



**HAL**  
open science

## Mort neuronale et maladies à prions

Audrey Ragagnin

► **To cite this version:**

Audrey Ragagnin. Mort neuronale et maladies à prions. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ094 . tel-01261843

**HAL Id: tel-01261843**

**<https://theses.hal.science/tel-01261843>**

Submitted on 25 Jan 2016

**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.



**UNIVERSITE DE STRASBOURG**

**THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité Neurosciences

par

**Audrey RAGAGNIN**

## **MORT NEURONALE ET MALADIES A PRIONS**

Soutenue publiquement le 11 décembre 2014

devant la Commission d'Examen :

<b>Dr. Vincent Béringue</b>	Rapporteur externe
<b>Pr. Anne Lohof</b>	Rapporteur externe
<b>Dr. Benoit Schneider</b>	Examineur externe
<b>Dr. Philippe Isope</b>	Examineur interne
<b>Dr. Yannick Bailly</b>	Directeur de thèse
<b>Dr. Nancy Grant</b>	Co-directrice de thèse

# TABLE DES MATIERES

---

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>6</b>
<b>CHAPITRE I. Les maladies à prions .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Etiologie des maladies à prions .....</b>	<b>9</b>
<b>2. La protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup> .....</b>	<b>10</b>
2.1. Expression et distribution de PrP <sup>C</sup> .....	10
2.2. Structure et trafic de PrP <sup>C</sup> .....	11
2.3. Les souris déficientes en PrP <sup>C</sup> .....	13
2.3.1. Souris Zürich-I et Edinburg Prnp <sup>0/0</sup> .....	13
2.3.2. Les souris Nagasaki, RcM0 et Zürich-II.....	14
2.4. Les fonctions physiologiques de PrP <sup>C</sup> .....	15
2.4.1. PrP <sup>C</sup> et croissance neuritique.....	16
2.4.2. PrP <sup>C</sup> régule la plasticité synaptique .....	17
2.4.3. Propriétés anti-apoptotiques de PrP <sup>C</sup> .....	17
2.4.4. La voie de PI3K/Akt et l'homéostasie du cuivre .....	18
2.5. La protéine Doppel : paralogue de PrP <sup>C</sup> .....	18
2.5.1. Localisation cellulaire et fonctions physiologiques de Doppel .....	19
2.5.2. Interaction PrP <sup>C</sup> -Doppel .....	19
2.6. Shadoo .....	21
2.7. ZIP .....	21
<b>3. La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> .....</b>	<b>22</b>
3.1. La structure de PrP <sup>Sc</sup> .....	23
3.2. Les modèles de conversion de PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> .....	24
3.3. Les sites de conversion de PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> .....	25

3.4. Agrégation de PrP <sup>Sc</sup> .....	25
3.5. Notion de souches de prion.....	25
3.6. Neurotoxicité de PrP <sup>Sc</sup> .....	27
3.6.1. Déstabilisation des membranes plasmiques .....	27
3.6.2. Stress du réticulum endoplasmique.....	28
3.6.3. Variation de l'excitabilité du récepteur NMDA.....	28
<b>4. Neuroinvasion du système nerveux central par les prions.....</b>	<b>29</b>
4.1. De la périphérie au système nerveux central.....	29
4.2. Neuroinvasion cérébrale .....	30
<b>5. Anatomopathologie des maladies à prions dans le système nerveux central.....</b>	<b>31</b>
5.1. Amyloïdogénèse.....	32
5.2. Inflammation du système nerveux central .....	34
5.2.1. L'activation microgliale .....	35
5.2.2. Astroglie .....	36
5.3. Spongiose .....	37
5.4. Altération des systèmes de neurotransmission, atrophie dendritique et perte synaptique .....	38
5.4.1. Dégénérescence synaptique et perte des épines dendritiques.....	38
5.4.2. Régulation de la neurotransmission .....	39
5.5. Mort neuronale .....	40
5.6. Spécificité neuronale de la vulnérabilité aux prions.....	41
Chapitre I. Principaux points évoqués .....	42
<b>CHAPITRE II. Mécanismes de mort neuronale .....</b>	<b>43</b>
<b>1. L'apoptose : mort programmée de type I .....</b>	<b>43</b>
1.1. Les caspases .....	44
1.2. La voie apoptotique intrinsèque.....	46
1.2.1. L'apoptose mitochondriale.....	46
1.2.2. Le stress du réticulum endoplasmique .....	47
1.3. La voie apoptotique extrinsèque .....	48
<b>2. L'autophagie.....</b>	<b>51</b>
2.1. La voie autophagique .....	52

2.2. Autophagie et physiologie neuronale.....	55
2.2.1. Autophagie axonale et dendritique.....	56
2.2.2. Régulation de l'homéostasie neuronale .....	56
<b>3. Interactions entre apoptose et autophagie .....</b>	<b>58</b>
<b>4. Mécanismes de mort neuronale dans les maladies à prions.....</b>	<b>59</b>
4.1. Apoptose dans les maladies à prions.....	60
4.2. Un mécanisme apoptotique dépendant de TNFR1 dans les maladies à prions .....	61
4.3. Apoptose et stress du réticulum endoplasmique dans les maladies à prions .....	62
4.4. Apoptose chez les souris déficientes en protéine prion cellulaire .....	63
4.5. Autophagie dans les maladies à prions .....	64
4.6. Autophagie chez les souris déficientes en protéine prion cellulaire .....	65
Chapitre II. Principaux points évoqués .....	67
<b>CHAPITRE III. Le cervelet .....</b>	<b>68</b>
<b>1. Cytoarchitecture du cervelet .....</b>	<b>68</b>
1.1. Structure du cortex et circuit cérébelleux.....	69
1.2. La cellule de Purkinje, neurone central du circuit cérébelleux .....	69
1.3. La cellule granulaire, interneurone excitateur relai des fibres moussues .....	70
1.4. Les interneurones .....	71
<b>2. Compartimentation du cortex cérébelleux.....</b>	<b>73</b>
2.1. Compartimentation des afférences grimpantes : bandes longitudinales et microzones .....	73
2.2. Compartimentation des afférences moussues .....	74
2.3. Convergence des afférences grimpantes et moussues .....	76
2.4. La somatotopie des efférences .....	76
2.5. Les zébrines, marqueurs moléculaires de la compartimentation du cervelet .....	77
Chapitre III. Principaux points évoqués.....	79
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>80</b>
<b>CONTRIBUTIONS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>81</b>
<b>ETUDE I. Apoptose et autophagie_dans le cervelet des souris <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> déficientes en protéine prion .....</b>	<b>82</b>

<b>1. Autophagie dans les cellules de Purkinje des souris Ngsk <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> et <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> : <i>Bax</i><sup>-/-</sup> et ZH-I <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> : Approche ultrastructurale qualitative et quantitative <i>in situ</i>.....</b>	<b>83</b>
1.1. Les cellules de Purkinje des mutants Ngsk <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> et Ngsk <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> : <i>Bax</i> <sup>-/-</sup> sont le siège d'une autophagie anormale. ....	83
1.2. Le cervelet des souris Ngsk <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> contient plus de cellules de Purkinje « autophagiques » que le cervelet des souris Ngsk <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> : <i>Bax</i> <sup>-/-</sup> .....	84
<b>2. Mort neuronale dans le cervelet des souris déficientes en protéine prion Ngsk <i>Prnp</i><sup>0/0</sup>, NSE-Dpl <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> et ZH-I <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> : approche morphologique et biochimique en culture organotypique.....</b>	<b>88</b>
2.1. Déficit développemental des cellules de Purkinje Ngsk <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> , NSE-Dpl <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> et ZH-I <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> en culture organotypique.....	88
2.2. Les cellules de Purkinje <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> meurent au cours de la première semaine de culture. ....	91
2.3. Activation de l'apoptose et de l'autophagie dans les cultures organotypiques de cervelet des souris <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> Ngsk et ZH-I <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> .....	93
2.4. Inflammation dans les cultures organotypiques de cervelet.....	97
<b>3. Validation des cultures organotypiques de cervelet pour l'étude des effets neurodégénératifs des prions infectieux : approche expérimentale préliminaire.....</b>	<b>97</b>
Etude I. Résumé & conclusions .....	103

## **ETUDE II. Compartimentation anatomique de la pathogenèse des prions dans le cervelet de souris ..... 104**

<b>1. Topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> aux stades précliniques .....</b>	<b>105</b>
<b>2. Topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> aux stades cliniques.....</b>	<b>105</b>
<b>3. Topographie des dépôts de PrP<sup>6PB1</sup> aux stades cliniques .....</b>	<b>116</b>
<b>4. Comparaison des patrons d'accumulation de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 .....</b>	<b>116</b>
<b>5. La tremblante 22L provoque la mort des cellules de Purkinje dans le cervelet de souris .....</b>	<b>127</b>
<b>6. La tremblante 22L provoque l'apoptose des cellules de Purkinje du cervelet de souris.....</b>	<b>133</b>
<b>7. Les cellules de Purkinje EAAT4(+) sont plus sensibles à la neurotoxicité de 22L.....</b>	<b>133</b>
<b>8. Les cellules granulaires sont sensibles à la neurotoxicité de la tremblante 22L.....</b>	<b>135</b>
<b>9. Les interneurons de la couche moléculaire du cortex cérébelleux résistent à la neurotoxicité de la tremblante 22L.....</b>	<b>135</b>
<b>10. Signature lésionnelle de la tremblante 22L dans le cervelet de souris.....</b>	<b>138</b>
Etude II. Résumé & conclusions .....	141

## **ETUDE III. Effets pro-inflammatoires des prions dans le cervelet de souris ..... 142**

<b>1. Astrogliose réactive et activation microgliale dans le cervelet de souris infecté par 22L.....</b>	<b>143</b>
--	------------

<b>2. L'immunoréactivité de TNFR1 augmente dans le cortex cérébelleux des souris infectées par 22L</b>	145
<b>3. Localisation cellulaire de TNFR1 dans le cervelet de souris infectées par 22L</b>	146
Etude III. Résumé & conclusions	159
<b>DISCUSSION</b>	<b>160</b>
<b>Etude I. Apoptose et autophagie neuronales dans le cervelet des souris <i>Prnp</i><sup>0/0</sup> déficientes en protéine prion</b>	<b>161</b>
<b>1. Autophagie dans les cellules de Purkinje du double mutant <i>Ngsk Prnp</i><sup>0/0</sup> : <i>Bax</i><sup>-/-</sup></b>	<b>162</b>
1.1. L'activation de l'autophagie et son dérèglement semblent indépendants de BAX dans les cellules de Purkinje <i>Ngsk Prnp</i> <sup>0/0</sup>	162
1.2. Dpl semble être responsable de l'activation de l'autophagie dans les cellules de Purkinje <i>Ngsk Prnp</i> <sup>0/0</sup>	163
<b>2. Les cultures organotypiques de cervelet, un système pour l'étude des mécanismes neurodégénératifs induits par l'absence de PrP<sup>C</sup> et les prions</b>	<b>164</b>
2.1. L'absence de PrP <sup>C</sup> empêche un développement normal des cellules de Purkinje <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> en culture organotypique.	164
2.2. L'absence de PrP <sup>C</sup> semble être responsable de la mort des cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques de cervelet.	164
2.3. L'autophagie et l'apoptose sont activées dans les cultures organotypiques de cervelet déficients en protéine prion	165
2.4. Réaction microgliale et astrocytaire dans les cultures organotypiques de cervelet	167
2.5. Les cultures organotypiques de cervelet constituent un système <i>ex vivo</i> adéquat pour étudier les mécanismes neurodégénératifs induits par la tremblante adaptée à la souris	167
<b>Etude II. Compartimentation anatomique de la pathogenèse des prions dans le cervelet de souris</b>	<b>168</b>
<b>1. PrP<sup>22L</sup> précipite suivant un patron en bandes parasagittales dans le cortex cérébelleux</b>	<b>168</b>
<b>2. La topographie des bandes de dépôts de PrP<sup>22L</sup> est semblable à celle de l'expression d'EAAT4</b>	<b>169</b>
<b>3. PrP<sup>22L</sup> et perte neuronale coïncident topographiquement</b>	<b>170</b>
<b>4. Vulnérabilité différentielle des cellules de Purkinje dans le cervelet infecté par 22L</b>	<b>171</b>
<b>Etude III. Effets pro-inflammatoires des prions dans le cervelet de souris</b>	<b>173</b>
<b>1. Réponses gliales du cervelet aux prions 22L</b>	<b>173</b>
<b>2. TNFR1 augmente dans le cervelet infecté par 22L</b>	<b>174</b>
<b>3. TNFR1 est essentiellement localisé aux régions pérисynaptiques des filaments astrocytaires dans la couche moléculaire du cervelet de souris infectée par 22L</b>	<b>175</b>

**DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ..... 177**

**MATERIELS & METHODES ..... 180**

**1. Ethique en matière d'expérimentation animale..... 181**

**2. Animaux ..... 181**

**3. Microscopie électronique par transmission *in situ* dans le cervelet de souris ..... 182**

**4. Analyse quantitative des cellules de Purkinje autophagiques ..... 182**

**5. Cultures organotypiques de cervelet..... 183**

**6. Infection des cultures organotypiques de cervelet ..... 183**

**7. Immunohistofluorescence de CaBP dans les cultures organotypiques de cervelet ..... 183**

**8. Analyse quantitative et morphométrie des cellules de Purkinje en culture organotypique..... 184**

**9. Histoblot..... 184**

**10. Western blot..... 185**

**11. Microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques ..... 186**

    11.1. Microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques de cervelet *Prnp<sup>0/0</sup>* ..... 186

    11.2. Microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques de cervelet infectées par les prions..... 186

**12. Infection des souris par les prions ..... 187**

**13. Fixation et coupe du cervelet pour l'histologie et l'immunocytochimie..... 187**

**14. Trichrome de Masson..... 188**

**15. Immunohistochimie de PrP<sup>22L</sup> et PrP<sup>6PB1</sup> ..... 188**

**16. Double marquage immunohistochimique de PrP<sup>22L</sup> et d'un marqueur cellulaire dans le cervelet infecté par 22L ..... 188**

**17. Double marquage par immunohistochimie de TNFR1 et de PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet infecté par 22L..... 189**

**18. Double marquage immunohistochimique de TNFR1 et des marqueurs cellulaires dans le cervelet infecté par 22L ..... 190**

**19. Analyse quantitative des cellules de Purkinje dans le cervelet de souris infectées par 22L..... 190**

**20. Analyse quantitative des cellules granulaires dans le cervelet de souris infectées par 22L ..... 190**

**21. Analyse quantitative des interneurons dans le cervelet infecté par 22L ..... 191**

**22. Analyse quantitative des cellules microgliales activées dans le cervelet infecté par 22L..... 191**



23. Statistiques .....	191
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>192</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>232</b>
Communications (poster) .....	233
Communication orale .....	233
Publications.....	233
Publication 1 .....	234
Publication 2 .....	278

# REMERCIEMENTS

---

En premier lieu, je tiens à remercier les docteurs Vincent Béringue, Anne Lohof, Benoit Schneider et Philippe Isope pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à mon jury de thèse.

Je remercie Marie-France Bader, directrice de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives pour m'avoir accueillie au sein de l'institut et permis d'y réaliser ma thèse. Je remercie les Dr. Stéphane Gasman et Nicolas Vitale pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe Neurosécrétion et Sécrétion Neuroendocrine.

Je remercie mes directeurs de thèse, les Dr. Yannick Bailly et Nancy Grant pour avoir accepté de diriger ce travail. Vous m'avez guidé et exigé le meilleur de moi, tout en me laissant une part importante d'indépendance. Merci pour votre disponibilité, votre suivi et vos conseils.

Je remercie Anne-Marie Haeberle pour sa grande disponibilité et son humeur « chantante ». Merci pour son enseignement et sa contribution aux travaux de microscopie électronique par transmission. Merci aussi pour tous les goûters partagés.

Un grand merci à Guy Bombarde pour m'avoir appris les techniques de laboratoire et apporté son l'aide avec une patience infinie, aide sans laquelle je ne serais jamais arrivée aux résultats décrits ici.

Je remercie le Dr. Valérie Demais pour son enseignement des techniques de microscopie électronique par transmission, pour son aide pour les analyses quantitatives et pour le prêt de « Chouchou » pour les analyses quantitatives effectuées dans ce travail.

Je remercie les étudiants ayant participé, de près ou de loin, à ce travail, tout particulièrement Aurélie Guillemain, ma complice du laboratoire qui m'a aidé pour la réalisation des Western blot et des infections des cultures organotypiques par les prions. Je n'oublierai jamais nos bons moments au laboratoire L3, dans nos combinaisons de spationnautes. Je remercie les étudiants de master 2, Siaka Dolé pour sa contribution aux expériences sur les cultures organotypiques, Qili Wang et Anne-Sophie Wilding pour leur grand travail de microscopie électronique par transmission. Je remercie Stanislas Demuth, étudiant de master 1, pour son implication dans les expériences de marquage immunochimique de la microglie.

Je remercie le Dr. Sylvette Chasserot-Golaz pour ma formation et son aide en microscopie confocale.

Je remercie le Dr. Pascal Darbon pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner la physiologie neuronale aux étudiants de licence.

Je remercie Sophie Reibel, Nicolas Lethenet et Mohammed Banni pour la prise en charge des animaux au Chronobiotron.

Je remercie également mes collègues, doctorants en Neurosciences, pour tous les moments de détente que nous avons partagés. Merci pour leurs soutiens, leurs avis et pour les discussions scientifiques et personnelles que nous avons pu tenir. Un merci tout particulier à Carole Meirsman, Mathieu Fontenau, Frédérique Seibt, Salim Mégat, Anaïs Grangeray, Pauline Croisé, Edith Grosbellet, Elise Savier, Marion Gabel, Kévin Dorgans,

Sébastien Houy, David Chassard, Laetitia Wioland, Antoine Valera, Joseph Chaumont, Alexandre Zeitler, Virginie Gilson.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe du Département Neurosécrétion et Sécrétion Neuroendocrine pour leur accueil et pour l'ambiance de travail qu'ils créent au sein du laboratoire.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier ma famille et en particulier mes parents pour avoir toujours été présents dans les moments difficiles. Merci de m'avoir appuyée et encouragée dans mes choix au courant de mes études. Je remercie surtout mon compagnon, Nicolas Grabner qui m'a soutenu et encouragé, malgré toutes les épreuves, tout au long de cette période.

Enfin, je remercie évidemment mes ami(e)s qui m'ont accompagnée et soutenue, de près ou de loin, tout au long de ma thèse : Fran, Fluc, Adélaïde, Etienne, Greg, Angel, Andreas, Julie.

# ABREVIATIONS

---

## - A -

<b>A<math>\beta</math></b>	Peptide $\beta$ -amyloïde
<b>ADAM</b>	Adamalysines
<b>ANOVA</b>	Analyse de la variance
<b>APP</b>	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
<b>Apaf-1</b>	<i>Apoptosis Protease Activating Factor 1</i>
<b>Ask-1</b>	<i>Apoptosis-stimulated kinase 1</i>
<b>Atg</b>	<i>Autophagy-related gene</i>

## - B -

<b>BH</b>	<i>Bcl-Homology</i>
<b>Bid</b>	<i>BH3-interacting domain</i>

## - C -

<b>CaBP</b>	<i>Calcium binding protein</i>
<b>CAD</b>	<i>Caspase activated DNase</i>
<b>CARD</b>	<i>Caspase-Recruitment Domain</i>
<b>CGs</b>	Cellules granulaires
<b>CHOP</b>	<i>C/EBP homologous protein</i>
<b>cIAP</b>	<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>
<b>CMA</b>	<i>Chaperone-mediated autophagy</i>
<b>CPs</b>	Cellules de Purkinje

## - D -

<b>Dpl</b>	Doppel
<b>DY</b>	Souche de prion « <i>Drowsy</i> »

## - E -

<b>EAAT</b>	Transporteur du glutamate ( <i>Excitatory amino acid transporter</i> )
<b>EST</b>	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
<b>ESB</b>	Encéphalopathie Spongiforme Bovine

## - F -

<b>FADD</b>	FAD-associated protein with a Death Domain
<b>Fk</b>	Souche de tremblante Fukuoka-1

## - G -

<b>GABA</b>	<i>Gamma-acido-butyrac acid</i>
<b>GFAP</b>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<b>eGFP</b>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
<b>GPI</b>	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
<b>GSS</b>	Syndrome de Gerstmann-Sträussle-Scheinker
<b>GTP</b>	Guanosine tri-phosphate

## - H -

<b>HY</b>	Souche de tremblante « <i>Hyper</i> »
<b>Hsp</b>	<i>Heat shock protein</i>

## - I -

<b>i. c.</b>	Intra-cérébral
<b>i.cb.</b>	Intra-cérébelleux
<b>IFF</b>	Insomnie Fatale Familiale
<b>IL</b>	Interleukine
<b>i. p.</b>	Intra-péritonéal

## - J -

<b>JNK</b>	cJun N-terminal kinase
<b>jpi</b>	Jour post-infection

## - L -

<b>LAMP</b>	<i>Lysosomal-associated membrane protein-1</i> /
<b>LC3</b>	<i>Microtubule-associated light chain 3</i>
<b>LTP</b>	Potentialisation à long terme ( <i>Long term potentiation</i> )

## - M -

<b>MAPKKK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
<b>MCJ</b>	Maladie de Creutzfeld-Jacob
<b>MEKK1</b>	<i>Mitogen extracellular signal-regulated kinase kinase 1</i>
<b>MET</b>	Microscopie électronique par transmission
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

- N -

**Ngsk** Souris Nagasaki *Prnp*<sup>0/0</sup>  
**NMDA** N-Methyl-D-aspartate  
**NSE** *Neuron Specific Enolase*

- P -

**PA** Potentiel d'action  
**PAF** Paraformaldéhyde  
**pb** Paires de bases  
**PB** *Phosphate buffer*  
**PBS** *Phosphate buffer saline*  
**PE** Phosphatidyléthanolamine  
**PK** Protéinase K  
**PK** Protéinase K  
**PMCA** *Protein-Misfolding Cyclic Amplification*  
**PrnP** Gène codant la protéine prion cellulaire  
**Prnp**<sup>0/0</sup> Souris *knock-out* pour le gène *Prnp*  
**PrP<sup>C</sup>** Protéine Prion cellulaire  
**PrP<sup>Sc</sup>** Protéine Prion pathologique (Sc pour *Scrapie*)

- R -

**RE** Réticulum endoplasmique ; REL : lisse et  
REG : granuleux  
**recPrP** Protéine prion recombinante  
**RIP** *Receptor-interacting protein*  
**RML** *Rocky Mountain Laboratory* (souche de  
tremblante)  
**RMN** Résonance Magnétique Nucléaire

- S -

**SAF** *Scrapie associated Fibrils*  
**SNARE** *Sensitive factor attachment protein recepto*  
**SNC** Système nerveux central

- T -

**TACE** *Tumor necrosis factor ·-converting enzyme*  
**TBS** *Tris Buffered Saline*  
**TNF- $\alpha$**  *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*   
**TNFR1** *Tumor Necrosis Factor · Receptor 1*  
**TRADD** *TNFR-associated Death Domain*  
**TRAF2** *TNFR-associated factor 2*  
**TRAIL** *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

- U -

**ULK** *Unc-51-like kinase*  
**UV** Ultra-Violet

- Z -

**ZII(+)** Zébrine-II-positive  
**ZII(-)** Zébrine-II négative  
**ZH-I** Souris Zürich-I *Prnp*<sup>0/0</sup>

« De toutes les blessures corporelles, la démence est de loin la pire.  
Celui qui en est atteint ne sait plus le nom de ses esclaves, ne reconnaît  
plus l'ami avec qui il a dîné la veille, ni ceux qu'il a engendrés et élevés.  
Et par un cruel testament, il déshérite les siens et fait don de toutes ses  
propriétés à Phiale. »

JUVENAL,

*Satires* (trad. P. de Labriolle & F. Villeneuve).

Paris: Belles-Lettres (CUF), 1996 [*Satire X*, vers 232-238].

# **INTRODUCTION**

Une forme pathologique de la protéine prion cellulaire endogène (PrP<sup>C</sup>), la protéine prion infectieuse (PrP<sup>Sc</sup>) est considérée comme l'agent infectieux unique responsable des maladies à prions. Ainsi, à l'encontre du dogme de la transmission des agents infectieux par réplication des acides nucléiques, les maladies à prions semblent transmises par la seule conversion conformationnelle de la protéine prion cellulaire. Ce mécanisme aboutit à la formation d'oligomères neurotoxiques et de dépôts fibrillaires amyloïdes de PrP<sup>Sc</sup> dans le système nerveux central (SNC) entraînant la spongiose, la perte synaptique, l'atrophie dendritique et la mort neuronale accompagnées d'une réaction astrocytaire et microgliale. La neurotoxicité intrinsèque de PrP<sup>Sc</sup>, la perte des fonctions neuroprotectrices de PrP<sup>C</sup> et l'inflammation sont autant de mécanismes distincts qui peuvent conduire à la mort des neurones dans le SNC infecté par les prions. Si les recherches menées ces dernières années ont permis d'importantes avancées dans la compréhension de ces pathologies neurodégénératives, des questions cardinales restent encore sans réponse et concernent les mécanismes sous-jacents à la mort neuronale induite par les prions, la nature des paramètres endogènes de la spécificité cellulaire de l'atteinte neuronale dans le SNC et la part des mécanismes inflammatoires dans la neurotoxicité des prions.

Un premier axe de mes recherches doctorales a consisté à étudier les modalités de mort neuronale dans différents modèles de neurodégénérescence induite par les déficits d'origine transgénique et infectieuse de la protéine prion. J'ai limité mes études au cervelet de souris, un centre dont la structure simple est bien connue aux plans fonctionnels et structural et où les mécanismes de mort neuronale ont été des plus étudiés. Le cervelet est de plus une région centrale très vulnérable aux prions. J'ai utilisé à cet effet un panel d'approches morphologiques combinées à l'analyse immunochimique de marqueurs de mort neuronale et des types neuronaux spécifiques concernés. Cette étude m'a amenée à mettre en œuvre un système *ex vivo* de cultures organotypiques de tranches de cervelet qui s'est avéré présenter les avantages nécessaires à l'approche mécanistique des phénomènes dégénératifs induits par les déficits de la protéine prion.

Le deuxième axe de mes recherches a porté sur la signification physiopathologique du patron des dépôts de protéine prion amyloïde dans le cervelet infecté par la tremblante 22L. J'ai pu apporter des arguments convaincants en faveur de la contribution d'un paramètre endogène lié à la compartimentation anatomofonctionnelle du cortex cérébelleux à la pathogenèse de ces prions.

Le troisième axe de mes recherches est le prolongement d'une étude récente du groupe de Benoît Schneider et Odile Kellerman à laquelle nous avons collaboré et mettant en évidence la mise en jeu d'un mécanisme neuroinflammatoire capable de détruire les neurones infectés *in vitro* (Pietri et al., 2013). Cette étude montre en effet l'augmentation du récepteur TNFR1 à la cytokine TNF- $\alpha$  à la surface des neurones à la suite de l'abolition de la cascade enzymatique responsable de son recyclage et normalement contrôlée par la protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup> convertie en PrP<sup>Sc</sup> inactive dans les neurones infectés. J'ai poursuivi cette étude *in situ* dans le cervelet de souris infectées *in vivo* par la même souche de tremblante et mis en évidence l'augmentation de TNFR1 au niveau des filaments gliaux pérисynaptiques suggérant l'activation dans le tissu cérébelleux d'un mécanisme dépendant de TNFR1 différent de celui mis en jeu dans les neurones cérébelleux en culture primaire.

L'introduction bibliographique de ma thèse en trois parties parcourt l'essentiel de la physiopathologie des maladies à prions, présente une description détaillée des mécanismes de l'apoptose et de l'autophagie et l'implication de ces voies dans les maladies à prions et enfin présente le cervelet modèle de ces études. Mes résultats sont présentés en trois études sous le format de données non-publiées qui font enfin l'objet d'une discussion.



# CHAPITRE I

## Les maladies à prions

---

Les maladies à prions ou encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) sont des pathologies neurodégénératives qui affectent l'homme et l'animal. Elles incluent la maladie de Creutzfeld-Jacob, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnie fatale familiale (IFF) et le kuru chez l'homme, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), la tremblante du mouton (« *scrapie* »), l'EST féline et la maladie du dépérissement chronique chez les cervidés. Ce n'est qu'après une période d'incubation longue et cliniquement silencieuse pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années que les patients atteints d'EST développent les symptômes sévères de cette maladie incurable et fatale, dont les principales manifestations sont la dysfonction motrice progressive, le déclin cognitif et l'ataxie cérébelleuse (Thompson et al., 2014).

Les maladies à prions ont d'abord été considérées comme rares et seulement connues des vétérinaires et des spécialistes. La maladie de Creutzfeldt-Jakob qui n'affectait qu'1,5 cas par an et par million (Ladogana et al., 2005) ne constituait alors pas une cause médicale prioritaire. Cependant, les accidents de contamination par transmission iatrogène observés en pratique médicale humaine et animale, l'apparition de l'encéphalopathie bovine spongiforme en Grande Bretagne dans les années 1990, cause d'une crise alimentaire mondiale et la démonstration du passage de l'agent bovin à l'homme ont mis en avant l'importance des recherches fondamentales et cliniques sur ces maladies. Encore de nos jours, aucune thérapie ne permet de contrer de manière efficace les déficits observés et seuls des traitements palliatifs sont apportés aux patients.

La communauté scientifique a recherché l'agent responsable de ces maladies pendant des années. Contrairement aux agents infectieux conventionnels, l'infection ne provoque pas d'inflammation classique — une encéphalite aigüe et chronique provoquée par une réaction immunitaire spécifique — mais une encéphalopathie caractérisée par une dégénérescence lente et irréversible du système nerveux central (SNC). Comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington, les ESTs sont des pathologies neurodégénératives associées à la présence de dépôts et fibrilles amyloïdes. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort neuronale dans les maladies neurodégénératives liées à l'agrégation de protéines reste à ce jour un sujet majeur en matière de santé publique.

## 1. Etiologie des maladies à prions

Mentionnée pour la première fois en 1732 par des vétérinaires anglais (Parry, 1983), la tremblante est décrite comme affectant des brebis qui « *trottent du devant et galopent du derrière* », grincent des dents et montrent une exagération des mouvements de la tête et du cou (Hunter, 1993). Le premier rapport scientifique publié en 1788, est bientôt suivi par plusieurs publications qui en décrivent les symptômes — réflexes de léchage et de grattage, prurit, perte de poids, tremblements — et s'interrogent sur l'étiologie de cette maladie<sup>1</sup>. Le caractère transmissible de la tremblante est démontré par Cuillé & Chelle (1936) : l'inoculation de moutons sains avec des homogénats de moelle épinière de moutons contaminés par la tremblante leur transmet la maladie (Cuillé & Chelle, 1936). Ces auteurs suggèrent alors que la tremblante doit être causée par un virus. Les travaux pionniers du groupe de Wilson (1950) mettent en évidence certaines propriétés particulières de l'agent de la tremblante — sa forte résistance à la chaleur (100°C pendant 30 minutes), aux formaldéhydes, aux phénols et chloroforme (dénaturants des protéines !) et à de fortes doses de rayons ultra-violet (Wilson et al., 1950) —. Sigurdsson, un pathologiste islandais, propose de classer l'agent de la tremblante comme un « virus lent » car, selon lui, les symptômes de la tremblante ressemblent à ceux provoqués par le virus visna dont l'incubation est longue et cause une encéphalopathie et une pneumonie chez le mouton (Sigurdsson et al., 1954).

Le kuru<sup>2</sup>, une atteinte fatale du système nerveux central qui touche de façon endémique une tribu de Nouvelle-Guinée (les Fores) est découverte par Gadjusek & Zigas en 1957 et les similitudes cliniques et anatomo-pathologiques entre la tremblante et le kuru sont rapidement remarquées (Gadjusek & Zigas, 1957 ; Hadlow, 1959). L'observation des Fores présentant les symptômes d'encéphalopathie spongiforme par Gadjusek et *in fine* son expérience d'inoculation de tissus nerveux prélevés chez des patients décédés dans le cerveau de chimpanzés ont démontré le caractère transmissible de cette maladie (Gadjusek et al., 1966 ; prix Nobel de médecine en 1976). Aussi, la fin des rites cannibales chez cette population a permis le déclin de l'incidence de ces maladies, confirmant que la transmission du kuru se faisait par l'ingestion des tissus contaminés.

Différentes hypothèses sont alors émises pour expliquer la nature de l'agent de la tremblante, certaines lui conférant les propriétés d'un virus filamenteux, d'un rétrovirus, de toxines, de polysaccharides ou encore de viroïdes (ARN circulaire sans capsid).

