodégénératives dépendantes ou non du prion demeurent sans réponses que ce soit en rapport avec le mécanisme de propagation d'agrégats protéiques ou celui de la toxicité. De plus, l'étude de ces aspects dans la biologie du prion pourrait apporter une meilleure compréhension des maladies neurodégénératives non relatives aux prions.

J'ai donc ciblé mon travail de thèse sur deux aspects majeurs qui sont l'étude du mécanisme de propagation et de toxicité dans la maladie du prion et d'Huntington.

Dans la première partie de ma thèse, menée en collaboration avec le Dr Langevin, j'ai étudié l'implication des cellules dendritiques (DCs- dentritic cells) lors de la propagation de l'infection du prion dans les cellules neuronales. Nous avons utilisé dans un premier temps la technique de l'immunofluorescence combinée à la reconstruction en trois dimensions afin de caractériser l'internalisation du prion par des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs - bone- marrow-derived DCs) au préalable infectées avec des homogénat de cerveau infecté avec la protéine PrP<sup>Sc</sup>. De 2 à 18 heures d'exposition au prion, le prion a été internalisé par les cellules. Durant cette période, nous avons observé un changement de localisation de la PrP<sup>Sc</sup> de la membrane plasmique vers le cytosol. L'internalisation a été suivie par une progressive dégradation des agrégats de prion préalablement internalisés, résultant en une absence du signal PrP<sup>Sc</sup> entre 96 et 168 heures post- exposition. Des expériences similaires

réalisées avec des BMDCs provenant de souris KO (knockout) ou surexprimant PrP (tga20) indiquent que l'internalisation ainsi que le catabolisme de PrPSc sont indépendants de l'expression de PrPc dans ces cellules. Ensuite, en adoptant une approche in vitro, nous avons caractérisé le transfert de PrPSc des BMDCs vers les neurones primaires ainsi que la l'infection consécutive. Il est intéressant de noter que le transfert de PrPSc repose sur des contacts intercellulaires. En effet, ces derniers ont été démontrés uniquement lorsque les BMDCs infectées au prion sont mis en culture avec neurones primaires du cervelet (CGN - cerebellar primary neurons). Par conséquent, les BMDCs retiennent le prion lorsqu'ils sont cultivés seuls et ne transfèrent pas de PrPSc lorsqu'ils sont cultivés en présence de CGNs tous deux séparés par un filtre. Le transfert n'a également pas lieu lorsque les CGNs sont cultivés en présence du milieu des BMDCs infectés. Ces observations permettent donc d'exclure l'implication de la sécrétion de PrPSc dans le milieu (e.g temps de co-culture minimum, faible BMDC/CGN ratios).

De plus, les BMDCs infectées et fixées ne sont pas capables de transmettre l'infection aux neurones suggérant par conséquent un transport actif des agrégats de prion. En outre, en utilisant des techniques de microscopie, nous avons pu montrer qu'après 18 heures de co-culture, les BMDCs étaient directement en contact avec les dendrites ou alors liées aux neurones via les TNTs. Sachant qu'après 18 heures de co-culture, les agrégats de PrPSc se trouvent dans le cytosol et non pas à la membrane plasmique, ces résultats suggèrent que le transfert se fait du cytosol vers les TNTs puisque qu'un transfert de la membrane plasmique vers la cellules avoisinante est peu probable. Il est important de noter qu'une étude parallèle et indépendante a démontré un transfert de prion via des structures semblables aux TNTs des BMDCs vers les cellules des ganglions de la racine dorsale tout en excluant la sécrétion de PrPSc (Dorban et al., 2010).

Par ailleurs, nous avons observé que la réplication du prion dans les cellules receveuses était détectable seulement dans des conditions normales de co-culture. En effet, la réplication n'a pas eu lieu lorsque les cellules étaient mises en co-culture en présence d'un filtre ou lorsque les cellules donneuses BMDCs étaient fixées à l'aldéhyde. Pour conclure, ces résultats suggèrent que les DCs pourraient jouer un rôle déterminant lors de la propagation du prion. De plus, notre système de co-culture pourrait permettre l'étude de la propagation du prion de la périphérie vers le système nerveux en utilisant différentes souches de prion favorisant ainsi la compréhension du phénomène de barrière d'espèces.