Les capacités de résistance de l'agent de la tremblante aux rayonnements ionisants<sup>3</sup> et à l'irradiation ultra-violette (UV) suggèrent que l'agent infectieux ne peut être de nature virale (Alper et al., 1967). L'irradiation à différentes longueurs d'onde UV montre que l'agent résiste de manière équivalente à des longueurs d'onde de 280 et 250 nm, classiquement utilisées contre des micro-organismes contenant des acides nucléiques (Alper et al., 1967). Dans la littérature, la nature de l'agent est alors activement discutée. L'hypothèse élaborée par Dickinson et Outram (1979) puis reprise par Kimberlin et Wilesmith (1994) postule qu'un virino, un agent infectieux composé d'une protéine et d'un petit acide nucléique « nu », séquestré par la protéine hôte et codant des copies de lui-même, serait responsable de la maladie. Cette hypothèse permet d'expliquer l'existence de différentes souches de prion, les acides nucléiques étant capables de mutations et donc de variations

<sup>1</sup> En 1848, Roche-Lubin propose notamment que la tremblante pourrait être provoquée par l'activité sexuelle accrue des béliers ou éventuellement par les orages. M'Gowan suggère en 1914 l'implication du parasite *Sarcosporidium* comme agent infectieux. Enfin, la cause virale est postulée pour la première fois en 1899 par Besnoît.

<sup>2</sup> Le terme kuru signifie *frisson* en Fore.

<sup>3</sup> La dose de 25 000 Grays (Gy) n'est que très peu efficace contre l'agent de la tremblante (Gibbs et al., 1978 ; Latarjet, 1979). En comparaison, la dose inactivante du virus Herpès est de 100 Gy et de 5000 Gy pour le VIH (Spire et al., 1985 ; Henderson et al., 1992).

phénotypiques (Dickinson & Outram, 1979 ; Kimberlin & Wilesmith, 1994). De nombreuses techniques ont été mises en œuvre pour découvrir cet acide nucléique sans obtenir de preuve de son existence.

Pour la première fois, en 1967, l'agent infectieux est supposé être une protéine (Pattison & Jones, 1967) et la théorie de la « protéine-seule » postulée par Griffith (1967) est soutenue par différentes données. Aucun virus ni particule ressemblant à un virus n'ont pu être identifiés en microscopie électronique, bien qu'un agent infectieux de nature virale pourrait être trop petit pour être détecté. Le traitement par des RNases ou des DNases n'altère pas le caractère infectieux de l'agent (Prusiner, 1982). L'agent est au contraire sensible partiellement à la digestion par des protéases (Prusiner, 1979), suggérant qu'au moins une protéine le compose. De plus, des traitements à la chaleur : 160°C, voire 300°C pendant 1h, de même que la chaleur sèche (600°C), efficaces contre les micro-organismes, ne le sont pas contre l'agent de la tremblante (Dickinson & Taylor, 1978 ; Brown et al., 1990). Ces expériences ont mené Prusiner à créer le terme « prion » défini comme étant une petite particule protéique infectieuse (« *small proteinaceous infectious particles* ») pour désigner cet agent non-conventionnel qui résiste aux procédures d'inactivation modifiant d'ordinaire les acides nucléiques (Prusiner, 1982).

Une avancée majeure a été faite lors de la mise en évidence de l'existence de cette « petite particule ». En 1982, la purification de fractions de cerveau de hamsters infectés par la tremblante permet d'isoler l'agent de la tremblante : la protéine prion. La molécule la plus abondante retrouvée dans ces fractions de cerveau est en effet une protéine résistante aux protéases (PrPres), d'un poids moléculaire situé entre 27 et 30 kDa (Bolton et al., 1982 ; McKinley et al., 1983). Cette protéine PrPres est le résidu d'une digestion partielle d'une protéine plus large dont le poids moléculaire est situé entre 33 et 35 kDa (Barry et al., 1986). La découverte d'une protéine prion de même poids moléculaire et présente chez les animaux sains a montré que la protéine prion de la tremblante appelée protéine prion « scrapie » (PrP<sup>Sc</sup>) dérive en fait d'une protéine prion exprimée par l'hôte, la protéine prion « cellulaire » (PrP<sup>C</sup>) (Caughey & Raymond, 1991).

## 2. La protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup>

### 2.1. Expression et distribution de PrP<sup>C</sup>

La présence de PrP<sup>C</sup> a été initialement mise en évidence dans les homogénats de cerveau infecté par les prions (Bolton et al., 1982). PrP<sup>C</sup> est codée par le gène *Prnp* localisé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme (Sparkes et al., 1986 ; Basler et al., 1986) et sur le chromosome 2 chez la souris (Shyng et al., 1995). Le gène *Prnp* contient deux exons chez l'homme (Puckett et al., 1991) et le hamster (Westaway et al., 1994) ou trois exons chez le rat (Saeki et al., 1996), la souris, le mouton (Westaway et al., 1994) et les bovins (Horiuchi et al., 1998) (**Figure 1**). La comparaison de séquences traduites du gène *Prnp* de plus de 40 espèces montre un important degré de conservation entre les séquences des mammifères, suggérant une fonction importante de PrP<sup>C</sup> à travers l'évolution. Les variations existantes entre espèces et entre individus peuvent constituer des facteurs de susceptibilité à l'infection par les prions. Le promoteur de *Prnp* (Mahal et al., 2001) est une région riche en acides aminés GC qui contient une boîte CCAAT et de nombreux sites de fixation pour les facteurs de transcription SP1, AP1 et AP2. Le contrôle de l'expression du gène *Prnp* a été attribué à une séquence en 5' située dans le premier intron et une séquence non-traduite en 3'. L'expression de *Prnp* peut être modulée par de nombreux paramètres tels que le stress cellulaire induit par exemple par la chaleur ou l'hypoglycémie (Shyu et al., 2000, 2005), l'inflammation qui provoque une augmentation de l'expression de *Prnp*, notamment dans la

peau et l'épithélium gastro-intestinal (Pammer et al., 1998, 2000), le stress oxydatif (Sauer et al., 1999) ou encore l'augmentation des taux de cuivre (Armendariz et al., 2004).

PrP<sup>C</sup> est fortement exprimée dans le SNC mais également dans de nombreux tissus et organes : les organes lymphoïdes, les reins, l'estomac, l'intestin, le cœur, les muscles squelettiques, les poumons, les ovaires, les testicules et les glandes mammaires et dans le sang dans les lymphocytes et les cellules folliculaires dendritiques. Dans le SNC, son expression la plus forte est observée dans le cervelet et le néocortex (Fournier et al., 1995 ; Salès et al., 1998 ; Haeblerlé et al., 2000 ; Lainé et al., 2001 ; Mironov et al., 2003 ; Bailly et al., 2004 ; Galvan et al., 2005 ; Rial et al., 2014 ). Elle est aussi exprimée dans le bulbe olfactif, l'amygdale, le putamen, la substance noire, l'hippocampe, le tronc cérébral et le striatum. Au niveau cellulaire, PrP<sup>C</sup> est principalement exprimée dans les neurones et plus faiblement dans les cellules gliales et les cellules de Schwann (revue : Linden et al., 2008 p. 680-681). La distribution intracellulaire de PrP<sup>C</sup> dans les neurones reste un sujet controversé. Certains travaux démontrent sa présence dans la membrane plasmique neuronale, en particulier au niveau de l'axone mais pas dans le corps cellulaire (Salès et al., 2002), d'autres une localisation plus importante sur les membranes des vésicules d'endocytose ou dans le cytosol des neurones dans l'hippocampe, le thalamus et le néocortex (Mironov et al., 2003) et sur les boutons synaptiques des neurones (Fournier et al., 1995 ; Herms et al., 1999 ; Haeblerlé et al., 2000 ; Bailly et al., 2004). De plus, de manière surprenante, l'expression de l'ARNm codant PrP<sup>C</sup> détectée par hybridation *in situ* n'est pas toujours corrélée avec la présence de PrP<sup>C</sup> visualisée par immunohistochimie, peut-être du fait d'un rapide renouvellement de PrP<sup>C</sup> dans certains types cellulaires comme les cellules granulaires du cervelet (Ford et al., 2002).

## 2.2. Structure et trafic de PrP<sup>C</sup>

L'ARNm de la PrP<sup>C</sup> humaine code une protéine initialement constituée de 254 acides aminés, subissant ensuite des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique (RE) : l'élimination d'une séquence signal de 22 résidus localisée à son extrémité N-terminale et d'une séquence de 23 acides aminés à son extrémité C-terminale, permettant respectivement l'adressage de PrP<sup>C</sup> à la face externe de la membrane plasmique dans des radeaux lipidiques ou rafts, régions riches en cholestérol et sphingolipides et l'ajout de l'ancre GPI. PrP<sup>C</sup> est ainsi formée de 209 acides aminés. Au cours de son trafic dans le Golgi, un pont disulfure est établi entre les cystéines 179 et 214, la protéine peut accepter des glycosylations sur les asparagines Asn181 (située sur la seconde hélice- $\alpha$ ) et Asn197 (située sur la boucle entre les hélices  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3) et le peptide signal situé en N-terminal est clivé. Trois glycoformes de PrP<sup>C</sup> peuvent donc exister : la forme non-glycosylée, mono- ou diglycosylée. Des profils de glycosylation différents peuvent influencer la formation et la précipitation de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau. La diminution du ratio des formes di-glycosylée/mono-glycosylée est rapportée dans la maladie familiale de la MCJ<sup>T183A</sup>. En effet, la mutation T183A abolit le site de glycosylation en N-terminal situé sur le résidu 181 (N-181) (Grasbon-Frodl et al., 2004 ; Capellari et al., 2000). PrP<sup>C</sup> peut être synthétisée dans le RE sous trois topologies différentes : une forme majoritaire sécrétée et deux formes transmembranaires <sup>Ctm</sup>PrP et <sup>Ntm</sup>PrP dont la région C- ou N-terminale reste respectivement dans le RE et résultent de l'ajout d'une région hydrophobe très conservée entre les résidus 110/135. Le rôle de ces formes transmembranaires n'est pas élucidé. <sup>Ctm</sup>PrP est toxique et provoque la mort neuronale chez des souris transgéniques (Hegde et al., 1998 ; Stewart et al., 2001). <sup>Ctm</sup>PrP est détectée dans la maladie de GSS où PrP<sup>C</sup> est mutée (Hegde et al., 1998). De plus, l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> favorise la formation de <sup>Ctm</sup>PrP, suggérant son implication dans les maladies à prions (Hedge et al., 1999).

La structure tridimensionnelle de PrP<sup>C</sup> a été recherchée chez différentes espèces par spectroscopie en résonance magnétique nucléaire (RMN). Les recherches s'accordent sur une protéine formée d'une longue queue N-terminale, de trois hélices- $\alpha$  et de deux courts feuillets  $\beta$  anti-parallèles (**Figure 1**). Le deuxième feuillet- $\beta$  et la deuxième hélice- $\alpha$  sont connectés par une large boucle. Les résidus constituant cette boucle  $\alpha$ 2- $\beta$ 2 sont supposés être impliqués dans la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> et intervenir dans la constitution de la barrière inter-espèce. L'extrémité C-terminale est stabilisée par un pont di-sulfure qui lie les hélices 2 et 3 (souris : [Riek et al., 1996](#) ; mouton : [James et al., 1997](#) ; homme : [Zahn et al., 2000](#) ; bovin : [López Garcia et al., 2000](#)). Plus récemment, la structure RMN de PrP<sup>C</sup> décrite ci-dessus a été confirmée par la structure cristalline de PrP<sup>C</sup> ([Eghiaian et al., 2004](#) ; [Antonyuk et al., 2009](#)).



**Figure 1. Structure de PrP<sup>C</sup> murine.** PrP<sup>C</sup> possède une région C-terminale organisée en trois hélices  $\alpha$  (A, B et C ; rectangles bleus) et deux courts feuillets- $\beta$  (rectangles noirs) et une région N-terminale qui contient la région neuroprotectrice des octapeptides répétés liant le cuivre. Les sites de glycosylation sur les groupements asparagine (CHO) ainsi que le pont disulfure (-S-S-) sont représentés (adaptée de [Watts & Westaway, 2007a](#)).

À la membrane plasmique, PrP<sup>C</sup> peut subir différents clivages protéolytiques, ce qui permet la régulation de ses fonctions : le clivage- $\alpha$  en position 110/111 chez la souris, le clivage- $\beta$  en position 88/90 et un clivage proche de la membrane (résidu 230) appelé « *shedding* » qui permet la libération de l'entière PrP<sup>C</sup> dans l'espace extracellulaire ([Altmeyden et al., 2013](#) pour revue). Des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 (TACE) ont été impliquées dans le clivage- $\alpha$  ([Vincent et al., 2001](#)).

Le clivage- $\alpha$  permet la genèse d'un fragment N1 de 11 kDa situé dans la région N-terminale qui est libéré dans le milieu extracellulaire et d'un fragment C1 de 17 kDa situé en position C-terminal qui reste attaché à la membrane plasmique par le groupement GPI ([Chen et al., 1995](#)). Le lieu du clivage a été recherché : bien que C1 soit retrouvé à la surface cellulaire, il semblerait que le clivage n'ait pas lieu dans les radeaux lipidiques et semble intervenir dans la voie de sécrétion tardive ([Walmsley et al., 2009](#)). Le rôle du clivage- $\alpha$  et des fragments C1 et N1 a été étudié chez des souris transgéniques déficientes en PrP<sup>C</sup> qui expriment une PrP<sup>C</sup> tronquée dans sa partie N-terminale : PrP<sup>C</sup> tronquée dans la région hydrophobe de PrP<sup>C</sup> proche du site de clivage, ou PrP<sup>C</sup> tronquée dans la région du clivage- $\alpha$  elle-même (« *charged cluster region* »). Ces mutations qui réduisent ou bloquent la formation du fragment C1 provoquent des dégénérescences importantes se traduisant par des symptômes ataxiques et paraplégiques et de sévères altérations de la myélinisation en périphérie qui conduisent à la mort des animaux ([Baumann et al., 2007](#)). Ces résultats suggèrent que le blocage du clivage- $\alpha$  est neurotoxique. Le clivage- $\alpha$  de PrP<sup>C</sup> s'effectue en effet dans le domaine neurotoxique de PrP<sup>C</sup> (situé entre les acides aminés 105-125 chez la souris) et empêche la formation et l'activité neurotoxique du peptide PrP(106-126). Il permet de lutter contre la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> en clivant la région polybasique en N-terminal impliquée dans l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec PrP<sup>Sc</sup> ([Chen et al., 1995](#) ; [Turnbaugh et al., 2012](#)). De plus, des travaux chez des souris transgéniques exprimant un transgène de C1 et infectées par les prions ont montré que la région C1 ralentit la progression des maladies à prions et empêche la formation et l'agrégation de PrP<sup>Sc</sup> ([Westergard et al., 2011](#)). Des

données contradictoires obtenues *in vitro* indiquent que C1 serait capable d'activer le facteur pro-apoptotique p53 et d'induire l'apoptose (Sunyach et al., 2007). Cependant, ce résultat n'est pas confirmé *in vivo* (Westergard et al., 2011). Le fragment N1 lui-aussi, est neuroprotecteur *in vitro* comme *in vivo* : il inhibe l'apoptose induite par la staurosporine en modulant la transcription de p53 et protège les cellules ganglionnaires de la rétine de l'apoptose induite par hypoxie (Guillot-Sestier et al., 2009). Une autre fonction intéressante du fragment N1 est la protection contre l'agrégation et la toxicité du peptide  $\beta$ -amyloïde (Niezanski et al., 2012).

Le clivage- $\beta$ , plus rare en condition physiologique, intervient entre les résidus 89/90 et génère les fragments N2 et C2 à la surface cellulaire (Chen et al., 1995). Ce clivage- $\beta$  a été détecté dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Chen et al., 1995 ; Laffont-Proust et al., 2005) et est donc corrélé à cette pathologie. Contrairement aux fragments C1/N1, peu de résultats décrivent les fonctions physiologiques de C2/N2. Comme ce clivage- $\beta$  peut être directement réalisé par des composés réactifs à l'oxygène, il a été suggéré qu'il est vraisemblablement impliqué dans la régulation du stress oxydatif, notamment dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou les maladies à prions (McMahon et al., 2001 ; Watt et al., 2005).

Enfin, le « *shedding* » de PrP<sup>C</sup> permet la libération de PrP<sup>C</sup> entière dans le milieu extracellulaire. Ce faisant, il permet la régulation du taux de PrP<sup>C</sup> à la membrane plasmique et contrôle ses multiples fonctions. PrP<sup>C</sup> soluble a été détectée dans le surnageant des cellules en culture (Borchelt et al., 1993) et dans le fluide cébrospinal humain (Tagliavini et al., 1992), lui suggérant un rôle physiologique propre. En effet, PrP<sup>C</sup> clivée peut agir comme un facteur trophique sur les cellules voisines et distantes. De plus, comme le fragment N1 issu du clivage- $\alpha$ , elle peut lier les oligomères A $\beta$  et provoquer leur phagocytose en vue de leur dégradation (Altmeppen et al., 2013).

Après son adressage à la membrane plasmique, PrP<sup>C</sup> subit des cycles d'internalisation et de réadressage à la membrane plasmique (Shyng et al., 1993) dans des vésicules à clathrine (Taylor et al., 2005) ou des cavéoles (Peters et al., 2003). Le cuivre provoque la sortie de PrP<sup>C</sup> des radeaux lipidiques en vue de son internalisation et son trafic vers le RE ou le Golgi (Pauly & Harris, 1998 ; Brown & Harris, 2003). Dans les cultures de neuroblastomes privés de sérum, PrP<sup>C</sup> est internalisée rapidement avec un  $t_{1/2}$  de 3 à 5 min (Sunyach et al., 2003). Plus de 95% des PrP<sup>C</sup> sont recyclées à la membrane en moins d'une heure tandis que les 5% sont clivées dans les lysosomes (Shyng et al., 1993). La demi-vie de PrP<sup>C</sup> est estimée à environ 6 h (Taraboulos et al., 1992).

### 2.3. Les souris déficientes en PrP<sup>C</sup>

Afin d'étudier les fonctions de PrP<sup>C</sup>, plusieurs souris déficientes en PrP<sup>C</sup> ont été générées par des délétions plus ou moins larges de *Prnp* (Figure 2).

#### 2.3.1. Souris Zürich-I et Edinburg *Prnp*<sup>0/0</sup>

Les premières souris déficientes en *Prnp* Zürich-I (ZH-I) et Edinburg *Prnp*<sup>0/0</sup> se développent et se reproduisent normalement (Büeler et al., 1992 ; Manson et al., 1994). Chez la souris ZH-I, les codons 4-187 de *Prnp* sont remplacés par une cassette néomycine (néo). Chez la souris Edinburg, la cassette néo est insérée dans le site *KpnI* qui suit le résidu 93 du cadre ouvert de lecture de *Prnp*.

De manière surprenante, ces souris créées à l'origine pour étudier les fonctions de PrP<sup>C</sup>, ne présentent pas de phénotype spectaculaire, malgré la forte expression tissulaire de PrP<sup>C</sup> et le fort degré de conservation au

courant de l'évolution. Des altérations mineures ont été cependant observées. Les analyses comportementales de Tobler et al (1996) montrent que les souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> présentent une perturbation du rythme circadien et des troubles du sommeil. Le groupe de Collinge (Collinge et al., 1994) mesure par des enregistrements électrophysiologiques de tranches d'hippocampe Edinburg *Prnp*<sup>0/0</sup>, une diminution de l'inhibition exercée par les récepteurs GABA A. La potentialisation à long terme (LTP) est significativement diminuée dans la corne d'Ammon 1. Aussi, un dysfonctionnement des courants potassiques dépendants du calcium est mis en évidence dans l'hippocampe des souris Edinburg *Prnp*<sup>0/0</sup> (Collinge et al., 1994 ; Colling et al., 1996 ; Herms et al., 2001).

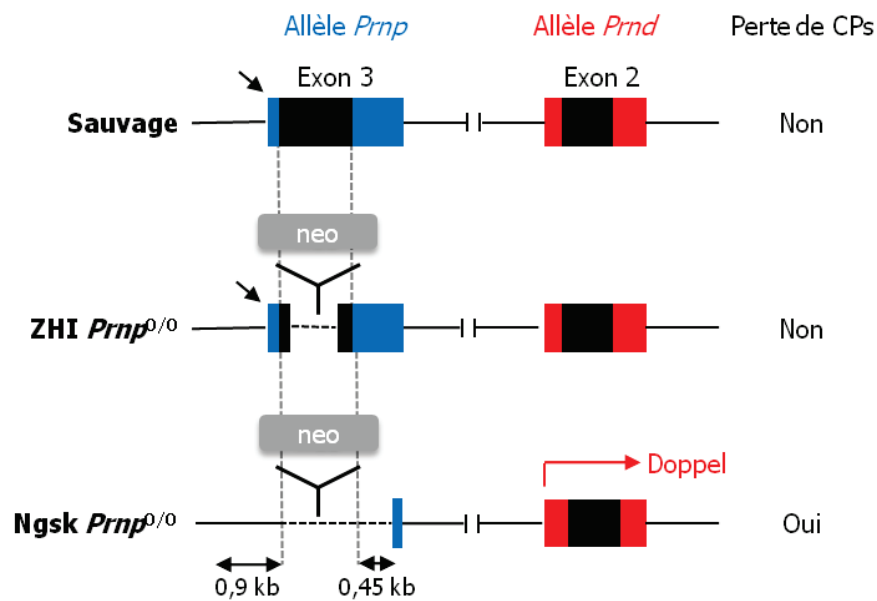
L'analyse de l'apprentissage et de la mémoire des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> a fourni différents résultats. Des données pionnières sur les souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> ne montrent pas de déficit de navigation, ni d'apprentissage spatial (Lipp et al., 1998), de mémoire à long terme (test de conditionnement à la peur), ni de leur comportement exploratoire (Roesler et al, 1999). En contradiction avec ces observations, des études plus tardives ont cependant pointées des altérations du comportement exploratoire et de la mémoire à court- et long-terme de la souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> âgée de 9 mois (Coitinho et al, 2003). De plus, l'apprentissage et la mémoire spatiale dépendants de l'hippocampe sont corrélés à une réduction de la LTP dans le gyrus denté des souris Edinburg *Prnp*<sup>0/0</sup> (Criado et al, 2005). Les souris récupèrent des déficits après l'introduction d'un transgène de *Prnp* sous le contrôle de l'énolase spécifique des neurones (NSE : *neuron-specific enolase*), indiquant l'implication de l'absence de PrP<sup>C</sup> dans les déficits observés (Criado et al., 2005).

PrP<sup>C</sup> est capable de fixer le cuivre (Cu<sup>2+</sup>) *in vivo*, suggérant que PrP<sup>C</sup> pourrait agir sur l'enzyme dismutase superoxyde ou même posséder une activité intrinsèque de dismutase superoxyde, bien que cela reste controversé (Brown et al, 1997a ; Jones et al, 2005). Cette enzyme qui lie Cu<sup>2+</sup> est impliquée dans la détoxification des radicaux superoxydes dangereux pour la cellule en oxygène et peroxyde d'hydrogène. L'activité de la dismutase superoxyde diminue dans le cerveau de souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (Brown et al, 1997b), impliquant la PrP<sup>C</sup> dans la liaison de Cu<sup>2+</sup> sur l'enzyme dismutase superoxyde.

### 2.3.2. Les souris Nagasaki, Rcm0 et Zürich-II

Chez les souris mutantes Nagasaki *Prnp*<sup>0/0</sup> (Ngsk), la délétion du gène codant la PrP<sup>C</sup> (*Prnp*) est plus large et comprend 0,9 kb de l'intron 2, 10 pb de la région 5' non-codante, le cadre ouvert de lecture entier et 0,45 kb de la région 3' non-codante (Sakaguchi et al., 1996). Ces souris développent une sévère ataxie, une perte importante des cellules de Purkinje du cervelet à partir de 6 mois et la démyélinisation des nerfs périphériques (Nishida et al., 1999). D'autres lignées telles que Rcm0 (Moore et al., 1999 ; Silverman et al., 2000) et Zürich-II (ZH-II) (Rossi et al., 2001) qui ont une délétion large de *Prnp*, souffrent d'une perte des cellules de Purkinje et d'une ataxie similaires à la lignée Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>.

Initialement, PrP<sup>C</sup> a été impliquée dans la survie à long terme des cellules de Purkinje. Cependant, la perte des cellules de Purkinje et l'apparition de l'ataxie résultent d'un artefact génétique lié à la délétion de *Prnp* chez les lignées Ngsk, ZH-II et Rcm0. Le gène *Prnd* situé à 16 kb en aval du locus du gène *Prnp* murin code la protéine Doppel (Dpl), un paralogue de PrP<sup>C</sup>. Chez les souris Ngsk, ZH-II et Rcm0 *Prnp*<sup>0/0</sup>, le site accepteur de l'épissage situé dans l'exon 3 de *Prnp* est délété, ce qui provoque la production d'un transcrite chimérique *Prnp-Prnd* qui place le gène *Prnd* sous le contrôle du promoteur de *Prnp*. La protéine Dpl dont l'expression est forte dans les testicules et le cœur mais faible dans le SNC en condition physiologique, va être fortement exprimée dans le SNC chez les souris Ngsk, ZH-II et Rcm0 *Prnp*<sup>0/0</sup> (Moore et al., 1999 ; Li et al., 2000).



**Figure 2. Délétion du gène *Prnp* chez les souris ZH-I et *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup>.** Chez *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup>, la délétion plus large de *Prnp* provoque l'expression ectopique de *Dpl* dans le cerveau. *Dpl* est impliqué dans la mort des cellules de Purkinje du cervelet (adaptée de Rossi et al., 2001).

#### 2.4. Les fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup>

Plusieurs fonctions ont été attribuées à PrP<sup>C</sup>. Son rôle le plus connu est son activité neuroprotectrice anti-oxydante (Brown & Sassoon, 2002). PrP<sup>C</sup> lutte contre l'apoptose provoquée par le facteur pro-apoptotique BAX (Laroche-Pierre et al., 2009). De plus, il a été démontré que PrP<sup>C</sup> peut recruter et interagir avec NCAM (*Neural Cell-Adhesion Molecule*) à la surface cellulaire, suggérant son implication dans la croissance neuritique par des voies de transduction impliquant notamment les Fyn kinases (Schneider et al., 2011). Elle permet la prolifération des progéniteurs neuronaux lors de la neurogenèse, pendant le développement et chez l'adulte (Steele et al., 2006) et la maintenance de la myéline (Bremer et al., 2010). Sa localisation au niveau des synapses et des données d'électrophysiologie sur tranches d'hippocampe suggèrent que PrP<sup>C</sup> a d'importantes fonctions synaptiques (Collinge et al., 1994 ; Fournier et al., 1995 ; Herms et al., 1999 ; Haeblerlé et al., 2000 ; Bailly et al., 2004), notamment via sa liaison au récepteur NDMA (Khosravani et al., 2008) et sa régulation du flux de calcium présynaptique via sa liaison au cuivre (Vassallo & Helms, 2003). Elle participe également à la transmission au niveau de la jonction neuromusculaire (Re et al., 2006). PrP<sup>C</sup> possède des homologies avec la famille ZIP des transporteurs des ions métalliques. Elle régule l'homéostasie du cuivre (Davies & Brown, 2008) et modifie le métabolisme du fer (Schmitt-Ulms et al., 2009), diminuant ainsi le stress oxydatif induit par le fer (Rana et al., 2009).

A l'heure actuelle, PrP<sup>C</sup> est comprise comme un d'activateur de voies intracellulaires de signalisation par son interaction avec des partenaires protéiques au sein d'un complexe multimoléculaire. De cette manière, PrP<sup>C</sup> participe à de nombreux processus cellulaires, de la survie à la plasticité synaptique.



### 2.4.1. PrP<sup>C</sup> et croissance neuritique

PrP<sup>C</sup> est fortement exprimée dans les neurones et est très conservée à travers l'évolution. Sa localisation dans les radeaux lipidiques, des régions connues pour contenir de nombreux récepteurs, second messagers et effecteurs suggère que cette protéine contribue à la transduction de signaux intracellulaires par la liaison avec différents ligands. Des expériences de cross-linking (pontage chimique par des anticorps) montrent un couplage de PrP<sup>C</sup> à Fyn, une tyrosine kinase membre de la famille Src qui forme un complexe de signalisation relayé par la protéine membranaire cavéoline dans les lignées neuronales 1C11 (Mouillet-Richard et al., 2000). Les auteurs n'observent néanmoins pas les réponses morphologiques associées à la voie de transduction de Fyn. La cavéoline est un important régulateur de la signalisation intracellulaire (Stern & Mermelstein, 2010). Cependant, la cavéoline est insérée dans la bicouche lipidique sans toutefois la traverser et n'interagit pas avec le groupement GPI de PrP<sup>C</sup> (Stern & Mermelstein, 2010), impliquant la présence d'un intermédiaire supplémentaire pour le transfert du signal à travers la membrane. Ainsi, le couplage de PrP<sup>C</sup> à Fyn a été impliqué dans la croissance neuritique dépendante de la protéine NCAM qui est recrutée et liée à PrP<sup>C</sup> dans les radeaux lipidiques de neurones hippocampiques *in vitro* (Santuccione et al., 2005).<sup>4</sup> PrP<sup>C</sup> a la capacité de recruter et d'interagir avec une autre protéine kinase de la famille Src, la protéine Lyn dont le signal est également transmis par la cavéoline (Hernandez-Rapp et al., 2014). L'hétérogénéité de composition des radeaux lipidiques implique que le complexe PrP<sup>C</sup>-cavéoline-Lyn est présent au niveau du corps cellulaire et le complexe PrP<sup>C</sup>-cavéoline-Fyn au niveau des terminaisons neuronales (Hernandez-Rapp et al., 2014). PrP<sup>C</sup> est également capable de lier la laminine (Graner et al., 2000a) et le récepteur de la laminine (Hundt et al., 2001) et cette interaction avec la laminine est essentielle à la formation de neurites dans les neurones hippocampiques *in vitro* (Graner et al., 2000a). A l'inverse, l'inhibition de PrP<sup>C</sup> dans la lignée PC12 entraîne une inhibition de la croissance neuritique et la rétraction des neurites dépendante de la laminine (Graner et al., 2000b). Provoquant la neuritogénèse, le complexe PrP<sup>C</sup>-Lyn-laminine agit via les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR1 et mGluR5 par l'activation de la voie PLC, PKC et ERK1/2 et la mobilisation du calcium interne dans les neurones primaires sauvages, mais pas déficients en PrP<sup>C</sup> (Beraldo et al., 2011). L'acquisition de la polarité neuronale des cellules souches requiert des modifications du cytosquelette et il a été montré récemment dans les cellules précurseurs de la lignée neuroectodermale 1C11 que PrP<sup>C</sup> contribue à l'acquisition de la polarité neuronale en modulant l'activité des intégrines  $\beta 1$ , l'interaction cellulaire avec la fibronectine et la dynamique du cytosquelette (Loubet et al., 2012). En effet, la suppression de PrP<sup>C</sup> empêche la poussée initiale des neurites induite par la différenciation des cellules 1C11, indiquant que PrP<sup>C</sup> est nécessaire à la neuritogénèse. En provoquant l'agregation des intégrines  $\beta 1$ , la perte de PrP<sup>C</sup> suractive la voie RhoA-Rho kinase-LIMK-cofiline qui en retour altère les adhésions focales, augmente la stabilité des microfilaments d'actine, et *in fine* empêche la formation des neurites. Pour résumer, il se dégage des plus récents travaux que PrP<sup>C</sup> est nécessaire à la neuritogénèse par la régulation qu'elle exerce sur de multiples voies de signalisation impliquées dans les adhésions focales et la dynamique du cytosquelette d'actine (Alleaume-Butaux et al., 2013).

<sup>4</sup> Le modèle du couplage simple de PrP<sup>C</sup>-Fyn à la cavéoline est discuté. Un mécanisme alternatif pourrait impliquer que le pontage chimique de PrP<sup>C</sup> à Fyn induirait un réarrangement des radeaux lipidiques par des mouvements latéraux de différents domaines incluant les cavéolines et la protéine NCAM qui coupleraient le groupement GPI de PrP<sup>C</sup> à la tyrosine kinase du côté cytoplasmique de la membrane (Westergard et al., 2007).

### 2.4.2. PrP<sup>C</sup> régule la plasticité synaptique

PrP<sup>C</sup> est trouvée au niveau post-synaptique (Haeberlé et al., 2000 ; Bailly et al., 2004) et interagit avec des récepteurs ionotropiques et des récepteurs couplés aux protéines G (Hernandez-Rapp et al., 2014). Par exemple, l'activation/inactivation de la kinase GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase) par PrP<sup>C</sup> contrôle le trafic et la localisation subcellulaire ainsi que l'activité du récepteur sérotoninergique 5-HT1B (Hernandez-Rapp et al., 2014). De plus, PrP<sup>C</sup> est capable d'interagir avec les récepteurs métabotropiques du glutamate couplés à la protéine Gq (mGluR1A, mGluR1BR et mGluR5R) capables d'initier la voie de la protéine kinase C. Dans l'hippocampe, la liaison du complexe PrP<sup>C</sup>-STI-1 (*stress-inducible protein-1*) avec le récepteur ionotropique de l'acétylcholine entraîne la libération de calcium (Beraldo et al., 2010). Enfin, de nombreux travaux montrent le lien entre PrP<sup>C</sup> et le récepteur NMDA et la plasticité synaptique. PrP<sup>C</sup> régule négativement la sous-unité GluR2D du récepteur NMDA, protégeant ainsi les cellules de l'excitotoxicité du glutamate. Aussi, en cas d'exposition à l'éthanol, PrP<sup>C</sup> contrôle l'internalisation de la sous-unité GluR2B du récepteur NMDA via la phosphorylation de Fyn (Petit-Paitel et al., 2012). De plus, l'absence de PrP<sup>C</sup> perturbe le flux calcique intracellulaire dans des cultures de cellules granulaires (Herms et al., 2000) et l'enregistrement électrophysiologique des cellules de Purkinje de tranches de cervelet *Prnp*<sup>0/0</sup> révèle l'altération des courants potassiques activés par le calcium (Herms et al., 2001).

### 2.4.3. Propriétés anti-apoptotiques de PrP<sup>C</sup>

L'implication de PrP<sup>C</sup> dans des mécanismes neuroprotecteurs a été démontrée par son interaction avec la protéine STI-1 à la membrane plasmique (Zanata et al., 2002). STI-1 est une protéine de stress (*heat-shock protein*, Hsp) initialement décrite dans un complexe formé des protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp90 (Lässle et al., 1997). Dans des explants de rétine en culture organotypique, l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec STI-1 protège les neurones de l'apoptose induite par l'anisomycine (Zanata et al., 2002). L'utilisation d'un peptide se liant au fragment 113-128 de PrP<sup>C</sup> active la voie de la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique cAMP et la voie de la kinase ERK (Chiarini et al., 2002). La voie de PKA est impliquée dans l'inhibition de l'apoptose induite par l'anisomycine, tandis que la voie de la kinase ERK d'ordinaire engagée dans la survie (Grewal et al., 1999) est pro-apoptotique dans les neurones immatures de la rétine (Chiarini et al., 2002). Ceci suggère l'existence d'une balance entre les signaux pro- et anti-apoptotiques qui détermine la voie de transduction dépendante de PrP<sup>C</sup> empruntée par la cellule (Chiarini et al., 2002). De plus, l'interaction PrP<sup>C</sup>-STI-1 module la synthèse protéique dans des neurones hippocampiques *in vitro* par la voie PI3K-mTOR qui est importante pour la survie neuronale (Roffé et al., 2010). Au cours de l'infection par les prions, PrP<sup>Sc</sup> pourrait stimuler la voie ERK en dépit de la voie PKA et serait ainsi plus susceptible d'activer l'apoptose dans les neurones infectés.

D'autres évidences en faveur d'une fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup> ont été obtenues dans des cultures de neurones déficients en PrP<sup>C</sup>. Les neurones *Prnp*<sup>0/0</sup> sont plus sensibles aux stimuli apoptotiques tels que la privation de sérum (Kuwahara et al., 1999 ; Kim et al., 2004) que les neurones sauvages *Prnp*<sup>+/+</sup>. Dans ces cellules, l'expression de PrP<sup>C</sup> et de BCL-2 permet aux cellules de résister aux stimuli apoptotiques, suggérant l'implication de PrP<sup>C</sup> dans la voie apoptotique dépendante de BCL-2/BAX (Kuwahara et al., 1999). En effet, PrP<sup>C</sup> protège les neurones primaires contre l'apoptose dépendante de BAX. L'expression transgénique de *Bax* ou de *Bax* et *Prnp* dans ces neurones montre que l'expression de *Prnp* empêche la mort neuronale dépendante de BAX chez 90% des neurones (Bounhar et al., 2001). PrP<sup>C</sup> possède dans la répétition d'octapeptides, un domaine BH2

similaire à celui de BCL-2 qui est impliqué dans la fonction anti-apoptotique de BCL-2<sup>5</sup>. Une autre étude confirme ces résultats et montre que l'hélice 3 de PrP<sup>C</sup> empêche les changements de conformation de BAX nécessaires à l'activation de l'apoptose (Laroche-Pierre et al., 2009).

Un couplage du complexe PrP<sup>C</sup>-Fyn-cavéoline à la NADPH oxydase, l'enzyme permettant la synthèse des anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup>, conduit à la production transitoire de dérivés réactifs de l'oxygène dans les cultures de neurones sérotoninergiques et noradrénergiques 1C11. Cette production est abolie par l'application d'un inhibiteur sélectif de NADPH oxydase dans le milieu de culture. Les dérivés réactifs de l'oxygène sont capables d'agir comme des seconds messagers qui induisent la phosphorylation des MAPK ERK1/2 impliquée dans la survie neuronale (Schneider et al., 2003). D'autres ligands de PrP<sup>C</sup> tels que BCL-2, Hsp60, BIP, Nrf-2, l'apolipoprotéine A1, l'héparine, la laminine et le récepteur de la laminine suggèrent qu'elle a un rôle inhibiteur de l'apoptose. Par ailleurs, les dérivés réactifs de l'oxygène sont capables d'activer la métalloprotéase TACE qui libère la cytokine TNF- $\alpha$  (Pradines et al., 2009). TACE clive également PrP<sup>C</sup> de la membrane plasmique suggérant qu'elle a un rôle neuroprotecteur lors de l'infection par les prions en limitant la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Alfa Cissé et al., 2007). En retour, PrP<sup>C</sup> intervient dans le contrôle de l'activité de TACE par la kinase PDK1. Le clivage des récepteurs TNFR1 de la membrane neuronale par TACE désensibilise les neurones aux effets du TNF- $\alpha$  en conditions physiologiques (Pietri et al., 2013).

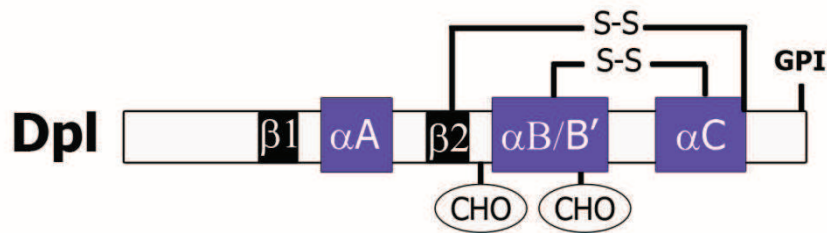
#### 2.4.4. La voie de PI3K/Akt et l'homéostasie du cuivre

La voie de la phosphoinositide 3 kinase de type I (PI3K)/Akt régule l'équilibre entre la survie/prolifération et la mort cellulaire et son activation est influencée par l'expression de PrP<sup>C</sup>. Par exemple, l'activité des PI3K est plus forte dans le cerveau de souris sauvages que déficientes en PrP<sup>C</sup>, ainsi que dans les lignées de cellules neuronales transfectées avec *Prnp* comparées aux cellules non-transfectées. Dans des cellules transfectées, la résistance au stress conférée par la transfection de *Prnp* est abrogée par la chélation du cuivre ou la délétion de la répétition N-terminale d'octapeptides de PrP<sup>C</sup>, suggérant que la liaison de Cu<sup>2+</sup> par cette région pourrait être impliquée dans l'initiation de la voie PI3K/Akt (Vassallo et al., 2005). D'autres travaux montrent que la phosphorylation d'Akt est diminuée dans les cerveaux de souris *Prnp*<sup>0/0</sup> comparés aux sauvages, dans des conditions basales et après une insulte ischémique (Weise et al., 2006).

#### 2.5. La protéine Doppel : paralogue de PrP<sup>C</sup>

La protéine Dpl est le premier paralogue de PrP<sup>C</sup> découvert (Moore et al., 2001). Les deux gènes *Prnp* et *Prnd* seraient en effet issus de la duplication d'un gène ancestral commun (Mastrangelo & Westaway, 2001 ; Mo et al., 2001). A l'instar de PrP<sup>C</sup>, Dpl est une protéine N-glycosylée ancrée à la membrane plasmique par un groupement GPI (Stahl et al., 1987) constituée de trois hélices  $\alpha$  et de deux feuillets- $\beta$  anti-parallèles (Lu et al., 2000 ; Silverman et al., 2000), mais dont l'extrémité N-terminale contenant la séquence neuroprotectrice de répétition d'octapeptides est tronquée (Moore et al., 1999 ; Li et al., 2000 ; Figure 3).

<sup>5</sup> PrP<sup>C</sup> est exprimée à la membrane neuronale et non dans le cytoplasme, la mitochondrie ni le RE où les membres de la famille Bcl-2 exercent normalement leur activité, rendant difficile la classification de PrP<sup>C</sup> dans la famille Bcl-2.



**Figure 3. Structure de Dpl.** Comme PrP<sup>C</sup>, Dpl possède trois hélices  $\alpha$  et 2 courts feuillets- $\beta$  en C-terminal, mais est tronquée de la région N-terminale de PrP<sup>C</sup> contenant la séquence neuroprotectrice de répétition d'octapeptides. De plus, l'hélice  $\alpha$ B de PrP<sup>C</sup> est scindée en hélices « entortillées »  $\alpha$ B et  $\alpha$ B' chez Dpl qui possède un pont disulfure supplémentaire (adapté de [Watts & Westaway, 2007a](#)).

### 2.5.1. Localisation cellulaire et fonctions physiologiques de Doppel

L'analyse de l'expression de Dpl par des techniques de Northern et de Western blot a montré que Dpl est fortement exprimée dans les cellules de Sertoli et les spermatozoïdes chez l'adulte ([Peoc'h et al., 2002](#) ; [Tranulis et al., 2001](#)). L'absence de Dpl chez des souris mutantes mâles provoque leur stérilité ([Behrens et al., 2002](#)), Dpl étant impliquée dans la spermatogenèse ([Paisley et al., 2004](#)). L'expression de Dpl dans la rate, la moelle épinière et les muscles squelettiques est plus faible. Bien que Dpl soit exprimée dans le néocortex d'hamsters âgés de 7 à 12 jours, elle est indétectable dans l'encéphale adulte ([Moore et al., 1999](#) ; [Silverman et al., 2000](#) ; [Behrens et al., 2002](#) ; [Li et al., 2008](#)). L'analyse de l'expression de Dpl par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie a montré que Dpl était exprimée dans les cellules endothéliales du cerveau de souris âgées d'une semaine ([Li et al., 2000](#)), suggérant l'implication de Dpl dans l'angiogenèse et, plus particulièrement, dans la maturation de la barrière hémato-encéphalique ([Li et al., 2000](#)).

Il a été démontré que l'expression ectopique de Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup> dans l'encéphale des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* est responsable de la dégénérescence des cellules de Purkinje, corrélée à l'ataxie cérébelleuse ([Moore et al., 2001](#) ; [Li et al., 2000](#)). Dpl présente en effet un profil de N- et O-glycosylations différent dans le cervelet par rapport au cerveau qui pourrait potentialiser la neurotoxicité de Dpl dans cette structure ([Al Bersaoui et al., 2005](#)).

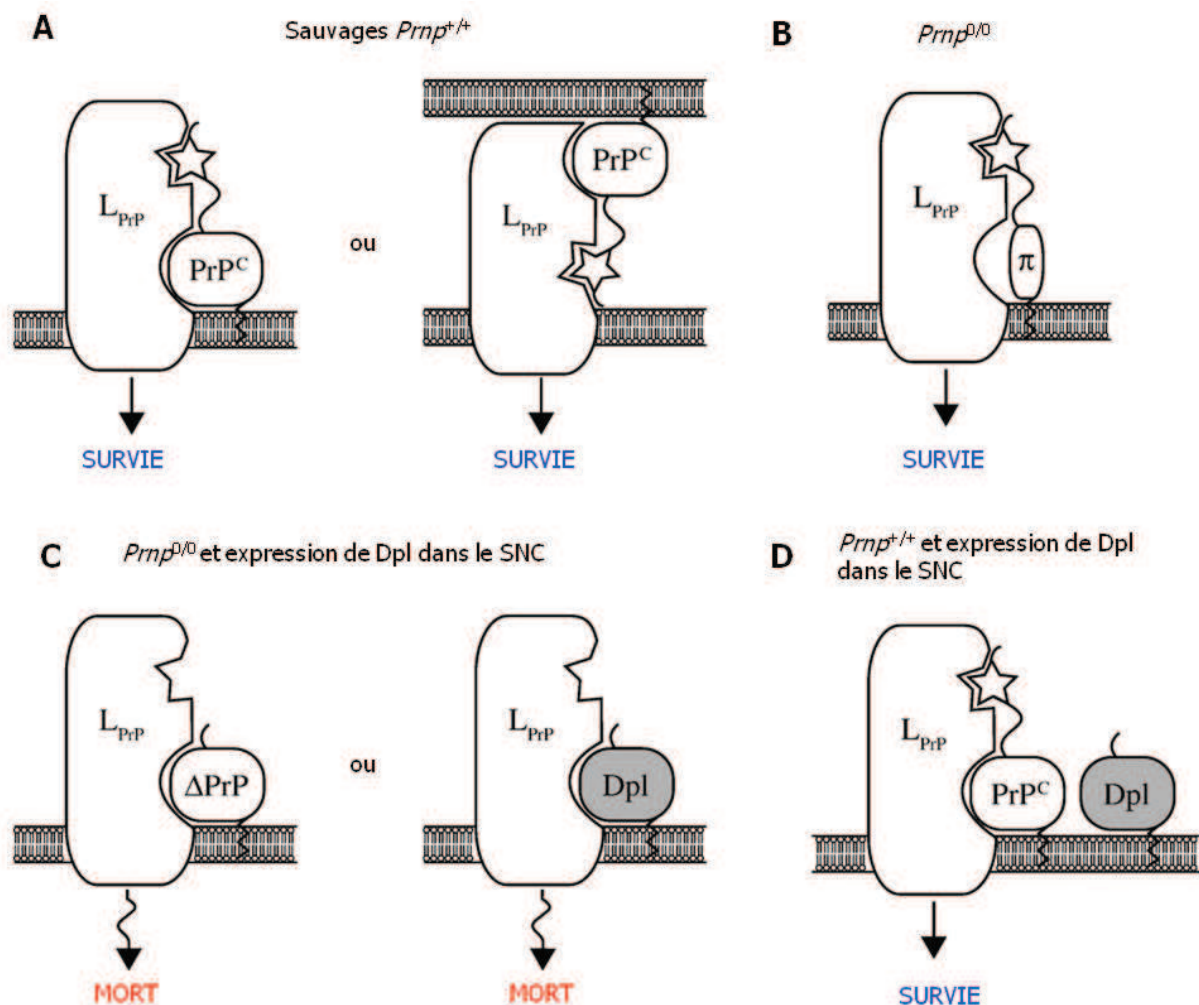
### 2.5.2. Interaction PrP<sup>C</sup>-Doppel

L'ataxie détectée chez les souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* a été à l'origine attribuée à la déficience en PrP<sup>C</sup>. En effet, la réintroduction de *Prnp* chez ces souris par transgénèse a permis de récupérer des déficits et de supprimer l'ataxie. De même dans des cellules hippocampiques *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* en culture, les cellules *Prnp<sup>0/0</sup>* dans lesquelles l'ORF de *Prnp* a été réintroduit par transgénèse (sans les séquences codant les introns) survivent sans sérum et l'activation de l'apoptose n'est pas observée ([Kawahara et al., 1999](#)). Des expériences de transgénèse de *Prnd* chez des souris ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* démontrent que PrP<sup>C</sup> contrecarre les effets neurotoxiques de Dpl, sans que la concentration de Dpl dans le cerveau ne soit modifiée ([Moore et al., 2001](#)).

Il a été supposé que Dpl agirait de façon opposée ou complémentaire à PrP<sup>C</sup> et que leur interaction contrôlerait la survie cellulaire (**Figure 4**) ([Sakudo et al., 2005](#)). PrP<sup>C</sup> et Dpl se lieraient à un ligand commun LPrP. La liaison de PrP<sup>C</sup> à LPrP induirait un signal de survie cellulaire, tandis que celle de Dpl activerait une cascade de signalisation menant à la mort cellulaire. Une explication à la survie des neurones chez les souris

déficiences en PrP<sup>C</sup> et ne surexprimant pas Dpl a été proposée par Watts et Westaway (2007a). Selon eux, il existerait une protéine  $\pi$  qui, de par sa liaison à LPrP, provoquerait un signal de survie cellulaire. Or, LPrP et  $\pi$  ne sont pas encore découvertes. La protéine Shadoo, homologue des PrP<sup>C</sup>, pourrait être la protéine  $\pi$ .

L'absence de phénotype pathologique chez les souris exprimant une protéine de fusion Nt-PrP<sup>C</sup>-Dpl constituée du corps de Dpl et du fragment N-terminal de PrP<sup>C</sup> montre que la séquence N-terminale de PrP<sup>C</sup> protège les neurones de la toxicité de Dpl (Yoshikawa et al., 2008 ; Baumann et al., 2009). De même, la protéine de fusion PrP<sup>C</sup>-Dpl contenant le domaine central de PrP<sup>C</sup> (résidus 90-134) et le fragment 65-66 entre les résidus 65 à 66 de Dpl abolit la toxicité de Dpl (Baumann et al., 2009). Le groupe de Lemaire-Vieille (Lemaire-Vieille et al., 2013) en collaboration avec mon équipe, ont montré que les chimères PrP<sup>C</sup>-Dpl dans lesquelles les 57 ou 66 premiers acides aminés de Dpl sont remplacés respectivement par les 125 ou 134 premiers acides aminés de PrP<sup>C</sup> ne perdent pas de neurones cérébelleux. A l'inverse, les chimères PrP<sup>C</sup>-Dpl dont les résidus 1 à 24 de Dpl sont remplacés par les 124 premiers acides aminés de PrP<sup>C</sup> qui conservent les résidus 25-57 de Dpl développent une ataxie cérébelleuse précoce, suggérant que la neurotoxicité intrinsèque de Dpl est provoquée par ce fragment 25-57 et dont la partie N-terminale (résidus 1-124) de PrP<sup>C</sup> ne serait pas à même de compenser la toxicité (Lemaire-Vieille et al., 2013). Il en résulte que la toxicité de Dpl serait imputable à cette séquence (25-57) et que la fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup> résiderait dans son domaine central (90-133).



**Figure 4. Modèle d'interaction de PrP<sup>C</sup> et Dpl sur un ligand commun. A.** Chez les souris sauvages *Pmp*<sup>+/+</sup>, PrP<sup>C</sup> se lie à un ligand hypothétique L<sub>PrP</sub> et initie une cascade de signalisation neuroprotectrice encore inconnue. Deux sites de liaison de L<sub>PrP</sub> à PrP<sup>C</sup> sont impliqués. **B.** Chez les souris *Pmp*<sup>0/0</sup>, une protéine hypothétique  $\pi$  possédant le domaine N-terminal de PrP<sup>C</sup> se lie à L<sub>PrP</sub> et induit la cascade de signalisation pro-survie. **C.** Lorsque Dpl ou  $\Delta$ PrP sont exprimées dans le SNC et que PrP<sup>C</sup> est absente, la liaison à L<sub>PrP</sub> de Dpl ou  $\Delta$ PrP qui ne possèdent pas le domaine N-terminal de PrP<sup>C</sup> est incapable d'initier la cascade de signalisation pro-survie. **D.** Lorsque Dpl ou  $\Delta$ PrP sont exprimées dans le SNC en présence de PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>C</sup> possède une plus forte affinité à L<sub>PrP</sub> et bloque ou réduit la liaison de Dpl ou  $\Delta$ PrP à L<sub>PrP</sub> (d'après [Watts & Westaway, 2007a](#)).

## 2.6. Shadoo

Le gène *Sprn* codant Shadoo est exprimé dans le SNC selon un patron similaire à celui de *Pmp*. La protéine Shadoo murine est composée de séquences signal similaires à celles de PrP<sup>C</sup> et Dpl ([Premzl et al., 2003](#)). Shadoo partage des homologies avec PrP<sup>C</sup> : la répétition des octapeptides en N-terminal et la région hydrophobe centrale sont similaires, tandis que Shadoo possède une région C-terminale distincte N-glycosylée. Les deux protéines sont ancrées sur la face externe de la membrane plasmique par un groupement GPI. Aussi, les deux protéines partagent des ligands communs et sont toutes deux capables de former des fibrilles amyloïdes *in vitro* ([Westaway et al., 2011](#) pour revue). Shadoo et PrP<sup>C</sup> divergent dans la composition de leur région N-terminale, Shadoo ne possédant pas la répétition d'octapeptides liant le cuivre, mais des sites « RGG » de fixation d'ARN. La région hydrophobe centrale de Shadoo n'est pas formée d'un palindrome (AGAAAAGA) mais de la répétition de cinq tandems de quatre acides nucléiques. Enfin, la région C-terminale de Shadoo ne comprend pas trois hélices- $\alpha$  comme PrP<sup>C</sup>.

Des expériences dans des cultures de cellules granulaires du cervelet et de neuroblastomes SH-SY5Y, montrent que Shadoo et PrP<sup>C</sup> exercent des fonctions neuroprotectrices. Shadoo lutte notamment contre l'excitotoxicité du glutamate et contre la neurotoxicité de PrP<sup>C</sup> dépourvue de son domaine hydrophobe ([Watts et al., 2007b](#) ; [Sakthivelu et al., 2011](#)). La question se pose alors de savoir dans quelle mesure Shadoo lutte contre les agressions dans le SNC.

## 2.7. ZIP

PrP<sup>C</sup> est dans l'évolution descendante des transporteurs du zinc ZIP ([Schmitt-Ulms et al., 2009](#)). En effet, des études d'interactome quantitatifs identifient trois protéines copurifiées avec PrP<sup>C</sup> : ZIP5, 6 et 10. Des analyses bioinformatiques montrent que les protéines ZIP possèdent des séquences similaires à PrP<sup>C</sup> ([Schmitt-Ulms et al., 2009](#) ; [Watt et al., 2013](#)) : un fragment de 111 acides aminés situé dans le domaine N-terminal de ZIP10 ressemble au domaine globulaire C-terminal de PrP<sup>C</sup> murine (16% d'identité et 42% de similarité). De plus, les protéines ZIP possèdent des séquences riches en histidine capables de lier les métaux divalents à l'instar de la région des octapeptides de PrP<sup>C</sup>. Aussi, la première séquence transmembranaire des ZIPs et l'ancre GPI de PrP<sup>C</sup> sont comparables, suggérant que le peptide signal responsable de l'attachement de GPI à PrP<sup>C</sup> a pu évoluer à partir du premier domaine transmembranaire de la protéine ancestrale ZIP ([Ehsani et al., 2011](#)). En résumé, l'identification de nombreuses similarités entre les transporteurs ZIP et PrP<sup>C</sup> suggère que PrP<sup>C</sup> descend de progéniteurs de la famille ZIP et qu'une évolution divergente aurait mené à la formation des deux protéines, toutes deux capables de détecter et de transporter le zinc et ainsi que de réguler l'homéostasie du zinc ([Schmitt-Ulms et al., 2009](#)).

### 3. La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>

L'hypothèse de la protéine seule émise par Prusiner implique que la protéine prion seule est nécessaire et suffisante pour transmettre la maladie (prix Nobel de médecine en 1997). Cette hypothèse implique que la conversion de PrP<sup>C</sup> conduit à la forme de protéine prion pathologique possédant la capacité de former des agrégats résistants aux protéases (PrPres), (Griffith, 1967 ; Colby & Prusiner, 2011). La conversion est une étape critique de la neurotoxicité dans les maladies à prions, car ni la perte de fonction de PrP<sup>C</sup> ni la déposition de PrP<sup>Sc</sup> ne sont suffisantes pour causer la neuropathologie (Büeler et al., 1992 ; Mallucci et al., 2002). Le rôle central de la protéine prion a été démontré chez des souris invalidées pour le gène *Prnp* (*Prnp*<sup>0/0</sup>). L'incapacité des souris à propager PrP<sup>Sc</sup> et à développer la tremblante après l'inoculation d'extraits infectieux démontre que la présence de PrP<sup>C</sup> est indispensable à la neuropathologie (Büeler et al., 1992 ; Brandner et al., 1996). D'autres arguments ont été apportés par des expériences menées chez des souris transgéniques présentant des mutations de PrP<sup>C</sup> similaires aux mutations survenant dans l'insomnie fatale familiale ou des mutations rendant rigide la boucle 166-175. Ces souris transgéniques développent spontanément la maladie et celle-ci peut être transmise à des animaux sauvages (Jackson et al., 2009 ; Sigurdson et al., 2009). De même, l'inoculation intracérébrale de fibrilles produites à partir du fragment PrP(89-230) à des souris sauvages et transgéniques exprimant la protéine PrP(89-231) déclenche les symptômes cliniques de la maladie (Legname et al., 2004). L'évidence la plus frappante est certainement la genèse de matériel infectieux à partir de PrP<sup>C</sup> *in vitro* par la conversion et la réplication de PrP<sup>C</sup> à la fois d'origine mammifère ou recombinante (Saborio et al., 2001 ; Castilla et al., 2005 ; Delault et al., 2007 ; Wang et al., 2010).

Une récente avancée a été le développement d'une procédure expérimentale d'amplification biochimique de PrPres appelée PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*) qui permet, par des cycles successifs de sonication et d'incubation, d'amplifier PrP<sup>Sc</sup> à partir du substrat PrP<sup>C</sup> présent dans les homogénats de cerveau (Saborio et al., 2001)<sup>6</sup>. *In fine*, il est possible d'obtenir uniquement les agrégats PrPres nouvellement synthétisés en réalisant des dilutions en série des réactions PMCA. Castilla et al. réussissent en 2005 à infecter des hamsters en utilisant le produit PrPres obtenu par PMCA, validant ainsi l'hypothèse de la protéine-seule. Les animaux développent des signes cliniques semblables à ceux de la tremblante 263K (hyperactivité, problèmes moteurs, faiblesse musculaire et perte de poids). De plus, les analyses histologiques montrent une dégénérescence similaire à celle observée dans le cerveau de hamsters infectés par la souche 263K (vacuolation, accumulation de PrPres, astroglie) (Castilla et al., 2005).

Le groupe de Delault (Delault et al., 2003 ; Supattapone, 2004) démontre, en utilisant la méthode PMCA que la transformation stoechiométrique de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* requiert des molécules d'ARN spécifiques de la cellule hôte. A noter que les ARN des préparations issues de mammifères stimulent la prolifération *in vitro* de PrP<sup>Sc</sup> tandis que les préparations d'ARN d'espèces d'invertébrés ne permettent pas cette prolifération. Ces découvertes suggèrent que des molécules d'ARN encodées par l'hôte pourraient avoir un rôle dans la pathogénèse des ESTs quoique le degré d'amplification obtenu par ces auteurs reste relativement faible. Le groupe de Delault propose d'utiliser ces ARN pour permettre d'augmenter la sensibilité des techniques de

<sup>6</sup> Le mécanisme d'amplification de PrP<sup>Sc</sup> mis en œuvre dans la technique de PMCA est inconnu. Des cycles successifs de sonication sont supposés amplifier le taux de PrPres en fragmentant les larges agrégats de PrPres en produits plus petits, augmentant ainsi le nombre de sites d'attache de PrPres à PrP<sup>C</sup>. Il est également possible que la sonication permette la conversion autrement. Elle peut, par exemple, agir comme une source d'énergie, requise pour former des feuillets  $\beta$  à partir d'hélices  $\alpha$  (Cobb et al., 2009).

diagnostic basées sur l'amplification de PrP<sup>Sc</sup>. Une étude plus récente réalisée par ces auteurs montre que du matériel infectieux peut aussi être généré par PMCA en utilisant PrP<sup>C</sup> purifiée comme substrat (Delault et al., 2007). La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrPres nécessite des détergents, des polyanions et des lipides. Le groupe de DebBurman (DebBurman et al., 1997) avait déjà mis en évidence en 1997 l'implication dans la conversion *in vitro* de PrP<sup>C</sup> en PrPres, de molécules chaperones qui peuvent la réguler positivement (GroEL, heat shock protein 104) ou négativement (sucrose, trehalose, dimethyl sulfoxyde). Il est donc possible que la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrPres nécessite d'autres facteurs, ce qui ne contredit pas l'hypothèse de la protéine prion-seule. Un argument souvent utilisé contre cette hypothèse est l'existence de différentes souches de prion, un phénomène difficile à concilier avec un agent infectieux exclusivement protéique.

### 3.1. La structure de PrP<sup>Sc</sup>

Aucune modification post-traductionnelle de la structure primaire ne permet de différencier PrP<sup>C</sup> de PrP<sup>Sc</sup> (Stahl et al., 1993). Comme la maladie d'Alzheimer, les maladies à prions sont des neuropathologies amyloïdes. Il a été établi que PrP<sup>Sc</sup> est vraisemblablement un polymère composé de monomères de PrP organisés en une structure intermoléculaire de feuillets- $\beta$  (Wille et al., 2009 ; Piro et al., 2011 ; Smirnovas et al., 2011). A ce jour, la structure de PrP<sup>Sc</sup> reste inconnue. Plusieurs modèles structuraux ont été proposés, basés sur des techniques de biophysique à basse résolution et sur l'analyse structurale de prions synthétisés.

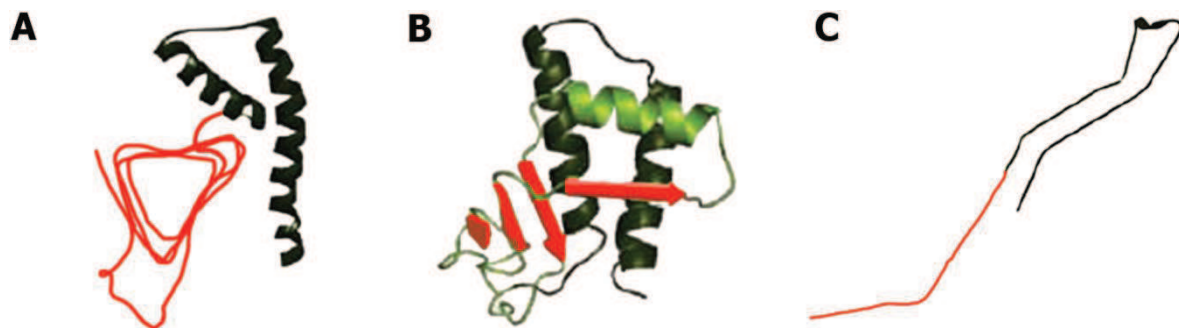
La recherche de la structure moléculaire de PrP<sup>Sc</sup> extraite d'encéphales infectés se heurte en effet à des obstacles techniques insurmontables : 1) PrP<sup>Sc</sup> est insoluble et précipite en agrégats et fibrilles amyloïdes qui sont hydrophobes dans le SNC<sup>7</sup>. PrP<sup>Sc</sup> forme des agrégats non-cristallins qui ne peuvent être solubilisés par aucun détergent testé (Gabizon et al., 1987). Bien que la combinaison de traitements chimiques et physiques (chaleur) ait permis de solubiliser PrP<sup>Sc</sup>, les échantillons ainsi obtenus perdent leur caractère infectieux et leur capacité de réplication (Riesner et al., 1996 ; Wille et al., 1996). 2) PrP<sup>Sc</sup> constitue un assemblage de polymères de différentes tailles. Les agrégats ont un poids moléculaire important, allant de 400 à 600 kDa (Silveira et al., 2005), ce qui complique les analyses biophysiques classiques. 3) Les techniques permettant de générer PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* ne permettent pas d'obtenir une quantité de PrP<sup>Sc</sup> suffisante aux analyses biophysiques. 4) Les protocoles de purification de PrP<sup>Sc</sup> ne permettent pas de séparer PrP<sup>Sc</sup> de contaminants tels que des protéines, lipides ou acides nucléiques (Diringer et al., 1997).

Les difficultés techniques empêchant d'obtenir PrP<sup>Sc</sup> à partir d'encéphales infectés par les prions ont mené les chercheurs vers la production de PrP<sup>Sc</sup> synthétique dont les propriétés biochimiques et infectieuses sont préservées. Les premières expériences de génération de PrP<sup>Sc</sup> ont été réalisées par le groupe de Prusiner (Baskakov et al., 2004) par l'assemblage *in vitro* de fibrilles de protéine prion recombinante (recPrP) produite dans des bactéries. L'inoculation de ces fibrilles synthétiques à des souris transgéniques sur-exprimant une forme tronquée de PrP<sup>C</sup> reproduit des symptômes semblables à ceux provoqués par les prions, mais ces symptômes ne se développent pas chez des souris sauvages. Un biais existe en effet car ces souris transgéniques ont la capacité de développer spontanément des maladies à prions (Westaway et al., 1994 ; Chiesa et al., 1998 ; Nazor et al., 2005). Plus récemment, il a été démontré que deux passages successifs chez des hamsters sont nécessaires pour produire des prions infectieux à partir de recPrP (Makarava et al., 2010). Bien que l'inoculation de fibrilles

<sup>7</sup> La formation de dépôts amyloïdes n'est pas une caractéristique obligatoire des maladies à prions. Seuls 10% des cas sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob contre 70% des cas du kuru montrent des plaques amyloïdes. Tous les cas de variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob montrent des plaques amyloïdes entourées d'un halo de dégénérescence spongiforme – ces plaques sont appelées plaques florides (Collins et al., 2001).



produites à partir de recPrP chez des souris sauvages ne provoque aucun symptôme, une protéine prion infectieuse résistante aux protéases est détectée par immunoblot dans le cerveau infecté. Les informations obtenues à partir des analyses biophysiques ont permis de développer plusieurs modèles structuraux de PrP<sup>Sc</sup> et de nouvelles avancées ont été obtenues en utilisant des techniques de cristallographie électronique couplées à des techniques de modelage computationnel (Govaerts et al., 2004 ; Wille et al., 2009). Trois modèles de structure de PrP<sup>Sc</sup> ont été proposés, basés sur des techniques de cristallographie électronique et de résonance magnétique nucléaire (**Figure 5**)<sup>8</sup>. Dans le modèle de l'hélice- $\beta$ , il est supposé que la région N-terminale de PrP(27-30) se replie en feuillet- $\beta$  à partir du résidu 90 à 177. La région C-terminale (résidus 178-230) maintient la structure en hélice- $\alpha$  comme dans PrP<sup>C</sup> (Diaz-Espinoza & Soto, 2012). Le modèle de la spirale- $\beta$  consiste en un corps de PrP<sup>Sc</sup> en spirale composé de courts feuillets- $\beta$  aux résidus 116-119, 129-132, 135-140 et 160-164. Les trois hélices- $\alpha$  de PrP<sup>C</sup> sont maintenues. Enfin, le modèle des feuillets- $\beta$  étendus suppose que PrP<sup>C</sup> est convertie en une structure composée pour la plupart de feuillets- $\beta$  (Diaz-Espinoza & Soto, 2012).