Dans le dernier volet de mon travail de thèse, j'ai analysé les effets de la PrPC sur l'expression et la toxicité de la protéine mutante Htt en utilisant des neurones primaires provenant de souris surexprimant la PrPC ou des souris dont la PrP est invalidée (respectivement, les souris tga 20 surexprimant l'allèle murin Prpna et les souris PrP0/0 (Zurich I)).

Nous avons exprimé les premiers 480 acides aminés de la protéine huntingtin, comportant respectivement 17Q (Htt sauvage) et 68Q (Htt mutante) associée à la protéine fluorescente verte (GFP) (respectivement GFP-Htt17Q et GFP-Htt68Q) dans des cultures primaires de neurones cérébelleux granulaires (CGNs) (cf matériels et méthodes).

Après fixation à différents intervalles de temps (de 72h à 140h post transfection), des images mosaïques ont été prises au hasard dans divers champs cellulaires par



microscopie à EPI fluorescence, afin de déterminer la présence d'agrégats dans l'ensemble du circuit neuronal. Le nombre de cellules contenant des agrégats a été quantifié manuellement, à l'aveugle, en discriminant les agrégats nucléaires des agrégats cytoplasmiques (position perinucléaire et/ou dans les neurites). Étonnamment, et à l'opposé des études antérieures portant sur des lignées neuronales en culture (Lee et collaborateurs, 2007), nous avons trouvé à 140h post transfection une augmentation conséquente du nombre d'agrégats cytoplasmiques dans les neurones surexprimant la PrPC (issus des souris tga 20) par rapport aux neurones issus de souris dont la PrP a été invalidée, alors que le nombre d'agrégats nucléaires ne variait pas de manière significative. Comme attendu, indépendamment de l'expression de la PrPC, la surexpression de GFP-Htt17Q dans les CGNs primaires conduit à un patron diffus de fluorescence sans agrégats détectables aux différents intervalles post transfection.

Ces résultats conduisent à deux interprétations possibles: soit la PrPC augmenterait le nombre d'agrégats cytosoliques par cellule (par exemple en augmentant leur formation) et/ou elle faciliterait le transfert intercellulaire d'agrégats polyQ. Nous avons mis au point un système de co-culture permettant d'évaluer le transfert intercellulaire d'agrégats polyQ de CGNs donneurs (transfectés avec GFP-Htt68Q) à CGNs accepteurs (exprimant la protéine "mCherry" cytosolique) (cf l'annexe 2 joint au manuscrit) en présence ou en absence de PrPC. Nous avons démontré qu'après 140h de co-culture, le pourcentage d'accepteurs contenant des agrégats est trois fois supérieur dans les cellules surexprimant la PrPC comparé aux cellules PrP KO (3.5 versus 0.5%). Ceci suggère une corrélation entre le transfert d'agrégats et le niveau d'expression de PrPC. Au cours de la suite de notre étude nos observations nous ont permis d'exclure un mécanisme de transfert par milieu de culture commun ou par un cycle de sécrétion suivie d'internalisation des agrégats GFP-Htt68Q. La PrPC favoriserait donc le contact intercellulaire, permettant ainsi le transfert d'agrégats. Du fait de nombreuses études récentes démontrant l'implication de la PrPC dans la toxicité des oligomères enrichis en feuillets  $\beta$  tels que les oligomères d'amyloïde  $\beta$  (Biasini et al., 2011; Bate and Williams, 2011; Resenberger et al. 2011), nous avons analysé le rôle de la PrPC dans la toxicité liée à la forme mutante de la Htt. Nous avons transfecté GFP-Htt68Q et GFP-Htt17Q dans des CGNs en culture issus de souris surexprimant la PrPC ou ayant ce même gène invalidé, et analysé l'activation du marqueur apoptotique caspase 3. Les cellules ont été fixées et hybridées avec un anticorps reconnaissant la forme clivée et donc active de la caspase3 à intervalles allant de 72 à 140h post transfection. De façon surprenante, nous avons trouvé qu'en présence élevée de PrPC la caspase 3 était activée non seulement dans les CGNs contenant des agrégats GFP-Htt68Q, mais aussi dans les cellules voisines non transfectées. A l'inverse, en absence de PrPC, la caspase 3 activée n'est détectée que dans les cellules transfectées avec GFP-Htt68Q et contenant des agrégats, et est absente des cellules voisines non transfectées. Nous avons aussi démontré que l'activation de la caspase 3 dans les neurones non transfectés requiert un contact intercellulaire. En effet, un milieu de culture partagé sans interaction intercellulaire entre donneurs transfectés avec GFP-Htt68Q et accepteurs transfectés avec la GFP ne suffit pas à induire une activation de la caspase 3. Ceci suggère que le transfert ne se fait pas par l'intermédiaire d'un facteur soluble et donc sécrété. De ce fait dans notre système, la PrPC n'est pas le récepteur de facteurs solubles ou d'agrégats présents dans le milieu extracellulaire, ce qui a été proposé dans le cas d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Le rôle