**Figure 5. Modèles proposés de la structure de PrP<sup>Sc</sup>.** A. Modèle de l'hélice- $\beta$  B. Modèle de la spirale- $\beta$ . C. Modèle des feuillets- $\beta$  étendus. Les feuillets- $\beta$  sont représentés en rouge (d'après Diaz-Espinoza & Soto, 2012).

### 3.2. Les modèles de conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>

A ce jour, le mécanisme de la conversion conformationnelle de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> n'est pas encore compris. Pour tenter de l'expliquer, deux modèles ont été proposés : (1) le modèle du repliement hétérodimérique et (2) celui de la polymérisation nucléaire non catalytique.

Le mécanisme de repliement hétérodimérique suppose que PrP<sup>C</sup> est thermodynamiquement moins stable que PrP<sup>Sc</sup> mais que la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est limitée cinétiquement. Après infection d'une cellule hôte, un hétérodimère intermédiaire entre PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> se formerait et agirait comme une matrice monomérique qui pourrait induire la conversion de PrP<sup>C</sup>. PrP<sup>C</sup> deviendrait alors riche en feuillets  $\beta$ . Cependant, il existe peu de données expérimentales qui décrivent PrP<sup>Sc</sup> comme un monomère stable. De plus, on sait que la conversion et l'infectivité sont corrélées au processus d'agrégation qui n'est pas pris en compte par ce modèle.

Un autre modèle, plus crédible et qui ne contredit pas le précédent est le mécanisme de polymérisation nucléaire non catalytique. Ce modèle propose l'existence d'un large oligomère constituant un noyau stable sur lequel la PrP<sup>C</sup> monomérique se déposerait et adopterait progressivement la structure de PrP<sup>Sc</sup>. Plusieurs travaux, en faveur de cette hypothèse ont montré que PrP<sup>C</sup> peut être convertie *in vitro* en une conformation proche de

<sup>8</sup> Kurt Wüthrich reçoit en 2002 le prix Nobel pour sa contribution à la technique de NMR pour déterminer les structures tridimensionnelles des protéines et des acides nucléiques en solution (Palmer & Patel, 2002).

PrP<sup>Sc</sup> en l'incubant avec des protéines prions résistantes aux protéases provenant d'animaux infectés. Ceci implique que PrPres seule est responsable de sa propagation. Ces recherches montrent de plus que PrPres ainsi formée reste attachée à PrP<sup>Sc</sup> qui agit comme une matrice oligomérique. Ainsi, la conversion se fait en deux étapes de cinétiques différentes : la liaison de PrP<sup>C</sup> à la matrice PrPres suivie par l'étape de conversion proprement dite : la transition conformationnelle de PrP<sup>C</sup> en PrPres. Ces expériences de conversion menées dans un système sans cellules ont cependant un rendement faible en PrP<sup>Sc</sup> nouvellement synthétisée ne dépassant généralement pas le taux de PrP<sup>Sc</sup> utilisé pour la conversion (Kocisko et al., 1994).

### 3.3. Les sites de conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>

La détermination du site de la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est essentielle pour étudier et comprendre ce mécanisme. Les techniques immuno-chimiques de détection de PrP<sup>Sc</sup> sont une étape limitante à l'étude de ce processus car elles ne permettent pas la discrimination des formes PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup> ajoutée expérimentalement et PrP<sup>Sc</sup>, produit de la conversion. Goold et al (2011) ont créé un système dans lequel une PrP<sup>C</sup> chimère couplée au marqueur MYC est exprimée dans des neuroblastomes déficients en PrP<sup>C</sup>. Après seulement 180 min d'incubation avec des homogénats de cerveau infectés par la souche de tremblante RML (Rocky Mountain Laboratory), les auteurs observent que PrP<sup>Sc</sup> nouvellement formée, liée à MYC, est présente à la membrane plasmique. Ils montrent ainsi que la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est initiée à la membrane plasmique et confirment les résultats d'autres travaux qui montrent que la conversion se poursuit dans les compartiments endocytiques (Goold et al., 2011 ; Borchelt et al., 1992 ; Godsave et al., 2008 ; Marijanovic et al., 2009).

### 3.4. Agrégation de PrP<sup>Sc</sup>

Des agrégats fibrillaires (SAF : *Scrapie-associated Fibrils*) de 100 à 200 nm de long sont détectés en microscopie électronique par transmission après digestion par la PK dans le cerveau de souris et de hamsters infectés par la tremblante (Merz et al., 1981), de brebis naturellement atteintes de tremblante (Rubenstein et al., 1987) et de l'homme atteint par la maladie de GSS (Merz et al., 1983).

L'agrégation de PrP<sup>Sc</sup> s'établit selon un processus de nucléation et de croissance pendant laquelle la phase de nucléation est thermodynamiquement stoppée, ce qui crée une phase de décalage de la réaction d'agrégation (« *lag phase* »). Le mécanisme de repliement de la chaîne polypeptidique pour former la forme native d'une protéine et son déroulement nécessitent différents intermédiaires dont certains sont capables de s'associer entre eux pour former des espèces oligomériques non-natives de tailles et de structures différentes (Münch & Bertolotti, 2011). L'interaction d'un oligomère non-natif avec deux autres oligomères par le biais de liaisons longitudinales crée un noyau d'agrégation permettant de générer de nouvelles interfaces de liaison avec d'autres monomères de la protéine soluble, stabilisant ainsi les agrégats formés. La phase de décalage peut être éliminée *in vitro* par l'addition d'agrégats préformés appelés « *seeds*. » La capacité de recruter et de convertir des protéines solubles en agrégats est un processus appelé « *seeding* » (Come et al., 1993).

### 3.5. Notion de souches de prion

Les maladies à prions sont caractérisées par une grande variabilité de leurs symptômes neurologiques et de leurs profils neuropathologiques et moléculaires. En accord avec l'hypothèse de la protéine prion-seule, PrP<sup>Sc</sup>

est une protéine qui se forme à partir d'un substrat PrP<sup>C</sup> présent chez l'hôte, impliquant que cette variabilité ne peut être expliquée par une variabilité génétique et suggère donc l'existence de différentes « souches » de prion. La conformation de PrP<sup>Sc</sup> et en particulier sa structure tertiaire pourrait être responsable de la spécificité des souches de prion (Tanaka et al., 2004 ; Telling et al., 1996 ; Bessen & Marsh, 1994). Différents paramètres tels que la séquence en acides aminés de PrP<sup>C</sup>, l'environnement cellulaire et tissulaire dans lequel s'effectue la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Delault et al., 2012) et le mécanisme de recrutement de la souche peuvent expliquer les différences conformationnelles de PrP<sup>Sc</sup>.

L'existence de différentes souches de prion est mentionnée pour la première fois en 1961 par Pattison et Milson chez la chèvre (Pattison & Milson, 1961). Ces auteurs remarquent que les chèvres infectées par le même isolat de tremblante développent des symptômes cliniques différents, qu'ils distinguent en symptômes de « grattage » (*scratching*) et de « somnolence » (*drowsy*). L'isolation et la caractérisation de deux souches distinctes d'encéphalopathie spongiforme du vison adaptée au hamster (les souches « *Hyper* » : HY et « *Drowsy* » : DY) ont permis de mettre en évidence l'existence de différences biochimiques entre ces deux souches (Bessen & Marsch, 1992). En effet, les souches HY et DY ne possèdent pas les mêmes propriétés biochimiques en terme de sédimentation dans le N-lauroylsarcosine<sup>9</sup>, de sensibilité à la digestion par la protéinase K (PK), de mobilité électrophorétique<sup>10</sup>, ni ne présentent la même immuno-réactivité au niveau N-terminal. Ces résultats indiquent que deux souches de PrP<sup>Sc</sup> ayant pourtant pour origine le même hôte possèdent différentes compositions et/ou conformations. L'infection de souris transgéniques exprimant une PrP<sup>C</sup> chimère souris/humaine par différentes souches humaines de PrP<sup>Sc</sup> montrent que le profil électrophorétique de chaque PrP<sup>Sc</sup> après digestion par la PK est maintenu, de même que le ratio de glycosylation de chaque souche, indiquant que la PrP<sup>C</sup> chimérique peut adopter différentes conformations dépendantes seulement de la souche de PrP<sup>Sc</sup> (Telling et al., 1996).

Depuis, de nombreuses souches de prion ont été caractérisées en fonction de leur signes cliniques, de leur temps d'incubation et de leur profil de lésions histo-pathologiques, propagés de manière stable lors de passages successifs chez l'hôte (Fraser & Dickinson, 1967, 1968 ; Kim et al., 1987). D'autres paramètres permettent aujourd'hui de classer les souches de prion : le profil électrophorétique après digestion par la PK, le patron de glycosylation, la résistance à la digestion par la PK, la sédimentation, la résistance à la dénaturation par des agents chaotropiques et la capacité de leur liaison aux métaux. Certaines souches de tremblante adaptées à la souris présentent des profils neuropathologiques différents qui sont bien caractérisés. Par exemple, la souche 79A montre une plus forte pathologie de la substance blanche que d'autres souches (Bruce et al., 1991) et la souche 22L altère préférentiellement les fonctions motrices et provoque de sévères atteintes du cervelet (Fraser & Dickinson, 1968 ; Kim et al., 1990).

Lorsque la tremblante est transmise expérimentalement d'une espèce à l'autre, la période d'incubation est généralement plus longue lors de l'inoculation à la nouvelle espèce que celle observée au cours des passages répétés chez la première espèce et tous les animaux inoculés ne développent pas la maladie (Carlson et al., 1989 ; Telling et al., 1994 ; Tateishi et al., 1996). Cette difficulté de transmission de la maladie entre espèces est un phénomène complexe appelé « barrière inter-espèce » (Pattison, 1965 ; Dickinson, 1976) qui dépend de différents paramètres dont le principal est la souche de prion utilisée (Kimberlin et al., 1987, 1989).

<sup>9</sup> Le N-lauroylsarcosine est un détergent anionique utilisé pour la solubilisation et la séparation des protéines membranaires et des glycoprotéines.

<sup>10</sup> Les fragments de PrP<sup>Sc</sup> digérés par la PK présentent une différence de mobilité électrophorétique d'environ 2 kDa. L'évaluation spectroscopique de Fourier montre que leurs conformations diffèrent dans leur taux de feuillets-β (Caughey et al., 1998).

### 3.6. Neurotoxicité de PrP<sup>Sc</sup>

L'existence de mécanismes de mort neuronale activés par la neurotoxicité directe de PrP<sup>Sc</sup> est toujours débattue. Celle-ci a été recherchée en utilisant PrP<sup>Sc</sup> purifiée à partir de cerveau de souris (Hetz et al., 2003) ou des peptides synthétiques tels que PrP(106-126) considéré comme le cœur de PrP<sup>Sc</sup> capable d'induire la mort cellulaire par apoptose (Forloni et al., 1993). Aussi, il a été montré que PrP<sup>C</sup> tronquée de sa partie N-terminale provoque la mort neuronale et l'ataxie chez la souris (Shmerling et al., 1998).

La corrélation anatomique et temporelle entre l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> et les changements neuropathologiques observés tels que l'astroglie et la perte neuronale dans les régions du cerveau les plus atteintes suggère que l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> est la première cause de mort neuronale (Williams et al., 1997). Des expériences menées *in vitro* en utilisant PrP<sup>Sc</sup> entière (Müller et al., 1993), des fragments de PrP<sup>Sc</sup> (Forloni et al., 1993), des oligomères de PrP<sup>Sc</sup> ou des fibrilles amyloïdes (Novitskaya et al., 2006) démontrent la toxicité de PrP<sup>Sc</sup> dans des cultures primaires de neurones. De plus, des études montrent à la fois *in vitro* et *in vivo* que les conformations structurales intermédiaires de PrP<sup>Sc</sup> (stade oligomérique) formées avant les fibrilles sont plus toxiques que les fibrilles amyloïdes, suggérant que leur agrégation permettrait de limiter leurs effets en protégeant les neurones (Simoneau et al., 2007). La fragmentation de PrP<sup>Sc</sup> en oligomères de différentes tailles montrent que la plus forte toxicité de PrP<sup>Sc</sup> est exercée par des oligomères de 17-27 nm, tandis que la toxicité des fibrilles amyloïdes est plus faible et celle des oligomères de petites tailles < 5 nm absente (Silveira et al., 2005). Dans la MCJ, les petits fragments oligomériques de PrP<sup>Sc</sup> sont corrélés avec le développement de la maladie dans le thalamus (Choi et al., 2011).

Cependant, de nombreuses évidences indiquent que PrP<sup>res</sup> n'est pas intrinsèquement toxique. En effet, la corrélation entre accumulation de PrP<sup>res</sup> et neurotoxicité n'est pas toujours vérifiée. Dans certains cas expérimentaux (Flechsig et al., 2000 ; Lasmézas et al., 1997) et certains cas de maladies à prions d'origine familiale (Medori et al., 1992 ; Tateishi et al., 1992 ; Brown et al., 1994 ; Collinge et al., 1995 ; Piccardo et al., 2001), la pathologie se développe en présence de dépôts de PrP<sup>res</sup> faibles ou inexistantes. Des formes subcliniques d'infection par les prions sont décrites dans lesquelles les animaux arborent un niveau élevé d'infectivité et une accumulation de PrP<sup>res</sup> importante, sans présenter toutefois de signes cliniques (Hill et al., 2000 ; Race et al., 2001 ; Hill & Collinge, 2003). De plus, bloquer la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> en supprimant PrP<sup>C</sup> dans les neurones mais pas dans les astrocytes protège les neurones de la toxicité après l'infection et contre la dégénérescence et ce, malgré la présence de larges dépôts de PrP<sup>res</sup> (Mallucci et al., 2003, 2007 ; White et al., 2008). De même, les prions sans ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) forment des agrégats fibrillaires à faible capacité neuroinvasive (Bett et al., 2013). Ces résultats indiquent que la présence de PrP<sup>C</sup> neuronale est indispensable au développement et à la propagation de la maladie et suggère que PrP<sup>res</sup> n'est pas intrinsèquement neurotoxique. Le processus de conversion lui-même pourrait mener, en aval et de façon indirecte, aux effets neurotoxiques. En effet, la conversion est nécessaire à la neurotoxicité (Cronier et al., 2012). Cependant, l'inhibition de la conversion n'est pas suffisante pour empêcher la mort des neurones, ce qui implique l'existence d'une voie cellulaire capable de transmettre la toxicité de PrP<sup>Sc</sup>.

#### 3.6.1. Déstabilisation des membranes plasmiques

La neurotoxicité directe de PrP<sup>Sc</sup> pourrait s'exercer par le biais de son interaction avec les membranes cellulaires par la formation de pores provoquant une différence de potentiel entre les compartiments intra- et

extracellulaire et la perturbation de l'homéostasie ionique (Lin et al., 1997 ; Solomon et al., 2010, 2012). En effet, le peptide neurotoxique PrP(106-126) augmente la conductance de membranes lipidiques *in vitro* en formant des canaux membranaires. Les canaux sont non-sélectifs et perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cl}^-$  (Lin et al., 1997). Aussi, la protéine prion délétée des résidus 105-125 PrP( $\Delta$ 105-125) est capable d'induire un courant ionique transmembranaire dans les cultures de cellules HEK293 qui est supprimé par la co-expression de PrP<sup>C</sup> entière et bloqué par la co-délétion du domaine chargé N-terminal PrP( $\Delta$ 23-32). Par contre, l'expression de PrP( $\Delta$ 105-125) n'est pas toxique dans des cultures de cellules granulaires du cervelet. Les atteintes neurotoxiques dans les maladies à prions pourraient ainsi être provoquées par la formation de pores membranaires (Solomon et al., 2010, 2012 ; Aguzzi & Falsig, 2012). De plus, des molécules amyloïdes comme le peptide A $\beta$  et des mélanges de structures riches en feuillets- $\beta$  (nommés Abri et ADan) forment, dans des membranes reconstituées, des structures qui sont similaires à des canaux ioniques et permettent l'apparition d'un courant ionique (Quist et al., 2005). Ces résultats suggèrent que PrP<sup>Sc</sup> pourrait former des canaux ioniques membranaires capables de déstabiliser l'homéostasie ionique neuronale et provoquer la neurodégénérescence.<sup>11</sup>

### 3.6.2. Stress du réticulum endoplasmique

Des analyses histologiques et biochimiques de cerveaux de souris infectées par la souche 139A et de patients affectés par la MCJ montrent l'activation des caspases-3 et -12 et des protéines chaperones induites par le stress du RE dans les aires cérébrales où la mort neuronale est importante (Hetz et al., 2003 ; Mukherjee et al., 2010). Moreno et al (2012) ont corrélé l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans l'hippocampe et l'activation de la réponse aux protéines mal-repliées dans le RE. Ils mesurent une augmentation progressive de la phosphorylation des kinases PERK et eIF2 $\alpha$  impliquées dans cette voie, dans l'hippocampe de souris infectées par la souche de prion RML (Moreno et al., 2012). Ils montrent une diminution de la traduction protéique et mesurent notamment une baisse de la concentration des protéines post-synaptiques impliquées dans l'exocytose/endocytose tels que les SNAREs, SNAP-25 et VAMP-2, mais aussi une diminution de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA et de PSD-95. Ces baisses de concentration protéique sont associées à un déficit de la transmission synaptique dans l'hippocampe et à une altération du comportement des souris. La restauration de la traduction protéique par la réduction du taux d'eIF2 $\alpha$  phosphorylé permet la récupération de la transmission synaptique et des déficits comportementaux. L'inhibition de PrP<sup>C</sup> par l'utilisation d'ARN interférents provoque les mêmes effets, suggérant que l'accumulation de PrP<sup>C</sup> mal-conformée est la cause du stress du RE et de la diminution de la traduction protéique. Ceci suggère aussi que l'accumulation de PrP mal-conformée provoque des altérations synaptiques en diminuant les protéines essentielles à la neurotransmission (Moreno et al., 2012). Une autre étude suggère que l'hyperactivation de la calcineurine du fait du relargage du calcium consécutif au stress du RE contribue à la dysfonction neuronale dans les maladies à prions (Mukherjee et al., 2010).

### 3.6.3. Variation de l'excitabilité du récepteur NMDA

PrP<sup>C</sup> régule le trafic et l'activité des récepteurs du glutamate NMDA et AMPA, contribuant ainsi à la physiologie et la survie neuronales (Kleene et al., 2007 , Sassoon et al., 2004). En effet, par ses interactions avec les sous-unités NR1 et NR2D, PrP<sup>C</sup> atténue l'activité du récepteur NMDA, altérée dans les maladies à prions.

<sup>11</sup> Cette hypothèse est très vraisemblable. D'autres protéines capables de former des canaux membranaires sont connues telles que VacA de la bactérie *Helicobacter pylori* (Tombola et al., 2000 ; Cid et al., 2013), la toxine cholérique de *Vibrio Cholerae* (Cinar et al., 2010) ou l'aerolysine de *Aeromonias hydrophila* (Abrami et al., 1998).

Comme PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup> interagit avec les sous-unités NR1 et NR2D du récepteur NMDA et les sous-unités GluA1 et GluA2 du récepteur AMPA. PrP<sup>Sc</sup> séquestre NR1 et NR2D et ainsi diminue l'expression des récepteurs NMDA à la membrane plasmique ou interfère avec son adressage à la membrane synaptique (Kleene et al., 2007, Sassoon et al., 2004). Ceci pourrait interférer avec la fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup> (Ratte et al., 2008) qui protège les neurones de l'excitotoxicité induite par le glutamate (Khosravani et al., 2008) et entraîner la mort neuronale. En effet, alors que l'activation de NMDAR est neuroprotectrice, l'activation des NMDAR extrasynaptiques est une cause de mort neuronale (Hardingham & Bading, 2010). De plus, PrP<sup>Sc</sup> est capable d'induire l'apoptose par l'élévation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> dépendante des récepteurs NMDA et AMPA en les rendant plus perméables aux ions Ca<sup>2+</sup> et augmentant ainsi l'excitotoxicité (Thellung et al., 2013).

## 4. Neuroinvasion du système nerveux central par les prions

Dans de nombreux cas de maladies à prions, la contamination par les prions infectieux se fait par voie périphérique soit par contamination iatrogène (transfusion sanguine, contact avec des tissus ou matériel chirurgical contaminés), par une coupure au niveau de la peau ou le plus souvent par ingestion. Il est évident aujourd'hui que l'ingestion d'aliments contaminés par l'ESB en Grande-Bretagne dans les années 1990, est la voie de passage du variant de la MCJ à l'homme (Mabbott & MacPherson, 2006). Lors d'une contamination expérimentale périphérique par les prions, le temps d'incubation est prolongé par rapport à une infection intra-cérébrale. Par exemple, la durée d'incubation avant l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie de souris C57Bl6/J infectées par inoculation intra-péritonéale de la souche de tremblante 22L (i.p.) est de 234 ± 7 jours, tandis qu'elle est de 157 ± 1 jours après une infection par inoculation intra-cérébrale (i.c.) (Bruce et al., 1991). La route de la neuroinvasion va dépendre de nombreux facteurs incluant la souche de prion, la dose de prion, l'espèce et le génotype de l'hôte. Je décrirai les routes expérimentale et naturelle d'invasion par les prions.

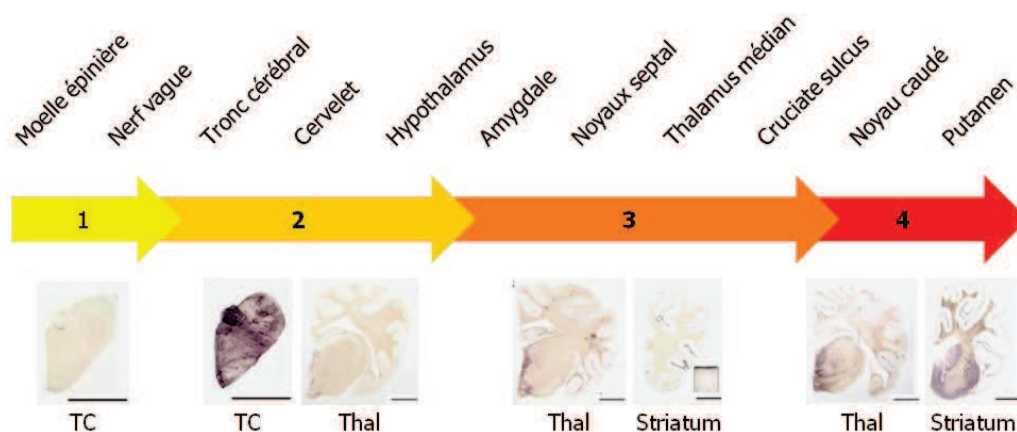
### 4.1. De la périphérie au système nerveux central

Des souris et hamsters infectés oralement par la tremblante ou l'ESB adaptée à la souris montrent une déposition initiale de PrP<sup>Sc</sup> dans l'épithélium intestinal dans les plaques de Peyer et les nœuds lymphatiques, précédant l'infection d'autres tissus lymphatiques comme la rate. Contrairement à l'infection par voie intra-péritonéale, la rate n'intervient pas ou peu dans la neuroinvasion par la voie orale, la période d'incubation n'étant pas dans tous les cas sensible à la splénectomie. Le passage de l'épithélium intestinal se fait par transport trans-épithélial dépendant de la différenciation des cellules épithéliales membranaires (cellules M) (Heppner et al., 2001). PrP<sup>Sc</sup> est ensuite phagocytée par les macrophages et les cellules dendritiques qui la délivrent aux cellules folliculaires dendritiques localisées dans les centres germinaux des tissus folliculaires associés à l'intestin. Après son incubation dans ces tissus, PrP<sup>Sc</sup> se propage par le système nerveux entérique le long des fibres efférentes du système nerveux sympathique (nerf splanchnique) et para-sympathique (nerf vague), infecte le système lympho-réticulaire comme la rate et les nœuds lymphatiques (Heikenwalder et al., 2007 ; Beekes & McBride, 2007 ; McBride et al., 2001) et atteint le SNC par le tronc cérébral. Un transport rétrograde a lieu par les nerfs périphériques.

## 4.2. Neuroinvasion cérébrale

La propagation des prions dans le SNC s'effectue en deux phases : une phase infectieuse de propagation exponentielle qui dure jusqu'à un titre maximum de prion suivie d'une phase toxique en plateau qui détermine l'apparition des symptômes cliniques. Les auteurs distinguent l'infectivité de la toxicité de PrP<sup>Sc</sup> et montrent que la formation de PrP<sup>Sc</sup> lors de la phase 1 est proportionnelle au taux de PrP<sup>C</sup>. À l'inverse, la formation de la forme toxique PrP<sup>Sc</sup> au cours de la phase 2 est indépendante de la concentration en PrP<sup>C</sup>, suggérant qu'il existe un co-facteur ou un nombre saturable de sites de réplication qui contribuent à la neurotoxicité (Sandberg et al., 2011). Ces deux phases à cinétique différente (phase de réplication des prions, suivie d'une phase toxique) sont aussi décrites *in vitro* dans des cultures de neurones corticaux et striataux et de cellules granulaires du cervelet infectés par la souche 139A, ME7 et 22L (Hannaoui et al., 2013).

Chez le mouton, la neuroinvasion du SNC par la tremblante suit plusieurs étapes (**Figure 6**) : de l'« entrée » de PrP<sup>Sc</sup> dans le SNC proprement dite, jusqu'à l'invasion progressive de nombreuses aires cérébrales. L'entrée de PrP<sup>Sc</sup> est réalisée à partir du noyau moteur dorsal du nerf vague, du tractus spinal trigéminal, du noyau du tractus solitaire et enfin de la substance intermédiaire de la moelle épinière, suggérant que PrP<sup>Sc</sup> est transportée par les nerfs de cellule à cellule. De plus, l'observation de dépôts péri-vasculaires, dans les cellules endothéliales, dans le cortex cérébral, à proximité des méninges et des vaisseaux du plexus choroïde suggère que PrP<sup>Sc</sup> pourrait également être transmis par le sang (Wemheuer et al., 2011 ; Jeffrey et al., 1998). Après l'invasion de chaque segment de la moelle épinière, PrP<sup>Sc</sup> se dissémine dans le tronc cérébral dans le mésencéphale, puis plus faiblement dans le thalamus (déposition péri-vasculaire), l'hypothalamus, l'habenula, les noyaux mammillaires et dans le cortex cérébelleux. Le groupe de Wemheuer distingue ensuite une troisième étape dans laquelle le mésencéphale, les noyaux de l'amygdale, les noyaux septaux, le tractus visuel, le pédoncule cérébral, l'hippocampe, le cortex frontal et la substance blanche subcorticale sont atteints. Enfin, la dernière étape est dite des « ganglions de la base », ces derniers étant alors envahis par PrP<sup>Sc</sup> (Wemheuer et al., 2011).



D'après Wemheuer et al, 2011

**Figure 6. Déposition de PrP<sup>Sc</sup> au cours de la progression de la tremblante dans le cerveau de mouton.** Différentes aires cérébrales sont progressivement atteintes au cours de la progression de la maladie. TC: tronc cérébral, thal : thalamus. Echelle = 5 mm. Adaptée de Wemheuer et al., 2011.

## 5. Anatomopathologie des maladies à prions dans le système nerveux central

En 1920, Creutzfeldt et Jakob décrivent plusieurs patients atteints d'une nouvelle forme de dégénérescence en se basant sur l'observation de coupes de cerveaux marquées par la coloration de Nissl. Ils y décrivent la dégénérescence et la mort neuronale, la chromatolyse et la prolifération astrogliale. De plus, la coloration à l'hématoxyline-éosine permet de visualiser la spongiose du tissu (Creutzfeldt, 1920 ; Jakob, 1921). Ces changements sont bilatéraux, mais peuvent être locaux ou unilatéraux (Yamanouchi et al., 1986). Les dépôts de PrP<sup>res</sup> représentent le premier évènement de la neuropathologie, suivie rapidement par l'activation microgliale, l'inflammation et la spongiose du tissu nerveux qui précèdent l'atrophie dendritique, la dysfonction synaptique et la mort neuronale. Ces atteintes anatomo-pathologiques sont différentes selon les ESTs considérées. Nous distinguons trois groupes d'ESTs :

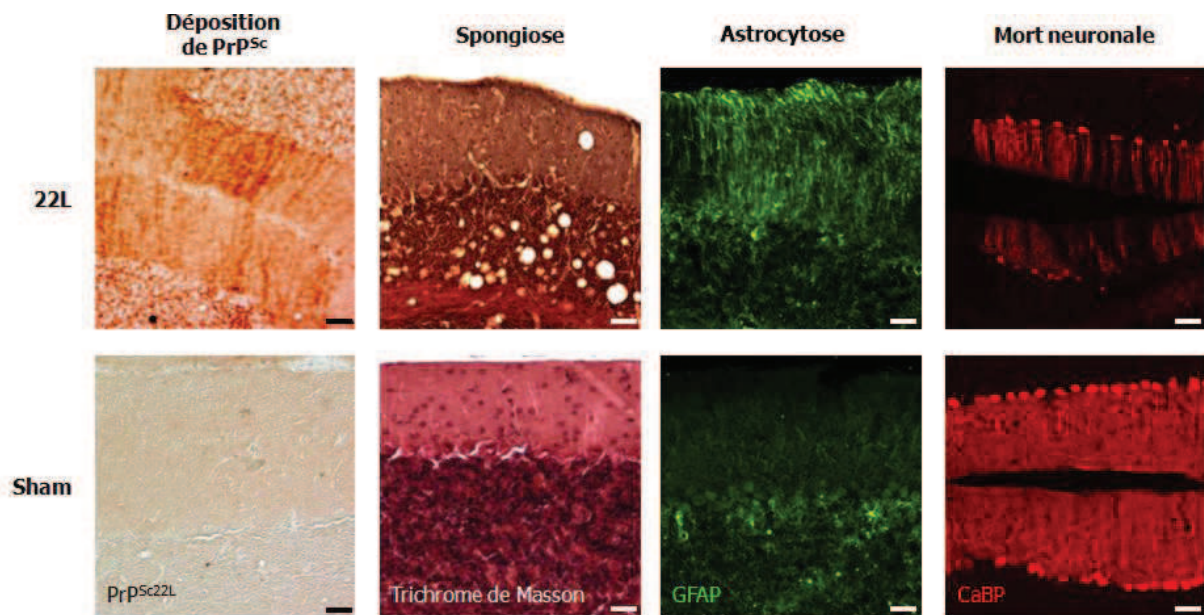
(1) les ESTs héréditaires associées à une mutation du gène codant PrP<sup>C</sup> incluent le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnie fatale familiale (IFF) et la maladie de Creutzfeldt-Jakob d'origine familiale (fMCJ ; 10-15% des patients atteints de la MCJ) chez l'homme. Cinquante-cinq mutations différentes ont été identifiées chez l'homme et l'animal.

(2) les ESTs acquises résultant de l'ingestion ou de l'inoculation de matériel contaminé comprenant le kuru et des variantes de la maladie de Creutzfeldt-Jacob (vMCJ ; 1% des patients atteints de la MCJ) chez l'homme, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ; « maladie de la vache folle »), féline (Wyatt et al., 1991) ou du vison, la tremblante chez le mouton, la chèvre et le mouflon, la maladie du dépérissement chronique chez le cerf et l'élan (Miller & Williams, 2004).

(3) les ESTs sporadiques, d'origine inconnue, dont la forme la plus observée est la maladie de Creutzfeldt Jacob (sMCJ ; 85% des patients atteints par la MCJ).

Les principales manifestations de neurodégénérescence induite dans l'encéphale par les prions sont les dépôts et l'accumulation de la protéine prion, la spongiose du tissu nerveux, la dysfonction neuronale, l'inflammation chronique de l'encéphale et enfin la mort neuronale (**Figure 7**). Ces atteintes touchent spécifiquement certaines régions de l'encéphale. En dépit de ces caractéristiques communes, de nombreux facteurs contribuent à l'hétérogénéité des maladies à prions incluant leur étiologie (origine familiale, infectieuse ou sporadique), la souche de prion, le génotype au codon polymorphique 129 du gène codant la protéine prion, des facteurs démographiques tels que l'âge et des paramètres cellulaires locaux encore mal connus.





**Figure 7. Anatomopathologie des maladies à prions.** Le cervelet de souris infecté par la souche de tremblante 22L présente des altérations caractérisées telles que les dépôts de PrP<sup>Sc</sup>, la spongiose et l'astrocytose du tissu nerveux et une perte importante des cellules de Purkinje. GFAP, *glial fibrillary acidic protein* ; CaBP, *calcium binding protein*. Echelle = 50  $\mu$ m.

### 5.1. Amyloïdogénèse

Les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> sont détectés *in situ* par le marquage au rouge Congo, le bleu Alcian, l'acide périodique de Schiff, diverses imprégnations métalliques et l'immuno-histochimie de PrP<sup>Sc</sup> (Brown et al., 1997c). Le patron et la morphologie des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> varient selon l'EST considérée et le génotype des patients et dans certains cas, comme dans l'insomnie fatale familiale, aucun dépôt de PrP<sup>Sc</sup> n'est observé (Budka et al., 1995). La localisation des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> est variable. PrP<sup>Sc</sup> se dépose au niveau synaptique, périvacuolaire, périneuronal, intraneuronal (dans le soma, les dépôts peuvent être étendus ou ponctiformes) ou en plaques. Les dépôts peuvent être associés aux neurones, aux astrocytes, aux cellules microgliales et à l'épendyme (Jeffrey et al., 2011). Dans de nombreux modèles, des dépôts périvacuolaires sont également visibles (Kovacs et al., 2002 ; Liberski & Ironside, 2005). Dans certaines formes familiales de MCJ (E200K), des travées perpendiculaires à la surface du cortex cérébelleux sont décrites (Jarius et al., 2003) et rappellent la compartimentation anatomofonctionnelle du cervelet. Ces travées et bandes sont observées dans le cervelet de modèles murins expérimentaux infectés par la souche de tremblante ME7 et 22L (Cunningham et al., 2005 ; Bruce et al., 1991). Cette morphologie particulière des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> en travées et en bandes dans le cervelet fait l'objet d'une étude détaillée chez des souris infectées par 22L dans ma thèse (§ Contributions expérimentales).

Dans des maladies à prions d'origine familiale comme la maladie de GSS, plusieurs mutations sont responsables du développement de la maladie. Dans la maladie de GGS associée à une mutation de *Prnp* à la position 102-129, des plaques uni- ou -multicentriques se forment dans la substance grise du cortex cérébral et dans le cervelet, en particulier dans la couche moléculaire. D'autres mutations telles que la mutation *Prnp* A117-129V, provoquent des dépôts diffus de PrP<sup>Sc</sup> dans le cortex cérébral, l'hippocampe, les ganglions de la base et le thalamus et peu de dépôts dans le cervelet. Dans l'insomnie fatale familiale, les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> sont dix fois moins importants que dans les autres ESTs. Dans le néocortex et de manière moins importante dans le système limbique et le striatum des patients, les taux de PrP<sup>Sc</sup> augmentent progressivement au cours de la progression

des symptômes et sont corrélés à l'apparition des changements spongiformes (Parchi et al., 1995). Dans l'insomnie fatale familiale d'origine sporadique, PrP<sup>Sc</sup> est accumulée autour des vaisseaux dans le thalamus, le cortex cérébral et en plaques dans le cervelet. Le thalamus est la région où l'accumulation est la plus forte (Piao et al., 2005).

Dans le cerveau de patients atteints de MCJ, l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> a lieu dans le cortex cérébral, les ganglions de la base et des aires du tronc cérébral telles que l'olive inférieure et dans le cervelet, dans la couche moléculaire et plus fortement dans la couche granulaire mais pas dans la couche des cellules de Purkinje. L'immunohistochimie montre l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> en plaques florides dans le cortex cérébelleux, et périneuronal dans le néocortex (Schulz-Schaeffer et al., 2000). Dans le cortex cérébral des patients atteints de la MCJ d'origine familiale, les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> sont diffus et synaptiques et, plus rarement, en amas périvacuolaires ou en plaques (Jarius et al., 2003). L'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> en travées et bandes dans la couche moléculaire du cervelet est détectée chez des patients atteints de la forme familiale de la MCJ E200K. Ce dépôt en travées est également observé dans deux cas présentant le polymorphisme M129M et un cas M129V dont le gène *Prnp* est délété ou silencieux au codon 129 (méthionine/valine ; M/V). Il n'est jamais décrit dans la MCJ d'origine sporadique (Jarius et al., 2003). A l'inverse, Armstrong & Cairns montrent que les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> suivent un patron topographique dans la couche moléculaire et granulaire du cervelet de patients atteints de MCJ sporadique, suggérant que les connexions du cervelet influencent la neuroinvasion par les prions (Armstrong & Cairns, 2003). Dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob d'origine familiale, associée à une insertion de 144 pb dans le gène *Prnp*, PrP<sup>Sc</sup> est distribuée en un patron de bandes parasagittales dans la couche moléculaire du cervelet qui est souvent associée à des dépôts synaptiques ou en plaques dans la couche granulaire et plus rarement dans la partie superficielle de la substance blanche, suggérant que la topographie des dépôts est influencée par l'anatomie du cervelet (King et al., 2003 ; Xiao et al., 2013a).

Les cerveaux de moutons infectés par la tremblante montrent de grandes variations de la morphologie des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> (Miller et al., 1993 ; Van Keulen et al., 1995 ; Foster et al., 1996 ; Ryder et al., 2001 ; Wemheuer et al., 2011 ; Moore et al., 2008). Ces derniers peuvent être focaux et ponctiformes, périneuraux, situés à la membrane neuronale, péri-vasculaires, intra-cellulaires dans les neurones et les astrocytes ou en plaques. Ils s'accumulent dans l'hippocampe et le cortex frontal et plus fortement dans le thalamus. Des dépôts radiaires sont décrits dans les cortex cérébral, la couche moléculaire du cervelet et le tronc cérébral et pourraient correspondre à des interneurons, des cellules étoilées ou à de la microglie active. PrP<sup>Sc</sup> est aussi accumulée en périphérie dans le noyau moteur dorsal du nerf vague (Miller et al., 1993 ; Van Keulen et al., 1995). L'accumulation progressive de PrP<sup>Sc</sup> à travers le cerveau a été décrite étape par étape au cours de la progression de la tremblante atypique Nor98. Elle est caractérisée par des dépôts ponctiformes de PrP<sup>Sc</sup> dans la substance grise qui diffèrent de ceux observés dans le cerveau infecté par des souches de tremblantes « classiques. » L'invasion séquentielle de PrP<sup>Sc</sup> telle que décrite dans le cas de la tremblante classique n'est pas retrouvée dans le cerveau de mouton infecté par Nor98 (Wemheuer et al., 2011). La corrélation entre la morphologie des plaques et les régions du cerveau a été analysée en détail dans le cerveau de moutons atteints par la tremblante atypique. Les dépôts sont globulaires, granulaires, périneuraux et en plaques. L'accumulation est la plus intense dans le cervelet, la substance noire, le thalamus et les noyaux de la base (Moore et al., 2008).

Comme chez l'homme, l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le SNC de souris est progressive. Par exemple, dans le cerveau de souris C57Bl6/J infectées par ME7 i.c., PrP<sup>Sc</sup> se dépose d'abord dans le thalamus antérieur –30 jours post-infection (jpi) –, puis dans les noyaux du tronc cérébral et le cortex rostral –60 jpi –, dans le cortex frontal et l'hippocampe –90 jpi –, dans les colliculi et le cortex cérébral –120 jpi– et enfin dans de nombreuses aires

cérébrales dont le cervelet<sup>12</sup>. Les marquages les plus intenses sont observés dans le cortex frontal, l'hippocampe, les colliculi inférieurs et le cervelet. Les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> sont péri-neuronaux et granulaire dans le néocortex, dans les couches profondes et superficielles respectivement. Dans le cervelet, PrP<sup>Sc</sup> est déposé dans la couche moléculaire et plus fortement dans la couche granulaire et des plaques sont détectées dans la substance blanche (Schulz-Schaeffer et al., 2000). Ceci indique que l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le SNC s'effectue dans certaines régions cérébrales plus sensibles à la neurotoxicité de PrP<sup>Sc</sup>, suggérant que les connexions entre les régions et des paramètres locaux influencent la neuroinvasion du SNC par PrP<sup>Sc</sup>.

La souche de prion semble un facteur important dans la neuroinvasion et la neurotoxicité des prions. Par exemple, le patron des dépôts est différent dans deux modèles murins expérimentaux de même génotype, l'un infecté par la souche de tremblante ME7 et l'autre par 87V. Des dépôts diffus de PrP<sup>Sc</sup> sont trouvés dans le cerveau infecté par ME7 avec des variations d'intensité en fonctions des aires, tandis que l'infection par 87V est plus ciblée et l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> est plus intense dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le striatum et les aires périventriculaires où elle n'est pas corrélée à la spongiose et dans le noyau ventral du thalamus, le pallidum ventral, la substance noire, l'habenula médial, le noyau dorsal du raphé, l'olive supérieure et inférieure et le noyau cochléaire où elle est corrélée à un taux élevé de spongiose (Bruce et al., 1989). La comparaison du patron des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> des souches de tremblante ME7, 79A et 22L montre des dépôts granulaires et ponctiformes ou en plaques larges et denses dans l'hippocampe, le gyrus denté, le noyau du raphé dorsal et le thalamus. Contrairement aux souches ME7 et 79A, les dépôts de 22L dans la corne d'Ammon 1 de l'hippocampe sont plus diffus et confinés dans le *stratum oriens* et *stratum radiatum*. Alors que 22L s'accumule dans le cervelet, le groupe de Hilton qui se place à un stade précoce de la maladie ne distingue pas de dépôts dans le cervelet infecté par ME7 et 79A (Hilton et al., 2013 ; Cunningham et al., 2005). En phase clinique avancée, les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> sont plus importants dans l'hippocampe, le thalamus et le cervelet pour ME7 > 22L > 79A. Aussi, les dépôts de 22L sont importants dans le tronc cérébral, le pédoncule cérébelleux moyen, le noyau cochléaire postérieur et le noyau denté latéral (Cunningham et al., 2005). Les dépôts focaux, péri-neuronaux et granulaires de PrP<sup>Sc</sup> dans le neuropile de la couche pyramidale de la corne d'Ammon 1 et 2 de l'hippocampe sont également décrits chez des souris infectées par la souche 301V (Williams et al., 1997). Ces données indiquent que la souche de prion influence l'accumulation et la toxicité de PrP<sup>Sc</sup> dans certaines aires cérébrales spécifiques.

## 5.2. Inflammation du système nerveux central

L'inflammation implique une cascade d'évènements humoraux et cellulaires consécutifs à une atteinte du tissu et inclue les réponses cellulaires innées (activation des macrophages et production de cytokines) et adaptatives (activation des lymphocytes T et production d'anticorps). On distingue l'inflammation aiguë de l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est une réaction de défense immédiate et précoce à l'agression. Lorsque le facteur déclenchant la stimulation de l'inflammation persiste, l'inflammation est chronique et devient délétère pour les neurones.

Dans les maladies à prions, à la fois naturelles et expérimentales, l'inflammation du SNC est reflétée par l'activation des cellules microgliales, les macrophages innés résidents du SNC et par la prolifération des astrocytes dans les zones atteintes et survient peu après l'apparition des premiers dépôts de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau (Prusiner,

<sup>12</sup> A noter dans le déroulement temporel de l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup>, que l'apparition des signes cliniques survient à 177 jpi, après l'invasion du cerveau par PrP<sup>Sc</sup> (Schulz-Schaeffer et al., 2000).

1994). L'inflammation du SNC est un mécanisme participant à la mort neuronale dans ces maladies (Brown & Neher, 2010). Les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou les maladies à prions présentent une activation microgliale et une augmentation des cytokines dans le SNC et dans le sang (Peyrin et al., 1999). A l'instar de la maladie d'Alzheimer, une inflammation systémique survient dans les maladies à prions, PrP<sup>Sc</sup> s'accumulant dans les organes lymphoréticulés tels que la rate. Afin de savoir si l'inflammation systémique provoque l'inflammation chronique du SNC, du lipopolysaccharide (LPS) est administré par voie intrapéritonéale aux souris infectées par la tremblante ME7, avant l'apparition des symptômes cliniques de la maladie, pour reproduire les effets d'une inflammation systémique (Combrinck et al., 2002). L'injection périphérique de LPS exacerbe les déficits cognitifs et moteurs, accentue la perte neuronale et accélère la progression de la maladie (Combrinck et al., 2002 ; Cunningham et al., 2005, 2009). Le mécanisme sous-jacent à l'exacerbation de la maladie est encore mal connu. La réponse systémique accrue représente-t-elle une réponse aux prions ou est-elle provoquée par l'inflammation du SNC ? Aucune augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), ni l'activation des macrophages ne surviennent dans la rate des animaux infectés par les prions, en dépit d'une forte accumulation de PrP<sup>Sc</sup> et d'une forte neurodégénérescence, suggérant que ni la neurodégénérescence ni les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> ne sont suffisants pour induire une inflammation systémique (Cunningham et al., 2005). L'injection de LPS est accompagnée d'une forte expression des cytokines IL-1 dans le cerveau des souris infectées par les prions, suggérant une éventuelle influence de l'inflammation systémique sur l'inflammation centrale. Dans la maladie d'Alzheimer, l'injection périphérique de LPS à des modèles murins transgéniques exacerbe la pathologie (Kitazawa et al., 2005) et la déposition amyloïde (Brugg et al., 1995). L'exacerbation de la maladie d'Alzheimer par l'inflammation systémique et l'augmentation des concentrations de la cytokine IL-1 $\beta$  a également été démontrée chez l'homme (Holmes et al., 2003). Aussi, IL-1 $\beta$  exacerbe la neurodégénérescence et les déficits moteurs dans des modèles murins de la maladie de Parkinson (Pott Godoy et al., 2008). Ces résultats soulignent l'importance de l'inflammation systémique dans les maladies neurodégénératives et soulèvent de nombreuses questions quant à la nature de l'interaction entre les compartiments inflammatoires systémiques et centraux chez les modèles murins expérimentaux de ces maladies et chez les patients.

### 5.2.1. L'activation microgliale

Dans le cerveau de patients atteints par la MCJ et dans des modèles murins expérimentaux des maladies à prions, le premier changement observé est l'apparition de dépôts de PrP<sup>Sc</sup> dans une aire spécifique, suivie ou précédée par l'activation microgliale qui progresse ensuite jusqu'aux stades avancés de la maladie (Williams et al., 1994, 1997 ; Giese et al., 1998 ; Betmouni & Perry, 1999b ; Jeffrey et al., 2000 ). Chez l'homme, les marqueurs de la microglie sont détectés par immunohistochimie dans le cerveau de patients atteints de MCJ et de façon plus importante que dans le cerveau de patients Alzheimer (Wojtera et al., 2012). L'activation microgliale est associée aux dépôts de PrP<sup>Sc</sup> et semble nécessaire à la neurotoxicité (Puoti et al., 2005 ; Giese et al., 1998). L'activation microgliale est dépendante des chémokines par l'activation de récepteurs spécifiques couplés aux protéines G. Dans des expériences *in vitro* et *in vivo*, l'exposition à PrP<sup>Sc</sup> induit la sur-régulation de la chemokine RANTES par la voie MAPkinase-ERK1/2 provoquant la phosphorylation du facteur de transcription Egr-1 de RANTES. Ceci entraîne la migration rapide des cellules microgliales par l'activation du récepteur CCR5 (chemokine receptor 5) (Marella et al., 2004, 2005).

Les cellules microgliales jouent un rôle de surveillance immunitaire et de défense et sont très sensibles aux variations de leur microenvironnement. Avec leur morphologie ramifiée, elles sont capables de se disséminer à travers le SNC et communiquer entre elles, avec les neurones et les cellules gliales. Dans les maladies à prions ainsi que la la maladie d'Alzheimer, les cellules microgliales répondent à l'atteinte neuronale provoquée par les oligomères toxiques et s'activent, changent leur morphologie et migrent sur le site de l'atteinte pour éliminer les débris cellulaires par phagocytose, prévenant ainsi l'atteinte neurotoxique de PrP<sup>Sc</sup>. L'ablation pharmacologique de la microglie augmente le taux de PrP<sup>Sc</sup> dans les cultures organotypiques de cervelet et la susceptibilité à l'infection par les prions (Falsig et al., 2008). Aussi, le peptide PrP(106-126) et PrP<sup>Sc</sup> stimulent les cellules microgliales et augmentent leur activité phagocytaire (Ciesielski-Treska et al., 2004). Cependant, une activation microgliale prolongée entraîne une inflammation chronique, provoquant la mort neuronale par la libération de cytokines et chemokines pro-inflammatoires, d'eicosanoïdes, de composés réactifs à l'oxygène, de protéases et de protéines du complément (Chiarini et al., 2006 ; Brown et al., 1996 ; Bate et al., 2001 ; Kreutzberg, 1996 ; Block et al., 2007).

### 5.2.2. Astroglie

Bien que les astrocytes aient longtemps été considérés comme des cellules passives de soutien, de nombreuses évidences indiquent aujourd'hui que les astrocytes participent aux performances du SNC. Ils s'étendent et se ramifient et établissent de nombreuses connections avec les populations cellulaires adjacentes telles que les neurones, d'autres astrocytes et les vaisseaux sanguins (Brambilla et al., 2013) et sont capables de fournir des métabolites énergétiques aux neurones (Bélanger et al., 2011), de réguler le flux sanguin et la barrière hématoencéphalique (Quaeghebeur et al., 2011) et de contrôler la concentration d'ions extracellulaires, de neurotransmetteurs et de fluides (Danbolt, 2001 ; Kofuji & Newman, 2004 ; Simard & Nedergaard, 2004).

Dans de nombreuses maladies neurodégénératives, les astrocytes s'activent et changent leur morphologie et leurs propriétés biochimiques. Cette condition est appelée « astrocytose réactive. » Les astrocytes réactifs synthétisent de nombreuses enzymes et cytokines dont, par exemple, le TNF- $\alpha$  et des prostaglandines qui contrôlent la libération de glutamate dépendante de Ca<sup>2+</sup> par les astrocytes (Santello et al., 2011 ; Bezzi et al., 1998, 2001 ; Domercq et al., 2006). Cette libération a été impliquée dans la mort cellulaire excitotoxique de cultures mixtes neurones-glie (Bezzi et al., 2001). De plus, les variations de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> qui contrôlent la libération de glutamate par les astrocytes et synchronisent l'activité neuronale au sein d'un même réseau qui sont fréquentes chez les astrocytes quiescents sont inexistantes chez les astrocytes réactifs *in situ* (Aguado et al., 2002). Dans les maladies à prions, la libération de glutamate diminue après la stimulation par la cytokine TNF- $\alpha$  de tranches d'hippocampe infectées par RML (Brambilla et al., 2013). Ceci suggère que les astrocytes réactifs sont capables de perturber les fonctions neuronales en conditions pathologiques.

Dans les maladies à prions, des astrocytes hypertrophiés ont d'abord été décrits par des techniques d'imprégnations métalliques et plus récemment par le marquage de la protéine GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) associée au cytosquelette dans les aires de spongiose. Lorsque la dégénérescence et la mort neuronale sont importantes, l'astroglie prolifère et remplace les éléments cellulaires. La prolifération astrogliale est forte dans les couches profondes du cortex cérébral. Dans le cervelet, la prolifération de la glie de Bergman est fréquente dans de nombreux cas d'EST. Une corrélation entre la déposition de PrP<sup>Sc</sup> et la prolifération de la glie a été décrite dans de nombreux cas d'EST (DeArmond et al., 1987, 1993 ; Giese et al., 1998). L'exposition au peptide PrP(82-146), un modèle de mutation de PrP<sup>C</sup> dans la maladie de GSS, entraîne une importante prolifération astrocytaire

et la mort des neurones corticaux de rat en culture (Fioriti et al., 2007). Les astrocytes synthétisant de nombreuses cytokines proinflammatoires dans le cerveau de modèles animaux expérimentalement infectés par les prions et de patients atteints d'EST (Campbell et al., 1994 ; Kim et al., 1999 ; Tribouillard-Tanvier et al., 2009), il reste à savoir si les astrocytes contribuent à la progression ou à la protection des neurones dans les maladies à prions.

### 5.3. Spongiose

La spongiose du tissu nerveux central est une signature pathologique spécifique des maladies à prions. Des observations en microscopie électronique par transmission montrent des vacuoles de 5 à 40  $\mu\text{m}$  se formant dans le neuropile, dans les dendrites et plus rarement dans les axones, myélinisés ou non, et dans le soma des neurones (Jeffrey et al., 1992). Les vacuoles sont toujours liées à la membrane et contiennent des vacuoles secondaires et du matériel « pelucheux » de composition inconnue. Les vacuoles peuvent être entourées d'une simple ou double membrane bien que les grandes vacuoles en soient dépourvues ou alors la membrane présente des discontinuités. Les vacuoles ont également été décrites après l'observation du tissu en microscopie électronique à balayage qui montre des altérations membranaires, des membranes amorphes et des petites vésicules qui correspondent à celles observées par microscopie électronique par transmission (Chou et al., 1980). Un second type de grandes vacuoles est trouvé dans la gaine de myéline contenant des axones endommagés, remplis de neurofilaments et de corps denses aux électrons (Liberski et al., 1989).

La distribution des vacuoles dans le SNC et l'intensité de la spongiose dépendent de l'hôte (espèce, fond génétique) et de la souche de prion. Chaque souche de prion va en effet provoquer une spongiose précise chez l'homme et chez l'animal, ainsi qu'expérimentalement chez les souris de différents fonds génétiques (Fraser & Dickinson, 1973). La distribution des vacuoles est bilatérale et symétrique dans l'encéphale (Fraser, 1979). Cependant, des lésions asymétriques peuvent se développer dans le cerveau de souris injectées avec certaines souches de prion (87A, 31A, 125A) par la voie intra-cérébrale et intra-péritonéale (Bruce & Fraser, 1982). La spongiose sera également asymétrique dans le colliculus contralatéral après l'injection intra-oculaire de la souche ME7 chez la souris (Fraser, 1982). Les caractéristiques de ces vacuoles ont été utilisées pour classifier les différentes souches de prion (Betmouni et al., 1999a).

Spongiose et infectivité ne semblent pas corrélées. En 1985, Cole & Kimberlin montrent chez des souris (Compton White) infectées par la souche de prion 139A (i.p.) que la vacuolisation est d'abord détectée dans le tronc cérébral et ne progresse qu'ensuite vers d'autres régions de l'encéphale. Ces régions présentent déjà un niveau important d'infectiosité avant l'apparition de la spongiose. Aussi, de nombreuses régions où la vacuolisation n'est pas détectée sont dégénérescentes. L'immunohistochimie montre que PrP<sup>Sc</sup> s'accumule avant la spongiose qui n'apparaît qu'à un stade plus avancé de la maladie (Hadlow et al., 1974 ; Cole & Kimberlin, 1985 ; Fraser & Dickinson, 1967, 1973)<sup>13</sup>.

La nature, l'origine et le développement des vacuoles dans les ESTs sont encore controversés. Baker et al (1990) suggèrent que les vacuoles à simple membrane présentes dans les dendrites et les axones dans le cerveau de singes atteints par les ESTs, proviennent du réticulum endoplasmique lisse (REL) dilaté. Cependant, il n'explique pas l'origine des vacuoles à double membrane présentes dans les neurites qui ne sont

<sup>13</sup> Il existe de rares variants d'ESTs où la spongiose est limitée et focale tels que l'insomnie fatale familiale chez laquelle la spongiose est confinée dans certains noyaux thalamiques (Liberski & Ironside, 2005).

vraisemblablement pas originaires du REL. La perturbation du cytosquelette (microtubules, neurofilaments) entraînerait l'arrêt du mécanisme de transport dans les neurites provoquant le gonflement d'organites (REL, mitochondries) et pourrait être à l'origine de la spongieuse. Cette hypothèse reste cependant partielle et ne prend pas en compte la présence de vacuoles dans la myéline détectée en microscopie électronique par transmission (Jeffrey et al., 1992). Il est intéressant de constater que l'accumulation de lipides dans le cerveau de souris ne correspond pas à la distribution des vacuoles, suggérant que leur formation ne requiert pas la néosynthèse de lipides (Mackenzie & Wilson, 1966). Une autre possibilité est que la formation de canaux dans les membranes lipidiques par le peptide neurotoxique PrP(106-126) ou PrP<sup>C</sup> augmente la perméabilité membranaire, perturbant les gradients ioniques et provoque une augmentation de la pression osmotique des organites (Kourie, 2002). Ceci pourrait provoquer le gonflement des compartiments acides tels que les lysosomes contenant PrP<sup>Sc</sup> et mènerait à la formation des vacuoles.

#### **5.4. Altération des systèmes de neurotransmission, atrophie dendritique et perte synaptique**

La diminution progressive du nombre de synapses causée par la dégénérescence des compartiments présynaptiques, la perte des épines dendritiques et la perturbation de la plasticité synaptique sont décrites chez les patients et dans de nombreux modèles murins infectés par les prions.

##### **5.4.1. Dégénérescence synaptique et perte des épines dendritiques**

La diminution des concentrations de protéines synaptiques telles que la synaptophysine, p38, la synaptosomal-associated protein (SNAP-25), la syntaxine-1, la synapsine-1, l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -synucléine et Rab3a implique que la transmission synaptique est modifiée chez les patients atteints d'EST (Clinton et al., 1993 ; Ferrer et al., 2000 ; Sísó et al., 2002 ; Russelakis-Carneiro et al., 2004). Des altérations synaptiques sont détectées chez l'homme aux premiers stades de la maladie. L'imprégnation de Golgi réalisée dans des biopsies cérébrales de deux patients atteints de MCJ met en évidence la perte des épines dendritiques des cellules pyramidales du cortex cérébral avant la mort neuronale et montre des distensions des dendrites et des axones (Landis et al., 1981). Ces changements sont aussi observés dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe de modèles animaux infectés expérimentalement par la tremblante (Landis et al., 1981 ; Hogan et al., 1987 ; Brown et al., 2001). Aussi, une perte des épines dendritiques et l'altération de la morphologie des épines des cellules de Purkinje sont décrites dans des cultures organotypiques de cervelet de souris Tga20 infectées par la souche RML (Campeau et al., 2013).

Des cas de patients atteints de maladie à prions d'origine génétique, provoquée par des insertions dans les répétitions d'octapeptides de PrP<sup>C</sup>, présentent une perte synaptique importante alors que les corps cellulaires sont préservés, suggérant que la perte synaptique précède la mort neuronale (Clinton et al., 1993). Ces données sont confirmées chez la souris transgénique Tg(PG14) exprimant une PrP<sup>C</sup> mutée dans les répétitions d'octapeptides (Senatore et al., 2012). Dans des modèles murins infectés par différentes souches de prion, le marquage immunohistochimique de la synaptophysine qui marque les terminaisons présynaptiques a été utilisé pour démontrer une perte synaptique quantifiée notamment dans l'hippocampe infecté par ME7, 22L et 79A, dans le thalamus ventral, postérolatéral et médial infecté par ME7 et 79A et dans les lobules simple et crus du cervelet infecté par 22L et ME7 (Cunningham et al., 2003 ; Hilton et al., 2013). La dégénérescence synaptique a été

décrite dans l'hippocampe de souris infectées par la souche ME7, 87V, RML, 79A, et 22L et survient avant la mort des neurones pyramidaux (Belichenko et al., 2000 ; Jeffrey et al., 2000 ; Brown et al., 1997b, 2001 ; Mallucci et al., 2007 ; Gray et al., 2009 ; Sisková et al., 2009 ; Hilton et al., 2013). Jeffrey et al décrivent en effet la première dégénérescence axonale et la perte synaptique dans l'hippocampe passé 34-42% de la période d'incubation dans le cerveau de souris de génotype C57Bl/6J x VM/Dk infectées par ME7, tandis que la mort neuronale survient passé 72% de la période d'incubation (Jeffrey et al., 2000). La neurodégénérescence synaptique peut par ailleurs être corrélée aux changements comportementaux observés chez la souris tels que le déficit de reconnaissance d'objet, l'activité motrice perturbée détectée lors des tests d'*open-field*, les problèmes moteurs ou encore la diminution de la consommation de glucose (Cunningham et al., 2003 ; Mallucci et al., 2007 ; Senatore et al., 2012 ; Hilton et al., 2013). Dans le cervelet, des protéines synaptiques s'accumulent dans le soma et l'axone des cellules de Purkinje suggérant un déficit du transport axonal dans des modèles murins infectés par la tremblante (Ferrer, 2002 ; Sisó et al., 2002). Les mécanismes sous-jacents à la perte des épines dendritiques et aux déficits synaptiques dans les maladies à prions sont encore mal-connus et pourraient être causés par la perte de PrP<sup>C</sup> du fait de sa conversion en PrP<sup>Sc</sup> et/ou de la présence de PrP<sup>Sc</sup> neurotoxique.

Les terminaisons présynaptiques sont le site initial de la dysfonction synaptique, suivie par la perte dendritique et ces deux altérations précèdent la mort neuronale (Belichenko et al., 2000 ; Jeffrey et al., 2000 ; Landis et al., 1981 ; Fuhrmann et al., 2007 ; Gray et al., 2009 ; Hilton et al., 2013). La perte dendritique est corrélée à l'apparition de la spongiose aux premiers stades de la maladie. Bien que son mécanisme ne soit pas encore bien défini, des changements de l'expression et du clivage de la protéine Notch-1 impliquée lors du développement dans la croissance et la maturation dendritique sont détectés *in vivo* chez des souris infectées par la tremblante et *in vitro* dans des cultures de cellules N2A (Ishikura et al., 2005). L'absence de PrP<sup>C</sup> du fait de sa conversion en PrP<sup>Sc</sup> altère la neurotransmission glutamatergique, sérotoninergique et dopaminergique et de façon moins importante, la transmission GABAergique.

#### 5.4.2. Régulation de la neurotransmission

Chez les souris transgéniques Tg(PG14) mentionnées plus haut qui expriment une PrP<sup>C</sup> mutée dans la répétition d'octapeptides, les déficits moteurs précèdent la perte synaptique et sont associés à l'altération de la neurotransmission glutamatergique dans les cellules granulaires du cervelet du fait d'une perturbation de l'influx de calcium à travers les canaux calcium voltage-dépendants (Senatore et al., 2012). D'autres travaux montrent que PrP<sup>C</sup> module l'expression des récepteurs NMDA et kainate (Khosravani et al., 2008), augmentant l'excitotoxicité liée au glutamate et l'excitabilité des neurones et suggérant une perturbation de la potentialisation à long terme (LTP). En effet, des données pionnières d'électrophysiologie ont établi que les souris *knock-out* pour le gène *Prnp* perdent leur capacité d'entrer en LTP (Collinge et al., 1994 ; Curtis et al., 2003). De même, l'enregistrement électrophysiologique de tranches aigües d'hippocampe de souris infectées par la souche de prion ME7 montre une diminution de la LTP comparée aux sauvages (Chiti et al., 2006), ce qui suggère que PrP<sup>C</sup> contrôle la plasticité synaptique.

La neurotransmission glutamatergique n'est pas la seule atteinte. Des perturbations psychiatriques et du comportement (dépression, anxiété, insomnie, symptômes de douleur et d'hallucination) surviennent chez des patients atteints de variants de la MCJ (Zeidler et al 1997 ; Henry et al., 2002 ; Spencer et al., 2002), suggérant un déficit de la transmission sérotonergique. L'analyse de la taille des neurones exprimant l'enzyme tryptophane hydroxylase dans le raphé dorsal montre que celle-ci augmente chez les patients atteints de MCJ et FFI,



suggérant une hyperactivité du système sérotonergique à l'origine des symptômes psychiatriques observés (Wanschitz et al., 2000 ; Fraser et al., 2003). Au contraire, chez des hamsters infectés par la souche 263K, la concentration en sérotonine diminue (Bareggi et al., 2003). De même chez des souris infectées par la souche d'encéphalopathie spongiforme bovine 6PB1 : la technique d'HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) mesure une diminution significative de la sérotonine dans le cerveau des souris infectées et cette diminution est corrélée à une perturbation du rythme circadien et à une hyperalgésie. De plus, une perte significative des neurones sérotonergiques dans le noyau du raphé est quantifiée chez les souris infectées par 6PB1 et chez des souris déficientes en PrP<sup>C</sup> (Vidal et al., 2009).

La concentration d'un autre neurotransmetteur aminergique, la dopamine, est diminuée dans le striatum de rats infectés par la tremblante (Bassant et al., 1986). La concentration de dopamine diminue dans le cortex préfrontal de souris déficientes en PrP<sup>C</sup>. La colocalisation de PrP<sup>C</sup> avec les neurones et les synapses dopaminergiques dans le striatum suggère un rôle important de PrP<sup>C</sup> dans ces neurones (Rial et al., 2014).