de la PrPC dans la toxicité de Htt est donc plus difficile à appréhender que dans d'autres maladies associées à la formation d'agrégats. En effet, une interaction directe de type ligand-récepteur a été proposée entre les oligomères  $\beta$ , ou les protéines à conformation  $\beta$ , et le domaine N terminal de la PrPC localisée à la surface cellulaire. Cette interaction conduirait à la transduction de signaux pro-apoptotiques mesurable par l'activation de la caspase 3 (Resenberg et al., 2011; Lauren et al., 2009; Chen et al., 2010). Nous avons montré qu'une telle interaction directe entre Htt polyQ et PrPc est peu envisageable, et que l'activation de la caspase 3 dans les neurones voisins non transfectés n'est pas due à des facteurs solubles bien qu'elle requiert la PrPC. Les formes solubles ainsi que les agrégats de Htt pouvant potentiellement être toxiques, il est tentant de spéculer que la PrPC pourrait aussi favoriser le transfert d'oligomères de PolyQ solubles et toxiques, entraînant l'activation de la caspase 3 dans les neurones receveurs malgré l'absence d'agrégats détectables. Nos observations sont également cohérentes avec le fait que l'activation de la caspase 3 a lieu en l'absence d'agrégation anormale de Htt dans les greffes de tissus striataux fœtaux chez les patients atteints de la maladie de Huntington (Cicchetti et collaborateurs, 2009), et le fait que des anomalies fonctionnelles dans les neurones cérébelleux (cellules de Purkinje) apparaissent à un stage précoce dans le modèle murin de la maladie de Huntington en absence d'agrégats visibles. Ils sont aussi en accordance avec plusieurs études démontrant une implication de la PrPC dans la toxicité de l'amyloïde  $\beta$  et d'autres protéines enrichies en feuillets  $\beta$ , bien que le mécanisme semble différent.

En conclusion, nos résultats concordent avec un nombre grandissant d'études démontrant que la forme soluble de la Htt pourrait être toxique dans des neurones vulnérables. Ceci indiquerait que la pathologie serait due à la fois à des mécanismes autonomes et non autonomes, ouvrant ainsi le champs à de nouvelles voies d'investigation et à de nouvelles approches thérapeutiques. Du fait des natures variées des agrégats protéiques toxiques, il est envisageable de considérer que le mécanisme d'action de la PrPC dans la maladie d'Huntington et dans les autres maladies neurodégénératives soit différent. Les études à venir permettront d'appréhender le rôle et le mécanisme d'action de la PrPC dans la mise en place des différents processus conduisant au dysfonctionnement neuronal et à la neurodégénérescence. Ceci permettra une meilleure compréhension des maladies dues à un mauvais repliement protéique; et ainsi donc à une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.