Des souris transgéniques exprimant PrP<sup>C</sup> tronquée de son groupement GPI présentent une augmentation de l'inhibition GABAergique et une diminution de la capacité des neurones d'entrer en LTP, corrélée à une diminution de l'apprentissage au test de Barnes (Trifilo et al., 2008). L'infection d'hamsters syriens par la souche de prions Sc237 entraîne la disparition de nombreux boutons synaptiques terminaux et l'altération de la libération de GABA (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004). Un déficit de la transmission GABAergique n'est pourtant pas détecté avec d'autres souches de prions comme 22L (Quinn et al., 1988) et 139A (Iqbal et al., 1985).

## 5.5. Mort neuronale

La mort neuronale est une conséquence caractéristique des maladies à prions. Chez l'homme et dans des modèles expérimentaux des maladies à prions, le stress oxydatif, l'apoptose et l'autophagie sont activés et contribuent à la mort neuronale. Celle-ci est corrélée à l'astroglie, l'activation microgliale et les dommages axonaux (Budka, 2003). Chaque ESTs possède un tropisme neuronal différent dans les aires cérébrales, chez l'homme et l'animal. Le thalamus, le cortex cérébral et le cervelet sont les structures le plus fréquemment touchées, suggérant l'existence de facteurs de vulnérabilité des neurones aux prions.

La maladie de Creutzfeldt-Jakob a des origines familiales (polymorphisme M/V au codon 129 de *Prnp*) ou sporadiques. Dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob d'origine sporadique, la perte des cellules du noyau basal de Meynert, des cellules granulaires du cervelet et de manière moins importante des cellules de Purkinje est détectée (Budka, 2000 ; Yang et al., 1999). Malgré le lien anatomique existant entre les cellules de Purkinje et les cellules granulaires, aucune corrélation n'est décrite entre la mort de ces deux types cellulaires dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Yang et al., 1999). Dans le variant de la maladie de MCJ, une perte des cellules de Purkinje et des cellules granulaires est quantifiée dans le cervelet, ainsi que dans le thalamus médial et l'olive inférieure (Parchi et al., 2011 ; Armstrong et al., 2009 ; Faucheux et al., 2009, 2011 ; Choi et al., 2011). La perte neuronale dans la MCJ d'origine familiale concerne l'hippocampe, le thalamus et de manière moins importante, le cervelet (Moda et al., 2012 ; Kim et al., 2013 ; Shimizu et al., 2009). Dans la maladie de GSS, une perte importante des cellules de Purkinje et des neurones des noyaux profonds (noyau denté) survient dans le cervelet (Yang et al., 1999). Dans l'insomnie fatale familiale, la mort neuronale est décrite dans le thalamus et le cortex cérébral, le striatum et l'amygdale (Piao et al., 2005).

Dans les modèles murins expérimentaux des maladies à prions, la mort neuronale est importante au cours de la progression de la maladie. Dans le cerveau de souris infectées par ME7, une perte importante des neurones (95%) survient dans le noyau géniculé dorsal latéral (Jeffrey et al., 1995). La mort neuronale par apoptose a lieu dans le cortex cérébral, le striatum, l'hippocampe et le cervelet de souris infectées par la souche 301V, 87V, 22A et ME7 (Lucassen et al., 1995 ; Williams et al., 1997 ; Fraser et al., 1996). Le groupe de Fraser (1996) rapporte également la mort des photorécepteurs de la rétine après l'infection des souris par ME7. L'infection par la souche 87V entraîne une perte neuronale restreinte à la corne d'Ammon 2 dans l'hippocampe, tandis qu'une mort importante est détectée dans la corne d'Ammon 1 infectée par ME7 (Jeffrey et al., 2000 ; Jamieson et al., 2001). Chez les souris infectées par ME7, 22L ou 79A, une perte importante des neurones du thalamus est quantifiée dans de nombreux noyaux incluant les noyaux géniculés latéraux dorsaux, les noyaux médians et latéraux rostraux postérieurs et le groupe postérieur (Cunningham et al., 2005). Le comptage des neurones pyramidaux de CA1 et des cellules de Purkinje du cervelet montrent une perte neuronale massive. Dans un modèle expérimental de la MCJ (souche Fujisaki), la perte neuronale par apoptose a été mesurée dans de nombreuses aires cérébrales telles que le cortex cérébelleux, le cortex cérébral, le colliculus supérieur, le thalamus, l'hypothalamus et la moelle dorsale (Jesionek-Kupnika et al., 2001). Ces résultats indiquent que des aires cérébrales sont spécifiquement atteintes par la neurotoxicité des prions et ce, en fonction de la souche de prion.

### 5.6. Spécificité neuronale de la vulnérabilité aux prions

De nombreuses évidences indiquent que certains types neuronaux meurent préférentiellement dans les maladies à prions. Par exemple, la perte de cellules GABAergiques a été décrite chez des hamsters infectés par la tremblante dans le thalamus et le cortex cérébral (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004) et chez des chèvres naturellement atteintes par la tremblante, dans le cervelet, le striatum et le thalamus. Les neurones GABAergiques exprimant la parvalbumine, un chélateur du calcium, sont plus sensibles à l'infection par les prions chez l'homme (Guentchev et al., 1997 ; Belichenko et al., 1999) et dans des modèles expérimentaux de maladies à prions (Guentchev et al., 1998). Cette vulnérabilité est précoce après l'infection et représente un des premiers changements détectés après l'infection (Guentchev et al., 1998). Des études plus récentes montrent chez des souris déficientes en parvalbumine infectées par la souche de tremblante 139A, que la parvalbumine elle-même n'est pas directement impliquée dans le mécanisme de mort neuronale et n'est qu'un marqueur des neurones plus sensibles aux effets neurotoxiques des prions (Voigtländer et al., 2008).

La neurotoxicité de PrP<sup>Sc</sup> touche également les régions cérébrales riches en sérotonine et en particulier le mésencéphale (Fraser et al., 2003 ; Vidal et al., 2009). Les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé subissent une perte importante chez les souris infectées par la souche d'ESB 6PB1 au stade clinique de la maladie (Vidal et al., 2009). L'atteinte du système sérotoninergique résulte en la diminution de la concentration de sérotonine dans le SNC et le sang (Brun et al., 1971 ; Rohwer et al., 1981 ; Bareggi et al., 2003 ; Vidal et al., 2009), en des variations de l'activité de l'enzyme de synthèse de la sérotonine, la tryptophane hydroxylase (Fraser et al., 2003 ; Wanschitz et al., 2000), la réduction des récepteurs et du transporteur de la sérotonine (Fraser et al., 2003 ; Klöppel et al., 2002).

## Chapitre I

### Principaux points évoqués

- La conversion de la protéine prion cellulaire de l'hôte en protéine prion pathologique amyloïde  $\beta$ -plissée qui s'accumule dans des régions cérébrales spécifiques est le mécanisme central des maladies à prions.
- La protéine prion cellulaire fixée par un groupement GPI dans des radeaux lipidiques de la membrane plasmique forme avec différents ligands un complexe macromoléculaire qui est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation neuroprotectrices.
- Les maladies à prions sont caractérisées par la spongiose du tissu nerveux, l'inflammation du SNC traduite par l'activation microgliale et la prolifération des astrocytes, l'atrophie dendritique, la perte synaptique et la mort neuronale.
- La neurotoxicité des prions infectieux affecte des populations neuronales spécifiques en fonction de la souche de prion et de paramètres cellulaires locaux encore mal connus qui influencent la pathogenèse des prions.

# CHAPITRE II

## Mécanismes de mort neuronale

---

La mort cellulaire est un processus indispensable à l'homéostasie des tissus et de l'organisme, permettant d'éliminer les cellules surnuméraires lors du développement, les cellules dysfonctionnelles, les cellules ectopiques ou encore les cellules infectées par un virus ou une bactérie (Levine et al., 1993). Les voies de mort cellulaire sont classées selon des critères enzymologiques (implication ou non de nucléases ou de protéases telles que les caspases, les calpaïnes, les cathepsines et les transglutaminases), morphologiques (apoptose, autophagie, nécrose...), des aspects fonctionnels (physiologique versus pathologique, programmée versus accidentelle) ou des caractéristiques immunologiques (immunogénique ou non) (Kroemer et al., 2009 ; Galluzzi et al., 2011). L'activation inappropriée de la mort cellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Loo et al., 1993 ; Su et al., 1994), de Parkinson (Singh & Dikshit, 2007) ou les maladies à prions (Giese et al., 1995). Par ailleurs, la suppression de l'apoptose est une des signatures de nombreux types de cancers (Hanahan & Weinberg, 2000) et intervient lors de maladies auto-immunes (Thompson, 1995).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes de mort neuronale activés dans les maladies à prions et en particulier la voie autophagique et la voie apoptotique. Nous verrons que considérer la voie autophagique comme un mécanisme de mort neuronale est aujourd'hui vivement contesté. Elle entre pourtant en jeu dans de nombreuses pathologies, d'abord comme un mécanisme protecteur mais sa dérégulation peut mener à l'apoptose. En effet, elle peut être le mécanisme précurseur de l'apoptose ou devenir un processus de digestion destructeur qui dégrade par exemple des facteurs de survie ou des inhibiteurs de l'apoptose, activant ainsi la cascade apoptotique. L'autophagie jouerait donc un rôle soit protecteur soit destructeur et la balance entre les deux est à considérer lors de l'élaboration de stratégies thérapeutiques. L'apoptose est un mécanisme de mort neuronale programmé induit par des signaux internes ou externes à la cellule. Je décrirai ces deux voies dans ce chapitre.

### 1. L'apoptose : mort programmée de type I

L'apoptose est un processus complexe essentiel au développement et au maintien de nombreux tissus. Aussi, il s'agit d'un mécanisme de défense consécutif à des réactions immunes et qui intervient lorsque les cellules sont endommagées (revues : Gimsa et al., 2013 ; Norbury & Hickson, 2001). Une cellule s'engage dans un processus de mort apoptotique lorsqu'elle atteint une phase irréversible définie par des critères biochimiques tels que l'activation massive des caspases<sup>14</sup>, la perte de la perméabilité transmembranaire mitochondriale, la libération d'enzymes catalytiques ou d'activateurs de ces enzymes ou si la cellule présente au moins un des critères moléculaires et morphologiques suivants définis par le Comité de Nomenclature de la Mort Cellulaire de

---

<sup>14</sup> Il existe plusieurs types de mort cellulaire n'impliquant pas les caspases (Garrido & Kroemer, 2004).

2012 (*Nomenclature Committee on Cell Death*) : la perte de son intégrité membranaire, la fragmentation cellulaire et nucléaire qui forme les « corps apoptotiques » ou la phagocytose de ces corps par une cellule adjacente (Galluzzi et al., 2012). Bien que la capacité d'autodestruction des cellules ait été découverte au XIX<sup>ème</sup> siècle (Vogt, 1842)<sup>15</sup>, le groupe de Kerr introduit en 1972, le terme « apoptose » (du grec *απόπτωσης*, *apo-* : « loin de » et *-ptosis* : « chute ») pour désigner la mort cellulaire déclenchée par le tissu en conditions physiologique ou pathologique. L'analyse en microscopie électronique par transmission de la glande surrénale de rat au stade embryonnaire montre la formation de corps apoptotiques à partir de la condensation du noyau (chromatine, ADN) et du cytoplasme (organites) suivie de la fragmentation de l'ADN par des endonucléases dépendantes de Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> en fragments nucléosomaux de 180 à 200 paires de bases (pb) (Wyllie, 1980). Ces étapes précèdent la perte de l'intégrité membranaire, la contraction volumique cellulaire et le démantèlement du cytosquelette. Les corps apoptotiques sont ensuite dégradés par phagocytose (revue : Kerr et al., 1972).

Des expériences pionnières menées par Brenner, Horvitz et Suston ont permis la mise en évidence pour la première fois, des gènes et des protéines impliqués dans ce processus chez le nématode *Caenorhabditis elegans*<sup>16</sup>, les gènes *Ced*, montrant ainsi que ce processus était actif au même titre que la différenciation cellulaire (Ellis & Horvitz, 1986 ; Horvitz, 1999). Chez ce ver constitué de 1090 cellules somatiques, les mêmes 131 cellules meurent à certaines étapes spécifiques du développement. Initialement, les gènes *ced-3* et *ced-4* sont décrits comme indispensables à l'induction du processus, tandis que le gène *ced-9* le régule. En fait, CED-9 régule négativement CED-4 qui empêche l'activation de CED-3 (Shaham & Horvitz, 1996). Des expériences de clonage et de caractérisation des protéines CED ont montré que CED-9 est l'homologue de l'oncogène BCL-2 chez les mammifères et CED-3 correspond au premier membre caractérisé de la famille des protéases à cystéine, les caspases (caspases-1) (Vaux et al., 1992 ; Yuan et al., 1993). CED-4 quant à lui est l'homologue chez les mammifères de la protéine Apaf-1 (*Apoptotic protease activation factor 1*), capable de se lier au cytochrome c et de recruter la caspase-9 par les domaines CARD (*Caspase recruitment domains*) présents sur les deux protéines Apaf-1 et caspase-9 (Li et al., 1997 ; Yuan et al., 2013). L'ensemble cytochrome c–Apaf-1–caspase-9 forme un complexe apoptotique appelé apoptosome. Contrairement à Apaf-1 qui est cytoplasmique, BCL-2 est situé sur la face externe de la mitochondrie (Hockenbery et al., 1990), indiquant le rôle central de cet organe dans l'apoptose. Ceci conduit à la notion de voie « intrinsèque », mitochondriale de l'apoptose. Par ailleurs, le stress prolongé du réticulum endoplasmique (RE) peut mener à l'apoptose et constitue la voie intrinsèque du RE. Il existe une autre voie, la voie extrinsèque ou dépendante de l'activation d'un récepteur qui propage le signal de mort cellulaire d'origine extérieure à l'intérieur de la cellule. Ces deux voies sont liées : une molécule d'une voie peut interagir avec une molécule de la deuxième (revue : Nikolettou et al., 2013). Il existe une voie apoptotique additionnelle dite voie des perforines/granzymes qui implique les lymphocytes T. L'activation de cette dernière voie n'a pas été étudiée dans les maladies neurodégénératives. Les voies apoptotiques convergent vers l'activation des caspases qui mène à l'autodestruction de la cellule.

### 1.1. Les caspases

Une caspase existe dans la cellule sous la forme d'une pro-caspase inactive constituée d'une queue N-terminale et de deux sous-unités (p20 et p10). Lorsqu'elle est activée par des signaux spécifiques, ces deux sous-unités s'associent pour former le site actif de l'enzyme. Des études de cristallographie décrivent la caspase active

<sup>15</sup> Vogt observe la disparition physiologique de la notochorde au cours de la métamorphose des amphibiens (Vogt, 1842).

<sup>16</sup> Leur découverte a été récompensée par le Prix Nobel de Médecine en 2002.

comme un tétramère constitué de deux hétérodimères et donc de deux sites actifs (**Figure 8**). Les caspases initiatrices sont capables d'une activation auto-catalytique tandis que l'activation des caspases effectrices se fait par les initiatrices. L'initiation d'une cascade de protéases entraîne une amplification du signal qui mène à la mort cellulaire (Shi, 2002).

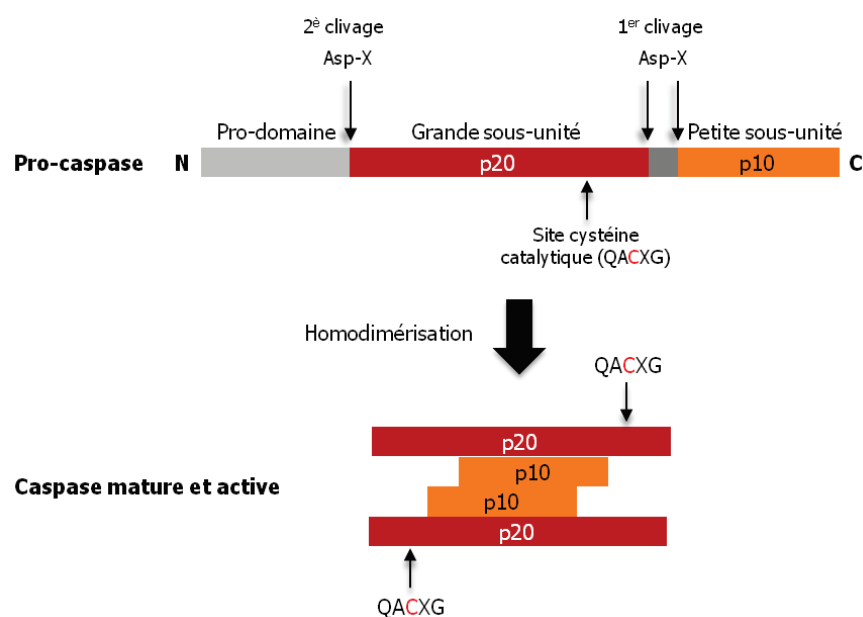
Les caspases comprennent 14 membres classés en 3 groupes (Cohen, 1997 ; Shi, 2002) :

(i) Les caspases inflammatoires (1, 4, 5, 12, 13, 14) permettent la maturation des cytokines. La caspase-11 régule l'apoptose et la maturation des cytokines après un choc septique (Kang et al., 2002). La caspase-12 est spécifique de l'apoptose induite par le stress du RE (Nakagawa et al., 2000a), l'expression de la caspase-13 n'a été démontrée que chez les bovins (Koenig et al., 2001) et la caspase-14 n'est qu'exprimée lors des phases embryonnaires mais pas chez l'adulte (Hu et al., 1998).

(ii) Les caspases initiatrices (2, 8, 9, et 10) à long pro-domaine déclenchent l'apoptose. Les caspases-8 et 10 contiennent un domaine effecteur de mort. Les caspases 1, 2, 4 et 9 possèdent un domaine de recrutement CARD (*Caspase-Recruitment Domain*) qui permet leur recrutement au niveau des complexes protéiques de signalisation.

(iii) Les caspases effectrices (3, 6, 7 et 14) dont le pro-domaine est plus court ne possèdent pas de domaines leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser. Elles sont activées consécutivement à leur clivage par d'autres caspases et le clivage de leur substrat provoque les changements morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

L'activation des caspases effectrices mène à la fragmentation de l'ADN, à la dégradation du cytosquelette et des protéines nucléaires et au bourgeonnement de la membrane plasmique, entraînant la formation de corps apoptotiques et l'expression de ligands des récepteurs des macrophages (externalisation de la phosphatidyl-sérine, de l'annexine I et de la calréticuline). Lorsque la cellule est reconnue par un phagocyte, l'activation des caspases provoque le démantèlement de l'architecture cellulaire en dégradant notamment les microfilaments d'actine (Kothakota et al., 1997).



**Figure 8. Activation des caspases.** La caspase active est formée par la protéolyse et l'assemblage de deux pro-caspases et possède donc deux sites cystéines catalytiques (QACXG). Adaptée de Chowdhury et al., 2008.

## 1.2. La voie apoptotique intrinsèque

Dans la voie intrinsèque, l'apoptose est initiée par des signaux intracellulaires positifs ou négatifs qui agissent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (RE). Les signaux positifs incluent les radiations, les toxines, l'hypoxie, l'hyperthermie, les infections virales et les radicaux libres ; les signaux négatifs peuvent être l'absence d'hormones, de facteurs de croissance et/ou de cytokines qui mènent à la perte des signaux anti-apoptotiques<sup>17</sup>.

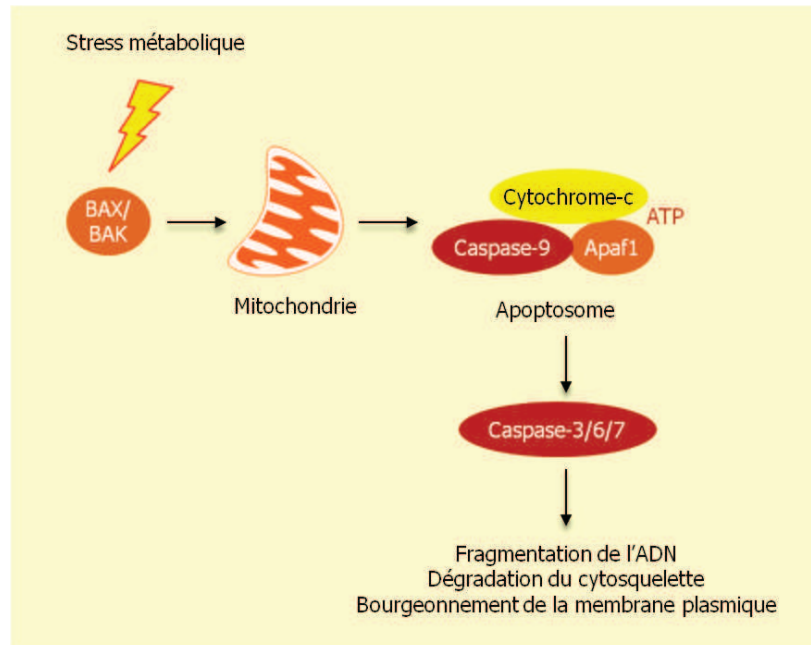
### 1.2.1. L'apoptose mitochondriale

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, régulée par les membres de la famille Bcl-2, est un événement cardinal de la voie apoptotique intrinsèque. Le proto-oncogène BCL-2 bloque l'apoptose et maintient l'homéostasie cellulaire (Vaux et al., 1988 ; Veis et al., 1993). Il empêche la perte de l'intégrité membranaire, la contraction volumique de la cellule et la fragmentation de l'ADN. BCL-2 est le premier membre découvert d'une famille qui contient à la fois les protéines anti-apoptotiques BH1-4 et pro-apoptotiques BH1-3 (perte du domaine BH4). Chaque membre possède au moins un des quatre domaines homologues Bcl BH1-4 (*Bcl-Homology*) organisés en hélices- $\alpha$  (Adams & Cory, 1998).

Dans la mitochondrie, les protéines anti-apoptotiques de la famille BH1-4 telles que BCL-2, BCL-X, BCL-XL, séquestrent les protéines pro-apoptotiques BH1-3 comme BAX ou BAK, empêchent leur homodimérisation et préviennent leur activation (Cheng et al., 2001). Les cellules doublement déficientes en BAX et en BAK sont résistantes aux stimuli déclenchant la voie intrinsèque de l'apoptose (Lindsten et al., 2000 ; Wei et al., 2001), indiquant que BAX et BAK constituent la porte d'entrée nécessaire à la voie intrinsèque mitochondriale (Wei et al., 2001) et provoquent le stress du réticulum endoplasmique (Scorrano et al., 2003). Les signaux apoptotiques activent le facteur pro-apoptotique BID (*BH3-interacting domain*) entraînant l'homodimérisation et la translocation de BAX, puis de BAK dans la membrane mitochondriale externe (Wolter et al., 1997 ; Gross et al., 1998, **Figure 9**). Le changement de perméabilité des pores mitochondriaux formés par l'oligomérisation de BAX et BAK conduit à la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et à la libération dans le cytosol d'un premier groupe de protéines pro-apoptotiques normalement contenues dans l'espace inter-membranaire : le cytochrome c, Smac/DIABLO, et la protéase à sérine HtrA2/Omi qui activent indirectement les caspases. Un second groupe de facteurs est libéré par les mitochondries après le déclenchement de la cascade apoptotique : la protéine AIF (*Apoptosis-inducing factor*), l'endonucléase G qui sont indépendants des caspases, et CAD (*Caspase activated DNases*). CAD régule la dégradation de l'ADN (Enari et al., 1998) tandis que AIF et l'endonucléase-G migrent dans le noyau et déclenchent la fragmentation et la condensation de l'ADN (Susin et al., 1999 ; Li et al., 2001). La liaison du cytochrome c à Apaf-1 provoque la formation en présence d'ATP, d'un complexe appelé apoptosome qui va recruter la pro-caspase-9 et entraîner l'activation de la cascade de caspases 3, 6 et 7 (Li et al., 1997 ; Yuan et al., 2013).

<sup>17</sup> Des types cellulaires différents peuvent être engagés ou non dans l'apoptose suite à un même stimulus donné. Par exemple, l'irradiation ou l'utilisation de certaines drogues dans les chimiothérapies entraînent des dommages de l'ADN dans certaines cellules seulement qui mènent à la mort cellulaire par une voie apoptotique dépendante du facteur p53. De plus, certaines hormones telles les glucocorticoïdes peuvent provoquer la mort apoptotique de certaines cellules comme les thymocytes tandis que d'autres cellules ne seront pas affectées par ce même stimulus (Elmore, 2007 pour revue).

Les phagocytes reconnaissent les cellules entrées en apoptose par l'expression de motifs spécifiques à la surface de celles-ci dont le mieux caractérisé est le motif phosphatidylsérine (Fadok et al., 2000). Cette reconnaissance engage le processus de dégradation du cytosquelette qui commence avant la phagocytose des cellules apoptotiques.



**Figure 9. La voie apoptotique mitochondriale.** L'homodimérisation de BAX et de BAK entraîne la formation d'un pore mitochondrial qui permet la libération dans le cytoplasme de protéines contenues dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, formant l'apoptosome qui active la cascade apoptotique. L'activation des caspases exécutrices -3, -6 et -7 provoque la fragmentation de l'ADN, la dégradation du cytosquelette et le bourgeonnement de la membrane plasmique.

### 1.2.2. Le stress du réticulum endoplasmique

Le stress du réticulum endoplasmique est un état cellulaire dans lequel la capacité de repliement des protéines du réticulum endoplasmique est altérée (Rasheva & Domingo, 2009). L'accumulation de protéines mal-conformées est détectée par des senseurs transmembranaires à la surface du réticulum endoplasmique qui initie une cascade appelée en anglais « *Unfolded protein response* » (UPR) ou réponse du réticulum endoplasmique au mauvais repliement des protéines. Il existe trois voies de transduction du stress du réticulum endoplasmique qui impliquent initialement les senseurs IRE1 $\alpha$  (*Inositol-requiring kinase1*), ATF6 (*Activating transcription factor 6*) et RPK (*RNA-activated protein kinase*) (Paschen & Mengesdorf, 2005). Ces voies consistent en l'atténuation de la traduction afin de diminuer le nombre de protéines mal-conformées, en l'expression de nombreuses protéines chaperonnes et de protéines de contrôle pour rétablir les fonctions du réticulum endoplasmique et enfin en l'expression de protéines associées à la dégénérescence qui reconnaissent et transloquent les protéines mal-conformées hors du réticulum endoplasmique et les adressent au protéasome en vue de leur dégradation. Dans certaines situations où l'homéostasie protéique n'est pas restaurée, le stress du réticulum endoplasmique se prolonge et conduit à la mort cellulaire par apoptose (Nakagawa et al., 2000a ; Paschen & Mengesdorf, 2005).

La caspase-12 a été la première caspase décrite dans la cascade apoptotique activée par le stress du réticulum endoplasmique. En effet, une étude menée chez des souris déficientes en caspase-12 montre que les



cellules déficientes en caspase-12 sont plus résistantes à l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique provoqué par exemple par la bréfeldine A, un inhibiteur du transport réticulum endoplasmique - Golgi ou la thapsigargine qui perturbe l'homéostasie calcique interne, mais ne sont pas résistantes à l'apoptose induite par d'autres stimuli tels que TNF- $\alpha$  ou la privation de sérum (Nakagawa et al., 2000a), suggérant que la caspase-12 est impliquée dans la mort cellulaire dépendante du stress du réticulum endoplasmique. Ces mêmes auteurs montrent que la caspase-12 est localisée au réticulum endoplasmique et est activée consécutivement à un stress prolongé du réticulum endoplasmique par la calpaïne, une protéine cytoplasmique dépendante du Ca<sup>2+</sup> (Nakagawa et al., 2000a, 2000b). Son activation induit la cascade des caspases 9 et 3 indépendamment des facteurs mitochondriaux Apaf-1 et cytochrome c (Morishima et al., 2002 ; Rao et al., 2002). Une autre caspase, la caspase-4, semble également impliquée (Hitomi et al., 2004).

Avant l'activation de la cascade de caspases, la voie dépendante de PERK qui permet de diminuer la traduction est capable de détecter un stress insurmontable du RE et provoque en réponse l'activation du facteur de transcription CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Lin et al., 2009). CHOP sensibilise les cellules en réprimant l'activation de BCL-2 et en activant les facteurs pro-apoptotiques BIM et DR5 (McCullough et al., 2001 ; Yamaguchi & Wang, 2004a). La déficience en CHOP chez des souris *knock-out* réduit l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique (Zinszner et al., 1998). Paradoxalement, consécutivement à un stress du réticulum endoplasmique, PERK peut aussi phosphoryler Nrf2, un facteur de transcription impliqué dans la survie cellulaire. Il en est de même de la voie impliquant la kinase IRE1, un senseur du stress du réticulum endoplasmique, qui peut promouvoir l'apoptose en formant un complexe activant la voie de signalisation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Urano et al., 2000 ; Nishitoh, 2002) ou la survie via l'épissage de l'ARNm de Xbp1, un facteur de transcription qui permet l'expression de protéines chaperonnes, de protéines impliquées dans la dégradation des protéines mal-repliées et de facteurs de biogénèse de la membrane du réticulum endoplasmique (Acosta-Alvear et al., 2007). L'activation simultanée de réponse pro- et anti-apoptotiques est paradoxale et la décision finale de la cellule va plutôt dépendre de l'intensité de l'activation des senseurs du stress du RE que des voies de signalisation activées (Rutkowski et al., 2006).

Enfin, l'interaction entre mitochondrie et réticulum endoplasmique module et synchronise la signalisation calcique. Un stress prolongé du réticulum endoplasmique peut induire la libération de Ca<sup>2+</sup> contenu dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries, mais aussi l'accumulation de composés réactifs à l'oxygène et une déplétion en ATP provoque l'apoptose mitochondriale par l'activation de BAX et de BAK (Scorrano et al., 2003 ; Raturi & Simmen, 2013).

### 1.3. La voie apoptotique extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose est induite par un ligand extracellulaire qui, en se liant à son récepteur transmembranaire, propage un signal létal dans la cellule. Cette superfamille de récepteurs possède des homologies de leur domaine extracellulaire riche en cystéines et possèdent un domaine cytoplasmique de 80 acides aminés appelé domaine de mort qui permet de transmettre le signal de mort cellulaire extracellulaire à l'intérieur de la cellule. Les ligands et récepteurs associés les plus étudiés sont FAS/CD95-FasR, TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*)/TNFR1, TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)-TRAILR1-2, Apo3L-DR3, Apo2L-DR4 et Apo2L-DR5. Par exemple, dans le cas des complexes FasL/FasR et TNF $\alpha$ /TNFR1, le complexe récepteur recruté lie son ligand trimérique, provoquant le recrutement de protéines cytoplasmiques adaptatrices qui possèdent un domaine de mort correspondant au récepteur. La liaison du ligand Fas recrute la protéine adaptatrice FADD (*FAD-*

*associated protein with a Death Domain*) et la liaison du ligand TNF $\alpha$  recrute la protéine TRADD (*TNFR-associated Death Domain*) puis FADD et RIP (*receptor-interacting protein*). FADD s'associe à la procaspase-8, formant ainsi un complexe de signalisation de mort cellulaire appelé DISC (*Death-inducing signaling complex*) qui conduit à l'auto-activation de la procaspase-8. Ensuite, selon le récepteur stimulé, une des deux voies de signalisation suivantes sera activée pour mener à la mort cellulaire :

- (1) activation de caspase-8 ou de caspase-10  $\rightarrow$  caspase 3
- (2) activation de caspase-8  $\rightarrow$  clivage de BID  $\rightarrow$  perméabilisation de la membrane externe mitochondriale  $\rightarrow$  caspase-9  $\rightarrow$  caspase-3

Je détaillerai ici la voie de mort cellulaire associée à l'activation du récepteur TNFR1 par la cytokine TNF- $\alpha$ . Ce récepteur est mis en cause dans la mort neuronales dans les maladies à prions (Pietri et al., 2013). Activateur de l'apoptose, la cytokine TNF- $\alpha$  est également impliquée dans la réponse inflammatoire et certaines réactions immunitaires. TNF- $\alpha$  est une protéine transmembranaire de 233 acides aminés organisée en un homotrimère stable à la surface membranaire (Tang et al., 1996). Le clivage de TNF- $\alpha$  est réalisé par la métalloprotéase TACE (TNF- $\alpha$  cleaving enzyme), la même enzyme clivant PrP<sup>C</sup>. TNF- $\alpha$  est clivée entre les acides aminés Ala-66 et Val-67 et génère un TNF- $\alpha$  soluble (sTNF- $\alpha$ ) dont le protomère de 17 kDa est composé de deux feuillets  $\beta$ -plissés anti-parallèles formant une structure enroulée caractéristique des membres de la famille du TNF. TNF- $\alpha$  s'assemble sous une forme trimérique active de 51 kDa (Black et al., 1997). Dans l'organisme, la principale source de TNF- $\alpha$  est constituée par les cellules du système immunitaire telles que les monocytes et les macrophages. Dans le cerveau, TNF- $\alpha$  est majoritairement produite par les cellules microgliales et les astrocytes. Sa synthèse et sa libération peuvent être induites par différents signaux (infection bactérienne ou virale, lésion cérébrale aigüe, infarctus, maladies neurodégénératives) et provoquent une réaction inflammatoire par l'activation de la microglie et le recrutement des astrocytes sur le site de la lésion.

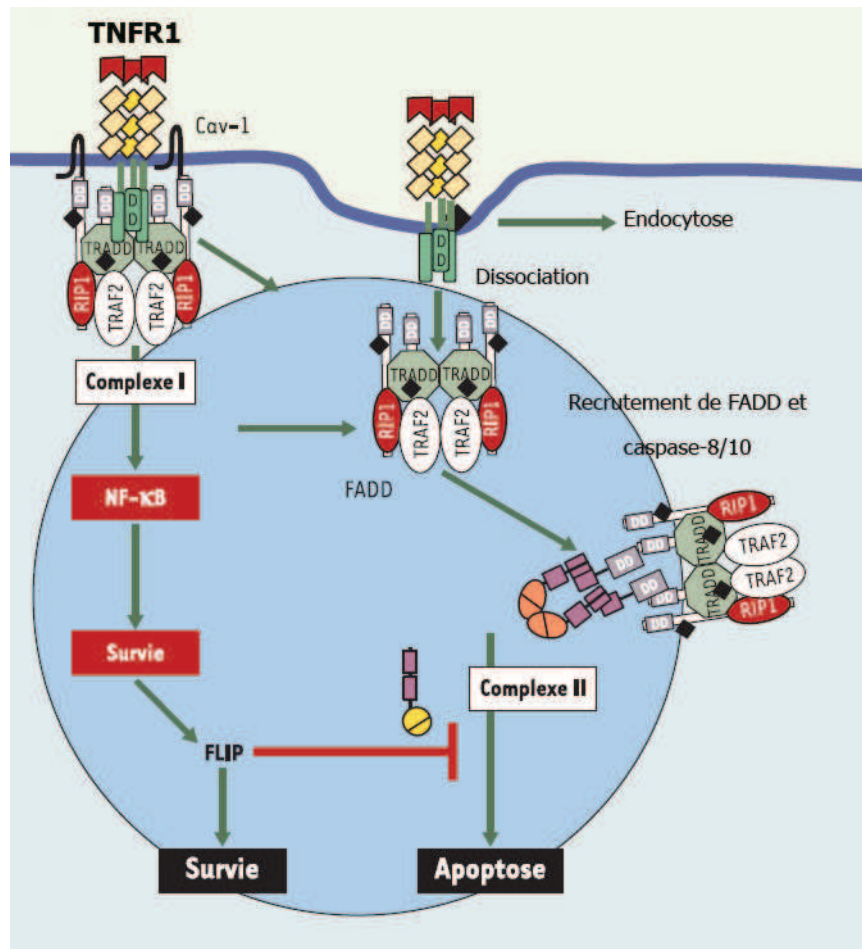
Après sa libération, le trimère de TNF- $\alpha$  peut se lier à deux sous-types de récepteurs : le récepteur TNFR1 (ou p55TNFR) et TNFR2 (ou p75TNFR). Ces deux récepteurs diffèrent dans leur séquence en acides aminés : ils possèdent 24% d'homologie dans leur région extracellulaire et 10% dans leur domaine interne. Leur fonction est opposée : alors que TNFR2 exerce un rôle trophique et protecteur, TNFR1 contient un domaine de mort menant à l'apoptose. Dans le cerveau, TNFR1 est exprimé de façon ubiquitaire tandis que l'expression de TNFR2 est limitée aux cellules microgliales (Dopp et al., 2002), aux oligodendrocytes (Dopp et al., 2002 ; Arnett et al., 2001) et à certains types neuronaux comme les cellules granulaires du gyrus denté et les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Harry et al., 2008). Dans la plupart des cellules, TNFR1 est le principal médiateur de TNF- $\alpha$ . Cependant, le rôle de TNFR2 est souvent sous-évalué car ce récepteur ne peut être activé que par la forme membranaire de TNF- $\alpha$  (Grell et al., 1995), tandis que TNFR1 fixe les deux formes, membranaire et soluble. De plus, TNF- $\alpha$  se fixe sur TNFR1 avec une forte affinité et se dissocie lentement après fixation ( $t_{1/2} = 33$  min).

La signalisation de TNFR1 a été très étudiée. Comme TNFR1 ne possède pas intrinsèquement d'activité enzymatique, le recrutement de protéines sur différentes régions intracellulaires est nécessaire à l'induction des voies de signalisation spécifiques. La fixation d'un trimère de TNF- $\alpha$  sur TNFR1 provoque la libération de la protéine SODD (*silencer of death domain*) du domaine intracellulaire de TNFR1, entraînant le recrutement des protéines TRADD sur le domaine de mort qui recrute ensuite, selon le contexte cellulaire et le microenvironnement, les protéines RIP (Hsu et al., 1996), TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*) ou FADD.

Le recrutement de ces facteurs peut induire des signaux de survie ou de mort mis en place dans deux complexes protéiques distincts séparés temporellement et spatialement (Micheau & Tschopp, 2003 ; **Figure 10**). A la surface cellulaire, le complexe (I) est composé de TNFR1, RIP, TRAF2, cIAP-1 et cIAP-2 et mène à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 qui favorisent l'expression de protéines anti-apoptotiques. En effet, TRAF2 recrute les protéines inhibitrices de l'apoptose cIAP-1 et cIAP-2 (*cellular inhibitor of apoptosis*) et active les kinases MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) telles que MEKK1 (*extracellular signal-regulated kinase kinase 1*) ou ASK-1 (*apoptosis-stimulated kinase 1*), ce qui aboutit à l'activation de JNK (*c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*). JNK est capable de phosphoryler le facteur de transcription c-Jun et d'augmenter son activité de transcription. Enfin, l'ubiquitination de RIP permet l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B en inhibant I $\kappa$ B $\alpha$ , l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B qui le retient dans le cytoplasme (Hsu et al., 1995). NF- $\kappa$ B peut induire la transcription de cIAP-1, cIAP-2, cFLIP, TRAF1 et TRAF2 (Wang et al., 1998).

La fixation de TNF- $\alpha$  sur TNFR1 peut provoquer l'internalisation de TNFR1 par endocytose qui entraîne une modification de sa conformation et le recrutement de différentes protéines adaptatrices menant à la formation du complexe (II) conduisant à l'apoptose (Schneider-Brachert et al., 2004). FADD recrute RIP1 désubiquitinilée, TRADD et les pro-caspases-8 capables de s'autoactiver (TRADD : Pobezinskaya et al., 2008 ; FADD : Yeh et al., 1998 ; caspase-8 : Varfolomeev et al., 1998). La caspase-8 inhibe RIP1 et RIP3 induit l'activation de caspase-3 menant à l'apoptose. L'activation de caspase-8 est essentielle à l'induction de l'apoptose. En effet, son inhibition pharmacologique ou par un stress cellulaire empêche le complexe DISC d'activer l'apoptose.

Lorsque NF- $\kappa$ B est activé, cFLIP se fixe au complexe II et empêche l'activation des caspases. A l'inverse, quand NF- $\kappa$ B est bloqué, cFLIP est absent et les cellules entrent alors en apoptose. Aussi, l'inhibition des cIAPs prévient l'ubiquitination de RIP1 et stimule la formation du complexe DISC. La caspase-8 peut également, en activant la caspase-7, entraîner une cascade de signalisation menant au clivage de BID, permettant d'activer la voie intrinsèque de l'apoptose ou l'activation de caspase-9 puis de caspase-3 (Cabal-Hierro & Lazo, 2012).



**Figure 10. Voies de signalisation du récepteur TNFR1.** L'activation de l'apoptose par TNFR1 requiert la formation de deux complexes distincts. Le complexe (I), membranaire, est responsable de l'activation de la voie de survie induite par NF-κB. Le complexe (II), pro-apoptotique, se forme dans un second temps, après modification du complexe (I) et dissociation des composants du récepteur, permettant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et des caspases activatrices (-8 et -10). Ce complexe, cytosolique, équivaut au DISC de Fas ou de TRAIL et est capable d'activer l'apoptose lorsque la voie NF-κB est inactive. Dans le cas contraire, la molécule anti-apoptotique, FLIP, réglée positivement par le complexe (I), bloque l'activation de l'apoptose. Adaptée de [Micheau, 2004](#).

## 2. L'autophagie

Le terme « autophagie » (se manger soi-même) a été inventé après l'observation en microscopie électronique par transmission, de vésicules à simple- ou double-membrane contenant des composants du cytoplasme et des organites (réticulum endoplasmique, mitochondries) délivrés aux lysosomes ([Ashford & Porter, 1962](#)). L'autophagie est un processus vital de dégradation qui confère aux cellules eucaryotes une résistance au stress ou à la privation de nutriments par le recyclage de ses propres constituants (acides aminés, acides gras, sucres) qui peuvent alors être réutilisés par la cellule pour la néosynthèse de protéines et l'apport en énergie ([Mizushima, 2005](#)). La cellule déclenche ce processus pour survivre à des périodes de jeûne ou pour éliminer des composants intracellulaires altérés ou des pathogènes ([Levine & Klionsky, 2004](#)). La fonction neuroprotectrice de l'autophagie a été mise en évidence chez le ver *Caenorhabditis elegans* chez lequel l'expression des gènes codant les protéines bécline-1, Atg1, 7, 8 et 10 impliquées dans la voie autophagique, a été démontrée comme étant essentielle à son développement et contrôle sa durée de vie ([Meléndez et al., 2003](#)). Dans des conditions physiologiques optimales, en absence d'agression, l'autophagie basale assure le maintien de l'homéostasie

cellulaire en régulant le recyclage des protéines, lipides et organites, notamment dans les neurones où elle module la plasticité synaptique en régulant le trafic et la dégradation des récepteurs et protéines synaptiques (Boland & Nixon, 2006).

Cette fonction de survie est assurée par trois voies autophagiques : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie par les protéines chaperonnes (*chaperone-mediated autophagy* : CMA). La macroautophagie effectue la séquestration de cytosol ou d'organites dans des vésicules multi-membranaires appelées autophagosomes dirigées ensuite vers les lysosomes en vue de leur dégradation. La microautophagie effectue l'absorption de protéines et d'organites par pinocytose sélective ou non par les lysosomes, via des invaginations de la membrane lysosomale et la scission des vésicules autophagiques (Mijaljica et al., 2011). La CMA cible spécifiquement les protéines possédant le motif KFERQ-like qui permet leur transport par la protéine chaperonne Hsp70 vers les lysosomes. La fusion des protéines avec le récepteur lysosomal LAMP2 (*Lysosomal-associated membrane protein-2*) permet leur translocation et leur dégradation dans le lysosome (Kaushik & Cuervo, 2012). Le transport de composants à travers la membrane lysosomale dans la CMA diffère des voies micro- et macroautophagique dans lesquelles les composants sont dégradés après que la vésicule ait fusionné avec le lysosome.

L'autophagie est activée dans de nombreuses pathologies qui mènent à la dégénérescence cellulaire, notamment dans le cerveau, les muscles, le foie ou le cœur (Levine & Kroemer, 2008). Bien qu'elle ait longtemps été considérée comme le mécanisme de mort cellulaire programmée non-apoptotique de type II, il apparaît aujourd'hui que l'autophagie est induite dans de nombreuses pathologies pour protéger la cellule. C'est plutôt la dérégulation du flux autophagique qui semble conduire à la mort cellulaire par apoptose (Levine & Kroemer, 2008).

## 2.1. La voie autophagique

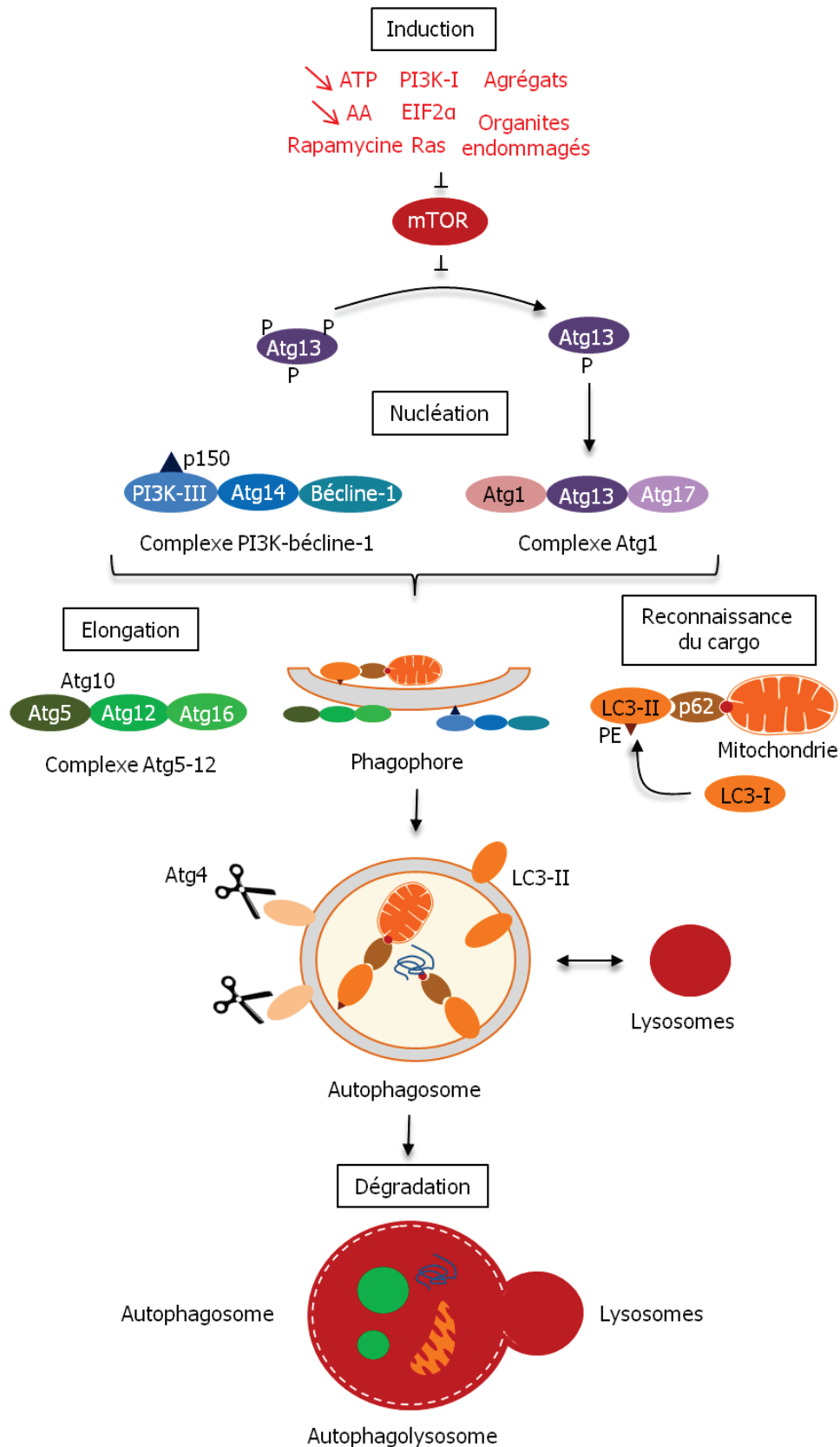
La cascade autophagique est divisée en plusieurs étapes initiées par l'induction et la reconnaissance des cargos à dégrader, la formation de la vésicule, la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (autolysosome), la dégradation du cargo et la libération des produits de dégradation dans le cytosol (**Figure 11**). De nombreuses protéines Atg (pour *autophagy-related gene*) interviennent dans ces étapes et constituent la machinerie moléculaire de l'autophagie.

L'autophagie basale est faible dans des conditions physiologiques. L'induction de l'autophagie est contrôlée par la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une protéine sérine/thréonine kinase inhibitrice de l'autophagie. L'inhibition de mTOR (la levée de son activité inhibitrice) par des amino-acides (Luiken et al., 1994), la phosphoinositide 3-kinase de type I (PI3K) (Blommaert et al., 1997), eIF2 $\alpha$  et Ras (Meijer & Codogno, 2004) ou la rapamycine entraîne l'initiation de l'autophagie. Chez la levure et la drosophile, TOR est régulée par de multiples signaux et régule négativement la kinase Atg1 en condition basale (Chang & Neufeld, 2009). La privation de nutriments ou l'application de la rapamycine provoque l'activation d'Atg1 qui se lie alors à Atg13 et Atg17 (Kamada et al., 2000). Le complexe protéique Atg1-Atg13-Atg17 recrute ensuite d'autres protéines et permet l'initiation de la formation de l'autophagosome (Cheong et al., 2008 ; Kabeya et al., 2005 ; Suzuki et al., 2007). De plus, un rôle d'Atg1 inhibiteur de la phosphorylation activant la kinase S6K, l'effecteur de TOR, lors de la privation de nutriments a été décrit chez la drosophile (Lee et al., 2007).

Chez les mammifères, il existe deux homologues de Atg1 : les kinases ULK1 et ULK2 (*Unc-51-like kinase*) et un homologue de Atg17 : FIP200 (*the focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD*) qui forme un complexe avec ULKs et la protéine mammifère Atg13 en condition de privation de nutriments (Hara et al., 2008 ; Jung et al., 2009). A l'inverse de la levure, ULKs-Atg13-FIP200 forme un complexe stable qui est inhibé par mTOR qui phosphoryle et inactive ULKs et Atg13 en condition normale. L'inhibition de mTOR permet l'activation de ULK1 et ULK2 qui phosphorylent Atg13 et FIP200 et activent l'autophagie (Hosokawa et al., 2009). Hosokawa et al (2009) suggèrent que la phosphorylation de Atg13 par mTOR ou par Atg1/ULKs se ferait sur des résidus différents, pouvant activer ou inhiber l'autophagie selon l'état de privation de nutriments de la cellule, le niveau de phosphorylation de Atg13 étant bas chez la levure mais élevé chez la drosophile en condition de privation de nutriments (Kamada et al., 2000 ; Chang et al., 2009).

Chez les mammifères, l'autophagie intervient dans le recyclage des substrats cytosoliques ubiquitinilés et élimine les protéines mal-conformées. La reconnaissance sélective de ces composants est réalisée par la protéine p62/séquestrosome 1 (SQSTM1) (Bjørkøy et al., 2005) qui lie les poly- ou mono-ubiquitines par son domaine « *ubiquitine-associated* » et sa liaison à la protéine LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*), l'homologue de Atg8 chez la levure (Kim et al., 2008 ; Pankiv et al., 2007). LC3 est synthétisée sous la forme de pro-LC3. Son clivage par Atg4B permet l'exposition d'un résidu glycine en C-terminal et forme une protéine cytosolique de 18 kDa : LC3-I (Kabeya et al., 2000). La conjugaison d'un groupement phosphatidyléthanolamine (PE) à la région C-terminale de LC3-I par un pont amide, facilitée par le complexe Atg5-Atg12, forme LC3-II et permet son association dans la membrane interne et la membrane externe de l'autophagosome (Kabeya et al., 2000).

La conversion de LC3-I en LC3-II est utilisée expérimentalement pour détecter l'activation de l'autophagie (Klionsky et al., 2012). En effet, celle-ci est augmentée dans les cellules en culture privées de nutriments (milieu de culture sans acides aminés ni sérum) et le taux de LC3-II corrèle bien avec le nombre d'autophagosomes (Kabeya et al., 2000). Quand l'autophagie est active, LC3-II est visualisée par immunocytochimie sous la forme de points qui augmentent en nombre et en intensité dans la cellule. Il existe trois isoformes de LC3-II : LC3A-II, LC3B-II et LC3C-II chez l'homme et quatre isoformes d'Atg8 chez la levure (GABARAP, GEC1/GABARAL1, GATE16/GABARAPL2 et GABARAPL3) (He et al., 2003). Une augmentation de p62 et LC3-II est détectée quand les lysosomes (et non le protéasome) sont bloqués. Le taux en protéines p62 est également élevé dans les neurones déficients en autophagie (Wang et al., 2006 ; Komatsu et al., 2007) et les neurones déficients en p62 montrent des autophagosomes intacts, suggérant l'implication de p62 dans la sélection des substrats de dégradation autophagique, plutôt que dans la formation de l'autophagosome.



**Figure 11. La machinerie autophagique.** L'induction de l'autophagie est contrôlée par la protéine TOR dont l'inhibition déclenche l'étape de nucléation de la membrane initiale, le phagophore, mettant en jeu le complexe PI3K-bécline-1 et le complexe Atg1. Les composants à dégrader sont reconnus par p62 et séquestrés dans l'autophagosome par LC3-II. L'autophagosome est ensuite dirigé vers les lysosomes en vue de sa dégradation.

Les sites de formation de l'autophagosome dans les cellules eukaryotes sont multiples et l'origine du site d'assemblage du phagophore, la portion membranaire initiale de séquestration, est encore débattue. La constitution de cette membrane se ferait vraisemblablement à partir de la membrane du RE, du *trans*-Golgi, des endosomes ou encore de la membrane plasmique (Axe et al., 2008 ; Simonsen & Tooze, 2009 ; Hailey et al., 2010 ; Ravikumar et al., 2010). Dans les neurones, l'autophagie est initiée dans les terminaisons axonales, suggérant l'implication de la membrane du RE lisse et de la membrane plasmique présentes dans les terminaisons axonales (Broadwell & Cataldo, 1984). L'assemblage du phagophore initial requiert le recrutement du complexe composé de la PI3K de classe III, bécline-1, Atg14 et de la kinase p150 (He & Klionsky, 2009). La dissociation de bécline-1 par la protéine anti-apoptotique BCL-2 est requise pour l'induction de l'autophagie. La phosphorylation de PI3K par ce complexe provoque le recrutement d'autres Atg telles que le complexe Atg12-Atg5-Atg16 et LC3-II dans le phagophore. Atg12 est activée par Atg7 puis transférée vers Atg10 qui le lie à Atg5 de façon covalente et donc irréversible. La liaison du complexe Atg5-Atg12 à Atg16 permet sa liaison à l'autophagophore (Mizushima et al., 2003). Atg5-Atg12 recrute ensuite LC3-II à la membrane du phagophore en facilitant la fixation du groupement PE à LC3-I. Même si l'on sait que LC3-II contrôle la taille de l'autophagosome (Xie et al., 2008), le mécanisme permettant le recrutement de la membrane et sa fusion avec le phagophore n'est pas encore élucidé.

Lorsque l'autophagosome est formé, LC3-II fixée sur la face externe de l'autophagosome est clivée par Atg4 et libérée dans le cytosol (Kirisako et al., 2000). La fusion de l'autophagosome avec le lysosome nécessite le récepteur LAMP2 et la GTPase Rab7 (Tanaka et al., 2000 ; Jäger et al., 2004), ainsi que les protéines SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*), Vamp7 et Vamp8 (Furuta et al., 2010). La dégradation des composants contenus dans les autolysosomes dépend ensuite de nombreuses hydrolases telles que les protéinases A et B et les cathépsines chez les mammifères (He & Klionsky, 2009). La libération des molécules et en particulier, des acides aminés dans le cytosol par des perméases (Atg 22 ou les perméases Avt3 et Avt4) en vue de leur réutilisation pour la néosynthèse de protéines est la dernière étape de l'autophagie.

## 2.2. Autophagie et physiologie neuronale

La survie et les fonctions des neurones sont contrôlées par des facteurs trophiques et dépendent du transport membranaire actif qui connecte le soma aux neurites. Les neurones sont très sensibles à l'accumulation de protéines mal-conformées ou d'organites endommagés et l'autophagie intervient comme un mécanisme contribuant à leur survie, un déficit de la voie autophagique survenant dans de nombreuses maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer (Cataldo et al., 1996) et de Parkinson (Anglade et al., 1997).

Contrairement à d'autres organes, le taux de protéines Atg est élevé dans le cerveau de rongeur bien que le taux de LC3-II et le nombre d'autophagosomes restent bas en condition de privation de nutriments (Mizushima et al., 2004). De plus, les neurones sont très résistants à l'induction de l'autophagie par la privation de nutriments (Boland & Nixon, 2006). Ceci peut être expliqué par le fait que l'apport des neurones en énergie et en acides aminés pour la néosynthèse de protéines est assuré par les organes périphériques plutôt que par la voie autophagique, suggérant un rôle différent de l'autophagie dans les neurones en réponse à des signaux de stress, des atteintes neuronales ou dans des conditions pathologiques.



### 2.2.1. Autophagie axonale et dendritique

Dans les neurones, l'autophagie est principalement détectée dans les axones et plus faiblement dans les dendrites et le soma des neurones (**Figure 12**). Dans les ganglions dorsaux de la moelle épinière, l'autophagosome est formé à l'extrémité axonale. Il mature pendant son transport vers le soma. L'analyse ultrastructurale de cellules de Purkinje lurcher GluR $\delta$ <sup>LC</sup> montre que la neurotoxicité de GluR $\delta$ <sup>LC</sup> provoque une accumulation importante et rapide d'autophagosomes dans les axones dystrophiques gonflés, indiquant que la biogénèse des autophagosomes survient dans les compartiments axonaux (Wang et al., 2006). Cependant, le mécanisme d'induction de l'autophagie dans les axones est inconnu. Chez le mutant Lurcher portant un allèle lurcher et un allèle sain de GRID2, le canal déficient de GluR $\delta$ <sup>LC</sup> induit une dépolarisation membranaire qui se propage dans l'axone et pourrait activer l'autophagie (Wang et al., 2006 ; Yue et al., 2002). Le groupe de Liang (Liang et al., 1999) propose que l'interaction de GluR $\delta$ <sup>LC</sup> avec bécline-1 serait responsable de l'induction de l'autophagie dans les cellules de Purkinje mutantes lurcher. Des expériences menées *in vitro* dans des cultures de neurones sympathiques et *in vivo* dans les cellules granulaires du cervelet et dans les neurones ganglionnaires dorsaux de la moelle épinière indiquent que le transport rétrograde des autophagosomes de l'extrémité axonale vers le soma où sont situés les lysosomes et leur transport antérograde du soma vers l'extrémité axonale sont dépendants des microtubules (Hollenbeck, 1993 ; Wang et al., 2006 ; Maday et al., 2012). Les kinésines et dynéines ou le complexe dynéine-dynactine, protéines motrices responsables du transport protéique le long des microtubules, sont impliquées dans le transport antérograde (kinésines) et rétrograde (dynéines). Leur inhibition pharmacologique ou par siARN bloque le transport des autophagosomes dans l'axone (**Figure 12**). L'interaction de LC3 avec la protéine associée aux microtubules MAP1B régule la formation des autophagosomes en conditions physiologiques et pathologiques (Yue, 2007 ; Jahrheiss et al., 2008). De récentes observations dans les neurones primaires de neurones ganglionnaires de la corne dorsale de la moelle épinière proposent un modèle dans lequel les autophagosomes sont formés distalement, sélectionnent leur cargo et se déplacent le long des microtubules de façon bidirectionnelle (Maday et al., 2012). Les autophagosomes s'acidifient à l'approche du soma pour dégrader leurs cargos. La fusion avec les endosomes tardifs ou les lysosomes empêche leur transport rétrograde dépendant de la dynéine.

Des autophagosomes ont aussi été détectés dans les dendrites des neurones. La protéine mTOR régulatrice de l'induction de l'autophagie module la potentialisation et la dépression à long terme dans les compartiments post-synaptiques des neurones hippocampiques, suggérant l'implication de l'autophagie dans le mécanisme de plasticité synaptique (Shehata et al., 2012).

### 2.2.2. Régulation de l'homéostasie neuronale

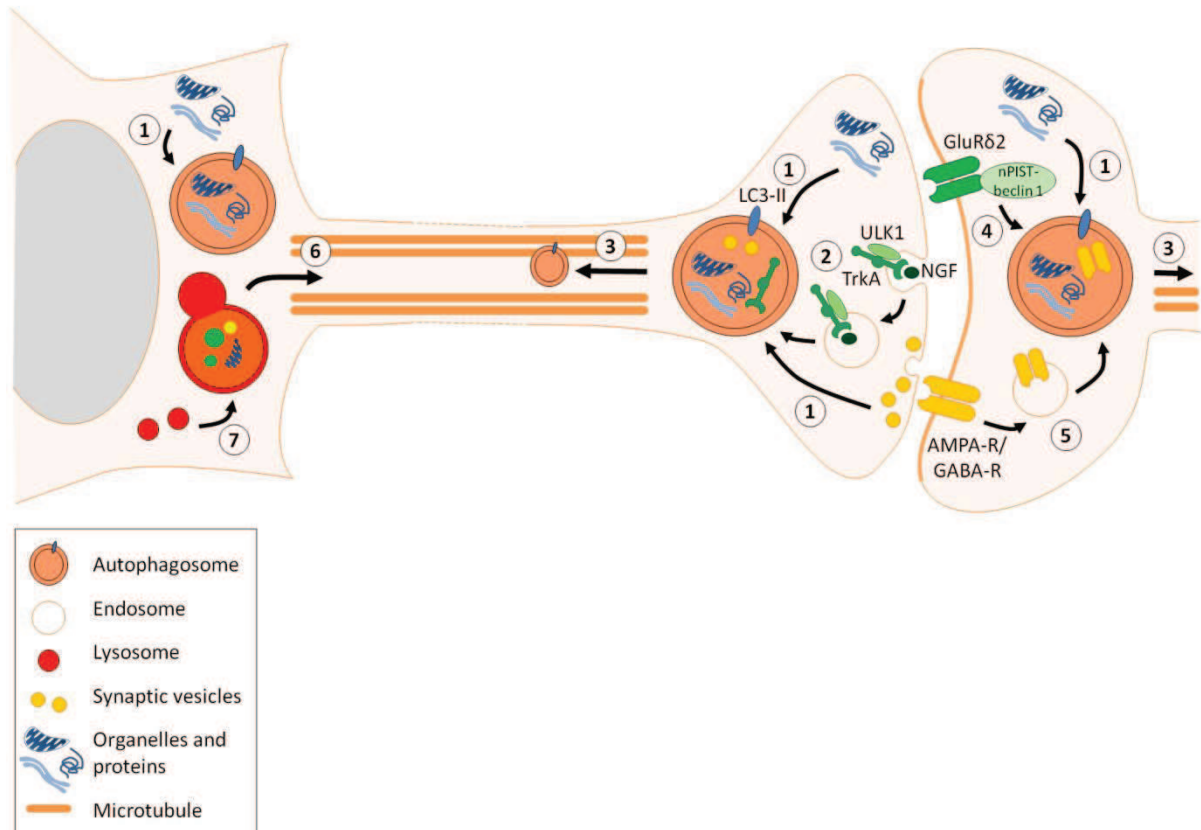
L'autophagie intervient dans le développement neuronal. Chez la drosophile, la croissance de la jonction neuromusculaire est régulée positivement par l'autophagie (Shen & Ganetzky, 2009). Une surexpression ou une mutation de la protéine Atg1 impliquée dans l'induction de l'autophagie, respectivement augmente ou diminue la taille des synapses. L'effet positif sur développement de la jonction neuromusculaire est médié par la régulation négative de Hiw, une ubiquitine ligase E3 qui régule négativement la croissance synaptique par l'intermédiaire de l'inactivation de Wallenda, une MAP kinase kinase (Collins et al., 2006 ; Shen & Ganetzky, 2009 ; Wan et al., 2000).

Inversement, la déficience en Atg7, et donc le blocage de l'initiation de l'autophagie provoque la dystrophie axonale et la dégénération des axones terminaux, mais pas des épines dendritiques suivies de la mort

des cellules de Purkinje du cervelet accompagnée par des déficits du comportement des souris (Komatsu et al., 2007). Ceci suggère l'implication de l'autophagie dépendante d'Atg7 dans le turnover protéique dans les axones et dans la protection des neurones. Ces résultats sont cohérents avec des études montrant l'implication de l'autophagie dans la rétraction des neurites dans des cultures de neurones sympathiques (Bunge, 1973), ainsi que son rôle dans la croissance neuritique au cours du développement (Hollenbeck, 1993).

L'accumulation de protéines poly-ubiquitinées dans les neurones déficients en Atg5 et Atg7 et ce malgré un fonctionnement non-altéré du protéasome, suggère que l'autophagie prévient l'agrégation et l'accumulation de protéines mal-conformées et joue un rôle dans le nettoyage cellulaire et donc dans l'homéostasie neuronale impliquant la plasticité synaptique (Komatsu et al., 2006 ; Hara et al., 2006). Chez le ver *C. elegans*, lorsque les compartiments présynaptiques sont retirés des cellules post-synaptiques, les récepteurs GABA A sont sélectivement dirigés vers les autophagosomes (Rowland et al., 2006). Chez la souris déficiente en Atg1, la densité post-synaptique diminue en réponse à une baisse de l'activité de la MAP kinase ERK, suggérant qu'Atg1 régule les structures synaptiques en agissant sur ERK (Wairkar et al., 2009). Le rôle de la protéine p62 est important dans l'étape de sélection des composants à dégrader. Des études montrent que les souris déficientes en p62 ont une altération de la capacité des neurones de l'hippocampe à entrer en LTP et présentent une diminution de l'expression de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA, indiquant que par sa liaison à GluR1, p62 contrôle le trafic du récepteur AMPA et régule la LTP dans les neurones de l'hippocampe (Jiang et al., 2009). D'autres études montrent que l'induction chimique de la dépression à long terme dans les neurones augmente le taux de LC3-II, la déphosphorylation de Akt et de mTOR et la dégradation de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (Shehata et al., 2012). Le blocage de l'autophagie restaure l'expression basale de GluR1. De plus, les mêmes auteurs décrivent l'implication du récepteur au glutamate NMDA dans l'autophagie. En effet, la dépolarisation de neurones hippocampiques en culture augmente le taux de LC3-II et le nombre d'autophagosomes mais n'a pas d'effets si un inhibiteur du récepteur NMDA est appliqué dans le milieu de culture. Ces résultats indiquent que l'autophagie est dépendante du récepteur NMDA et est induite par la voie PI3K-Akt-mTOR provoquant la dégradation des récepteurs AMPA (Shehata et al., 2012). L'activité de mTOR a été également impliquée dans la plasticité synaptique et l'apprentissage dépendants de la synthèse protéique par son action sur Atg13 qui bloque Atg1 (Kamada et al., 2010). Inversement, la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, empêche la synthèse protéique et bloque la plasticité synaptique et les capacités d'apprentissage et la mémoire (Long et al., 2004 ; Richter & Klann, 2009). L'autophagie a également été impliquée dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique. La rapamycine induit l'autophagie dans les compartiments présynaptiques des neurones dopaminergiques corrélée à la diminution de leur volume axonal, du nombre de vésicules synaptiques et de la libération de la dopamine. A l'inverse, chez des souris transgéniques chez lesquelles l'autophagie est bloquée dans les neurones dopaminergiques, la libération de la dopamine est augmentée (Hernandez et al., 2012), suggérant que l'augmentation de l'autophagie altère les compartiments présynaptiques et module la neurotransmission.

Le rôle cardinal de l'autophagie dans la neuroprotection, le développement et la plasticité synaptique suggère qu'un dysfonctionnement de ce mécanisme pourrait avoir des conséquences importantes dans le SNC.



**Figure 12. Autophagie et physiologie neuronale.** L'autophagie recycle ses composants pour maintenir l'homéostasie neuronale et réguler la croissance et la plasticité synaptique. **1.** Dégradation autophagique des organelles, des vésicules synaptiques et des protéines. **2.** Autophagie des récepteurs TrkA liés à NGF endocytés dépendante de ULK1. **3.** Transport rétrograde des autophagosomes par la dynéine. **4.** Activation par GluRδ2 de l'autophagie dépendante de bécline-1 via nPIST. **5.** Autophagie des récepteurs post-synaptiques endocytés. **6.** Transport antérograde des autophagosomes par la kinésine. **7.** Formation des autolysosomes par fusion des autophagosomes et des lysosomes. Adaptée de [Ragagnin et al., 2013](#).

### 3. Interactions entre apoptose et autophagie

La recherche d'interactions entre les voies de l'autophagie et de l'apoptose a montré que les membres de la famille Bcl-2, bécline-1 et Atg agissent à l'interface entre ces deux voies ([Maiuri et al., 2007a](#) ; [Giansanti et al., 2011](#)).

BCL-2 et BCL-XL sont impliqués dans la voie autophagique et la voie apoptotique. Les deux protéines se lient par leur domaine BH3 à bécline-1 et inhibent son activité. En condition de privation de nutriments, la phosphorylation de BCL-2 par JNK1 provoque la séparation de BCL-2 et bécline-1 et l'induction de l'autophagie ([Maiuri et al., 2007b](#) ; [Patingre et al., 2005](#)). BCL-2 se lie alors à BAX et inhibe l'apoptose ([Wei et al., 2008a, 2008b](#)). Lorsque la cellule fait face à des conditions de privation de nutriments prolongées, BCL-2 est hyperphosphorylée par JNK1 et se détache de BAX qui est alors capable d'induire l'apoptose ([Wei et al., 2008b](#)). Un modèle a été proposé pour expliquer les propriétés de liaison de BCL-2 à la fois à des protéines pro-autophagique et pro-apoptotique. L'affinité de BCL-2 serait plus forte pour les protéines pro-apoptotiques que pour Bécline-1 car les membres de la famille Bcl-2 possèdent le même domaine BH3 ([Wei et al., 2008b](#) ; [Maiuri et al., 2007b, 2007c](#)). De plus, l'absence des acides aminés hydrophobes en position 119 contenant la thréonine diminue l'affinité de bécline-1 et BCL-2 en comparaison avec celle des protéines contenant BH3 ([Feng et al., 2007](#)). En

effet, la phosphorylation de bécline-1 sur Thr119 par la kinase DAPK (*death-associated protein kinase*) provoque sa dissociation de BCL-2 et l'activation de l'autophagie. DAPK participe également à l'apoptose par son interaction avec des protéines du cytosquelette (Zalckvar et al., 2009 ; Bovellan et al., 2010).

L'interaction entre autophagie et apoptose est également réalisée par des membres de la famille Atg tels qu'Atg5 et Atg3. Atg5 possède un double rôle : en plus de son rôle d'activateur de l'autophagie, Atg5 participe à la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose. Par exemple, la surexpression d'Atg5 sensibilise les cellules à la chimiothérapie inductrice d'apoptose (Yousefi et al., 2006) et sa déficience confère une résistance cellulaire à certaines drogues anti-cancéreuses. Pendant l'apoptose, Atg5 est clivée par la calpaïne, entraînant sa translocation dans la mitochondrie où elle interagit avec BCL-XL et contrôle la libération pro-apoptotique du cytochrome c dans le cytosol. A l'inverse, l'absence d'Atg5 dans la mitochondrie entraîne l'autophagie (Yousefi et al., 2006 ; Bhutia et al., 2010).

Une autre protéine de la famille Atg, Atg3, est régulée par FLIP (*FLICE-inhibitory protein*), un inhibiteur de FADD dans la voie extrinsèque de l'apoptose. FLIP peut donc réguler l'apoptose par sa liaison à FADD mais également induire l'autophagie en liant et activant Atg3 qui bloque la conjugaison de PE à LC3 (Lee et al., 2009).

Les caspases sont capables de dégrader des protéines impliquées dans l'autophagie. Par exemple, la caspase-3 active clive bécline-1 et donc inhibe l'autophagie. La caspase-3 clive également d'autres substrats et permet l'activation de l'apoptose et la potentialisation des stimuli apoptotiques provoqués par exemple par la privation de facteurs de croissance (Luo & Rubinsztein, 2010 ; Wirawan et al., 2010 ; Djavaheri-Mergny et al., 2010).

Le facteur de transcription p53 est un inducteur de l'apoptose : il régule positivement BAX et provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Aussi, il agit sur mTOR en activant AMPK et les suppresseurs de tumeurs TSC1 et TSC2 qui inhibent mTOR et activent l'autophagie (Feng et al., 2005) et augmente la synthèse du régulateur lysosomal de l'autophagie, DRAM (Damage regulated autophagy modulator), ce qui active l'autophagie. Le blocage de l'autophagie peut être levé par le blocage de p53 (Tasdemir et al., 2008 ; Galluzzi et al., 2011). A l'inverse, p53 régule négativement LC3 dans des cellules en condition de privation de nutriments et ainsi, contrôle de manière fine le flux autophagique (Scherz-Shouval et al., 2010).

#### 4. Mécanismes de mort neuronale dans les maladies à prions

Le blocage de l'autophagie provoquée par la déficience en protéine Atg5, Atg7 ou Pdk1, un inhibiteur de mTOR, ou l'altération du mécanisme de sélection des cargos à dégrader (p62, NBR1, ALFY) est suffisant pour induire la neurodégénérescence et la mort neuronale (Hara et al., 2006 ; Komatsu et al., 2006 ; Clausen et al., 2010 ; Knaevelsrud & Simonsen, 2010 ; Wullschleger et al., 2006). De même, la surexpression d'Atg1 provoque la mort neuronale (Scott et al., 2007). La perturbation d'une des étapes de l'autophagie est critique et induit l'accumulation de composants cytosoliques anormaux menant à des états pathologiques.

L'autophagie et l'apoptose ont été détectées dans de nombreuses maladies neurodégénératives déclenchées par la formation et l'agrégation de protéines mal-conformées ubiquitinylées dans les neurones. Ainsi, la dégradation des protéines anormales telles que l' $\alpha$ -synucléine dans la maladie de Parkinson, le peptide amyloïde- $\beta$  (A $\beta$ ) et les formes de tau dans la maladie d'Alzheimer, des formes mutantes de SOD1 dans la sclérose latérale amyotrophique ou encore la protéine prion dans les encéphalopathies spongiformes est effectuée dans les neurones par l'autophagie (Webb et al., 2003 ; Pickford et al., 2008 ; Kabuta et al., 2006 ; Xu et al., 2012 ; Heitz

et al., 2010). Ces protéines contribuent à la dysfonction synaptique, à l'altération des organites et à la mort neuronale par apoptose. Les neurones dégénérescents sont caractérisés par une accumulation importante d'autophagosomes dans leur cytoplasme (Petersen et al., 2001 ; Rubinsztein et al., 2005 ; Ventruti & Cuervo, 2007 ; Nixon et al., 2008 ; Lee et al., 2010 ; Mariño et al., 2011 ; Heitz et al., 2006, 2010 ; Ragagnin et al., 2013), suggérant un dérèglement du flux autophagique provoqué par un « stress autophagique », c'est-à-dire un déséquilibre entre les processus de synthèse et de dégradation protéique (Petersén et al., 2001). Ce dérèglement du flux autophagique empêche l'élimination des protéines mal-repliées et des organites endommagés qui s'accumulent dans le cytoplasme et contribuent à la dysfonction puis à la mort neuronale (Cuervo, 2004a ; Cuervo et al., 2004b). L'activation de l'autophagie réduit les agrégats neuronaux et ralentit la progression des symptômes neurologiques dans des modèles expérimentaux de MA (Nixon, 2007 ; Spilman et al., 2010 ; Yang et al., 2011) et des maladies à prions (Heiseke et al., 2009 ; Cortes et al., 2012).

Le mécanisme permettant l'activation de l'autophagie pour l'élimination des protéines agrégées n'est pas clairement identifié. Le blocage d'autres mécanismes de dégradation tels que le protéasome ou l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes par les protéines mal-conformées ou d'autres facteurs, peut induire l'activation de la macroautophagie (Massey et al., 2006). Bien que les raisons du dysfonctionnement de ces mécanismes ne soient pas encore identifiées, certains facteurs comme le stress et le vieillissement semblent les favoriser et provoquer le blocage du flux qui entraîne lui-même l'accumulation de protéines agrégées même en l'absence de protéines pathologiques conduisant à la mort neuronale (Martinez-Vicente & Cuervo, 2007 ; Hara et al., 2006 ; Komatsu et al., 2006). Le mécanisme de mort cellulaire autophagique n'est pas connu. Des études indiquent que les cellules autophagiques montrent aussi des marqueurs de l'apoptose (Martin & Baehrecke, 2004 ; Heitz et al., 2010), suggérant que le dysfonctionnement ou la sur-activation de l'autophagie pourrait entraîner la mort neuronale par un cross-talk avec la voie apoptotique.

#### 4.1. Apoptose dans les maladies à prions

Le premier indice de l'activation de l'apoptose dans les maladies à prions a été la détection de la fragmentation nucléaire dans des neurones primaires en culture, exposés au peptide neurotoxique PrP(106-126), utilisé comme modèle de la neurotoxicité des prions (Forloni et al., 1993). La fragmentation nucléaire, le clivage de l'ADN et l'activation de la caspase-3 sont observés dans le cerveau de patients atteints de MCJ (Ferrer et al., 1999, 2002 ; Gray et al., 1999 ; Lucas et al., 1997) et d'insomnie fatale familiale (Dorandeu et al., 1998), confirmant l'intervention de l'apoptose dans les maladies à prions. L'analyse de cerveaux de moutons (Fairbairn et al., 1994) et de bovins (Theil et al., 1999) infectés par les prions montre l'activation de l'apoptose. De même, l'apoptose est observée dans le cervelet, le cortex cérébral et l'hippocampe de souris infectées expérimentalement par les souches de tremblante 301V, 87V et 22A (fragmentation de l'ADN, condensation nucléaire) (Lucassen et al., 1995), dans la couche granulaire du cervelet infecté par la souche 79A (Giese et al., 1995), dans de nombreuses régions du cerveau comme la couche granulaire du cervelet, le cortex cérébral, les colliculi supérieurs et l'hypothalamus de souris infectées par la souche Fujisaki de la MCJ (Jesionek-Kupnicka et al., 2001). L'activation des caspases-3 est démontrée dans le thalamus, le pont de Varole et la couche granulaire du cervelet chez des souris infectées par la tremblante (Drew et al., 2011 ; Sisó et al., 2002). Des souris transgéniques qui expriment une PrP<sup>C</sup> mutée dans la région de répétition des octapeptides et associée à la démence et l'ataxie dans les maladies à prions d'origine génétique présentent une perte neuronale importante par apoptose des cellules granulaires du cervelet (Chiesa et al., 2000) corrélée à une ataxie progressive. Dans

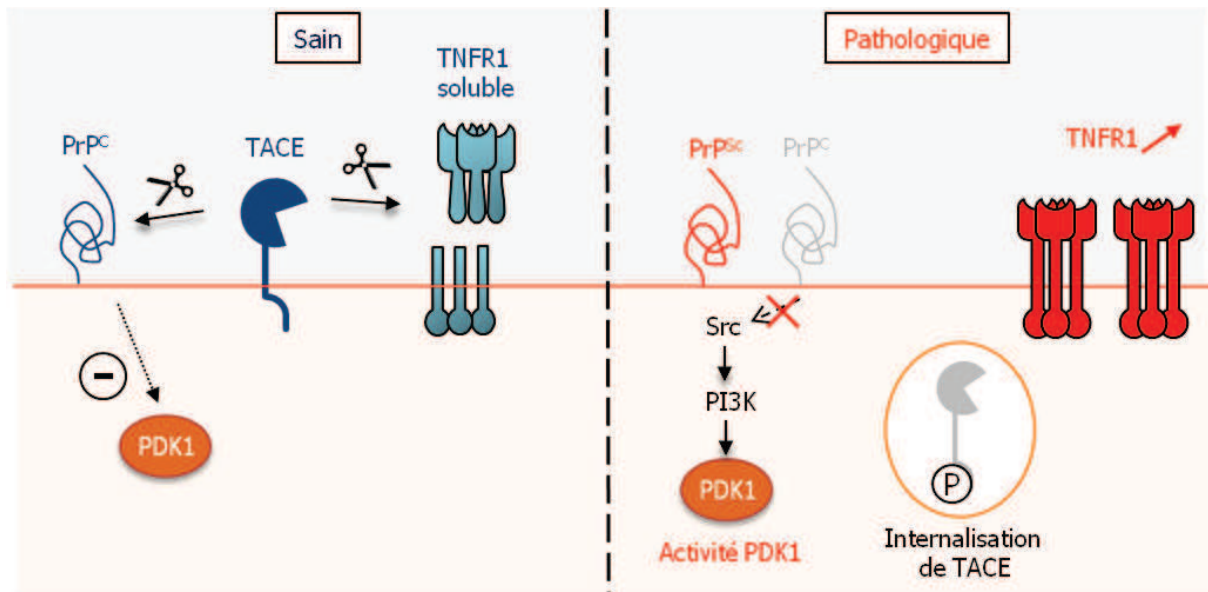
certaines maladies à prions d'origine familiale, une forme prédominante transmembranaire de PrP<sup>C</sup>, <sup>C<sup>tm</sup></sup>PrP, a été trouvée dans le cerveau. Des souris transgéniques exprimant cette protéine présentent une neurodégénérescence similaire à celle décrite dans certaines maladies à prions d'origine familiale (Hegde et al., 1998). Les signatures morphologiques et biochimiques de l'apoptose sont aussi détectées *in vitro* dans les neurones corticaux, les cellules hypothalamiques, les CGs et dans les cultures organotypiques de cervelet infectées par la tremblante (Müller et al., 1993 ; Schätzl et al., 1997 ; Cronier et al., 2004 ; Falsig et al., 2012).

Mon équipe et d'autres groupes ont recherché comment le blocage de l'apoptose peut prévenir ou améliorer la pathologie des prions. La surexpression du facteur anti-apoptotique BCL-2 ou du facteur pro-apoptotique BAX par transgénèse ne prévient pas la mort neuronale ni la progression de la maladie chez des souris infectées par les prions (Heitz et al., 2006 ; Coulpier et al., 2006 ; Steele et al., 2007a). Il en est de même de la délétion de la caspase-12 chez des souris infectées par la tremblante RML (Steele et al., 2007b). La délétion de BAX chez les souris transgéniques Tg(PG14) semble prévenir la mort des cellules granulaires, mais pas la dégénérescence synaptique ni la progression de la maladie (Chiesa et al., 2005). Ces résultats indiquent que cibler les membres de la famille Bcl-2 ou la voie du réticulum endoplasmique (caspase-12) est insuffisant pour prévenir la neurodégénérescence et suggère l'implication d'un mécanisme alternatif ou additionnel qui conduirait à la perte synaptique et à la mort neuronale.

#### 4.2. Un mécanisme apoptotique dépendant de TNFR1 dans les maladies à prions

Un mécanisme apoptotique gouverné par TNFR1 pourrait être mis en jeu dans les neurones infectés par les prions. Une partie de ma thèse est consacré à la poursuite d'une étude montrant que l'infection *in vitro* des neurones sérotoninergiques dérivés de la lignée neuroectodermale 1C11 (1C11<sup>5-HT</sup>) par la tremblante 22L ou Fukuoka-1 (Fk) entraîne l'augmentation du taux de TNFR1 à la membrane plasmique. A l'inverse, dans les cultures 1C11<sup>5-HT</sup> et dans des cultures de cellules granulaires infectées par les prions, le taux de TNFR1 soluble libéré dans le milieu est dix fois inférieur à celui des cultures non-infectées (Pietri et al., 2013). Les souris infectées par 22L présentent un taux de TNFR1 soluble dans le fluide céphalorachidien trois fois inférieur à celui mesuré chez les animaux non-infectés. Cette accumulation de TNFR1 à la surface témoigne de l'absence de clivage du récepteur et rend les neurones plus sensibles aux effets de TNF- $\alpha$ . Elle est corrélée avec l'activation de caspase-3.

La métalloprotéase TACE, connue pour son rôle dans le clivage de TNF- $\alpha$ , participe également au shedding de son récepteur TNFR1, ainsi qu'au clivage de PrP<sup>C</sup> et d'APP (Buxbaum et al., 1998 ; Vincent et al., 2001 ; De Strooper, 2010). La dérégulation de l'activité de clivage de TACE est décrite dans la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions (Sennvik et al., 2000 ; Westergard et al., 2011). Dans les cultures 1C11<sup>5-HT</sup> et les cultures de cellules granulaires infectées par 22L, TACE n'est pas détectée à la surface des neurones mais est phosphorylée, internalisée et colocalisée avec la cavéoline-1 (Pietri et al., 2013). La phosphorylation sur des résidus thréonine et l'internalisation de TACE est réalisée par la voie Src kinases/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/3-phosphatidylinositol-dependent kinase-1 (PDK1), l'inhibition de PDK1 entraînant la déphosphorylation de TACE et sa relocalisation à la membrane plasmique (**Figure 13**). De manière intéressante, un mécanisme similaire entre en jeu dans la maladie d'Alzheimer.



**Figure 13. Dérégulation de TACE par PDK1 dans les neurones infectés par les prions.** En situation pathologique (maladies à prions, maladie d'Alzheimer), la suractivation de PDK1 dans les neurones provoque la phosphorylation et l'internalisation de TACE. L'inhibition de l'activité de clivage de TNFR1 par TACE favorise la formation de PrP<sup>Sc</sup> et entraîne l'accumulation des récepteurs TNFR1 à la surface des neurones, sensibilisant de fait les neurones aux effets du TNF- $\alpha$ . L'inhibition de PDK1 permet le réadressage de TACE à la surface des neurones et de restaurer ses clivages neuroprotecteurs. TACE diminue l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup>, la production d'A $\beta$  et restaure une sensibilité physiologique au TNF- $\alpha$ . Adaptée de [Pietri et al, 2014](#)).

#### 4.3. Apoptose et stress du réticulum endoplasmique dans les maladies à prions

Le cerveau de patients atteints de MCJ présente une forte élévation de l'expression des protéines chaperones du RE, Grp58, Grp78/Bip et Grp94. Aucune altération de l'expression de la protéine chaperone Hsp70 n'est observée. Dans les mêmes échantillons de cerveau humain, la caspase-12 est activée, suggérant l'implication du stress du RE comme mécanisme de mort neuronale dans les maladies à prions ([Hetz et al., 2003](#)). Ces résultats sont confirmés expérimentalement chez des souris infectées par la souche de tremblante 139A. L'augmentation de la caspase-12 active est la plus forte dans l'hippocampe et le thalamus. La voie du stress du RE est corrélée à l'augmentation de la protéine chaperone Grp58, la progression de la maladie et la perte des neurones, tandis que l'expression des protéines chaperones Hsp70, Hsp60 et Grp94 ne varie pas, suggérant que PrP<sup>Sc</sup> génère une réponse neuroprotectrice par le RE en vue de sa dégradation ([Hetz et al., 2003](#)). Cependant, en apparence contradiction avec ces résultats, les souris déficientes en caspase-12 infectées par la souche de tremblante RML ne présentent aucune amélioration de survie, de leur comportement ou de de l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> comparé aux souris exprimant caspase-12, suggérant que cette caspase n'est pas impliquée dans la pathologie des prions ([Steele et al, 2007b](#)).

Des corrélations entre le stress oxydatif et les maladies à prions ont été recherchées. Des analyses immunohistochimiques ont montré une augmentation de conjugués protéine-ubiquitine proches des plaques amyloïdes ([Ironside et al., 1993](#)) et dans les inclusions intra-neurales ([Lowe et al., 1990](#) ; [Ironside et al., 1993](#)). L'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau de souris infectées par RML entraîne une diminution de la traduction et de la synthèse protéique via la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Ceci est corrélé à un déficit synaptique et à la perte neuronale dans l'hippocampe et réduit la durée de vie des souris ([Moreno et al., 2012](#)). A l'inverse, la restauration de la synthèse protéique est neuroprotectrice, indiquant l'importance de la voie du stress du RE.

#### 4.4. Apoptose chez les souris déficientes en protéine prion cellulaire

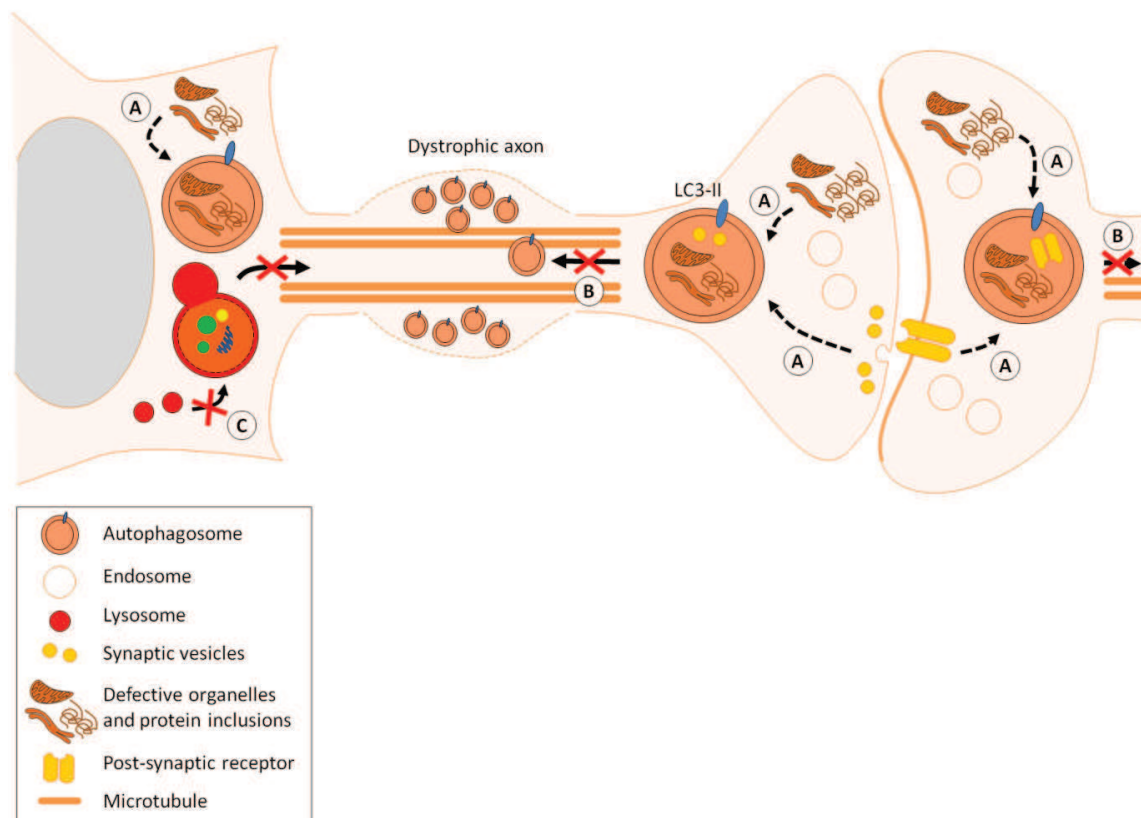
La recherche des fonctions de PrP<sup>C</sup> a mené à la création de souris déficientes en PrP<sup>C</sup>. La large délétion du gène *Prnd* codant PrP<sup>C</sup> entraîne l'expression ectopique dans les neurones de la protéine Doppel (Dpl), le paralogue neurotoxique de PrP<sup>C</sup> qui provoque la mort des cellules de Purkinje du cervelet corrélée à l'ataxie chez les souris Nagasaki (Ngsk) *Prnp*<sup>0/0</sup> (Sakaguchi et al., 1996), Rcm0 (Moore et al., 1995), Zürich-II (ZH-II) (Rossi et al., 2001) et Rikn (Yokoyama et al., 2001). Une dégénérescence similaire des cellules de Purkinje est observée quand la forme de PrP<sup>C</sup> tronquée de sa région N-terminale ( $\Delta$ PrP) est exprimée chez les souris déficientes en PrP<sup>C</sup> (Flechsig et al., 2003) ou quand Dpl est surexprimée par transgénèse dans les neurones (Anderson et al., 2004 ; Yamaguchi et al., 2004b). La réintroduction de PrP<sup>C</sup> entière antagonise les effets toxiques de Dpl et  $\Delta$ PrP, mais pas ceux causés par PrP<sup>C</sup> tronquée des résidus 23-88 (Atarashi et al., 2003), suggérant que Dpl et  $\Delta$ PrP induisent la mort neuronale par un mécanisme similaire, probablement en interférant avec une voie de survie cellulaire contrôlée par PrP<sup>C</sup> (Anderson et al., 2004 ; Shmerling et al., 1998). Les mécanismes qui sous-tendent la neurotoxicité de Dpl ne sont pas totalement élucidés. Sakudo et al ont montré que Dpl induit la mort des neurones déficients en PrP<sup>C</sup> par apoptose (Sakudo et al., 2005). L'augmentation des composés réactifs à l'oxygène induite par Dpl *in vitro* et *in vivo* suggère l'implication du stress oxydatif dans la mort neuronale (Cui et al., 2003 ; Wong et al., 2001).

L'apoptose induite par Dpl est inhibée à la fois par PrP<sup>C</sup> endogène et exogène *in vivo* et *in vitro* du fait des propriétés anti-apoptotiques de PrP<sup>C</sup> qui sont similaires à celles de BCL-2 (Kuwahara et al., 1999). Comme BCL-2, PrP<sup>C</sup> antagonise la voie mitochondriale de l'apoptose, protégeant ainsi les neurones de la mort cellulaire (Diarra-Mehrpour et al., 2004 ; Paitel et al., 2004 ; Solforosi et al., 2004). Chez le double mutant Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>-*Hu-Bcl-2* qui surexprime Dpl et BCL-2, une proportion de neurones est sauvée comparée au simple mutant Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> qui perd des cellules de Purkinje à partir de 6 mois, montrant l'implication de BCL-2 dans l'apoptose induite par la neurotoxicité de Dpl (Heitz et al., 2008). Le domaine N-terminal de PrP<sup>C</sup> homologue au domaine BH2 de la famille Bcl-2 est probablement responsable de la fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup>. En effet, ce domaine est absent chez Dpl et  $\Delta$ PrP (Flechsig et al., 2003 ; Shmerling et al., 1998 ; Li et al., 2007). De plus,  $\Delta$ PrP peut induire l'apoptose dépendante et indépendante de BAX (Li et al., 2007). Comme BCL-2, PrP<sup>C</sup> par son domaine N-terminal peut donc agir sur la protéine pro-apoptotique BAX et empêcher son activation (Roucou et al., 2005 ; Cheng et al., 2001 ; Oltvai et al., 1993). La mort neuronale induite par Dpl dans des cultures primaires de cellules granulaires est inhibée dans les neurones déficients en BAX ou bloquée pharmacologiquement par des inhibiteurs de la caspase-3, indiquant l'implication de ces deux facteurs dans le mécanisme neurotoxique provoqué par Dpl (Didonna et al., 2012), confirmant les résultats obtenus en 2006 par mon équipe (Heitz et al., 2006). En effet, les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> âgées de 6 mois ont perdu un nombre de cellules de Purkinje plus important que les souris *Bax*<sup>-/-</sup> : Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, indiquant que l'absence de BAX sauve les neurones de la toxicité de Dpl. Cependant, chez le mutant Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup>, bien que le nombre de cellules de Purkinje soit supérieur au nombre de cellules de Purkinje chez le simple mutant Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, il est inférieur à celui compté chez le sauvage, indiquant qu'une proportion de cellules de Purkinje meurent par une voie indépendante de BAX. Dpl active donc une voie dépendante et une voie indépendante de BAX (Heitz et al., 2006).



#### 4.5. Autophagie dans les maladies à prions

Des corps multi-vésiculaires et des vacuoles autophagiques s'accumulent dans le soma, les neurites et les synapses des neurones infectés par les prions en culture (Schätzl et al., 1997) et dans les cerveaux de patients atteints par la MCJ et la maladie de GSS (Liberski et al., 2008 ; Sikorska et al., 2004 ; Boellaard et al., 1989, **Figure 14**). Ceci suggère un lien entre l'autophagie et l'infection par les prions. La protéine SRG1 (*Scrapie responsive gene 1*) est sur-exprimée chez l'animal, dans le cerveau infecté par la tremblante et l'ESB et chez l'homme, dans le cerveau de patients atteints de la MCJ (Dron et al., 1998 ; Dandoy-Dron et al., 1998). SRG1 est associé aux autophagosomes dans les neurones (Dron et al., 2005, 2006). Aussi, le taux de LC3-II est augmenté dans le cytoplasme des neurones des patients atteints de MCJ et d'insomnie fatale familiale et dans le cerveau de hamsters infectés expérimentalement par la tremblante. La diminution du taux de p62 et des protéines poly-ubiquitinylées dans le cerveau de patients et d'hamsters infectés par les prions suggère une sur-activation de l'autophagie permettant une dégradation plus importante des protéines. Les résultats de Xu et al suggèrent que la dégradation de PrP<sup>Sc</sup> se ferait par la voie autophagique. L'entrée de PrP<sup>Sc</sup> dans la cellule se ferait par les endosomes, après fusion des endosomes avec les autophagosomes et PrP<sup>Sc</sup> serait adressée aux lysosomes (Xu et al., 2012). En accord avec cette hypothèse, le blocage de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes par la bafilomycine A1 permet de visualiser PrP<sup>Sc</sup> dans les autophagosomes (Xu et al., 2012 ; Hung et al., 2009), comme A $\beta$ 1-42 dans la maladie d'Alzheimer (Hung et al., 2009).



**Figure 14. Dysfonctionnement de l'autophagie dans les maladies à prions.** **A.** Biogenèse défective des autolysosomes. **B.** Blocage du transport rétrograde et accumulation des autophagosomes dans les neurites dystrophiques. **C.** Incapacité de fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Adaptée de Ragagnin et al., 2013.

Le rôle des lysosomes dans les maladies à prions est double. En effet, de manière paradoxale, l'application d'inhibiteurs des lysosomes prévient l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> (Heiseke et al., 2009) et à l'inverse, les agonistes de l'autophagie permettent d'augmenter la dégradation de PrP<sup>Sc</sup> (Doh-Ura et al., 2000 ; Ertmer et al., 2004). PrP<sup>Sc</sup> peut aussi détourner la voie autophagique/lysosomale et promouvoir la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>. En effet, la production de PrP<sup>Sc</sup> dans les lysosomes sature la capacité de dégradation des lysosomes, entraînant leur rupture et la libération des agrégats de PrP<sup>Sc</sup> et des enzymes de dégradation lysosomales dans le cytoplasme, contribuant à la sur-activation de l'autophagie et à la mort neuronale (Xu et al., 2012). La diminution de l'autophagie du fait de la dysfonction de la voie endosomale/lysosomale peut contribuer au développement des maladies à prions. L'utilisation de l'imatinib, une drogue anti-cancéreuse inductrice de l'autophagie active la dégradation lysosomale de PrP<sup>Sc</sup> (Ertmer et al., 2004, 2007). Quand l'imatinib est administrée précocément au cours de l'infection périphérique, elle empêche la neuroinvasion de PrP<sup>Sc</sup> et l'apparition des symptômes cliniques chez les souris infectées par les prions (Yun et al., 2007). L'augmentation de l'induction du flux autophagique a un effet bénéfique dans la dégradation des agrégats dans les maladies à prions et d'autres maladies neurodégénératives. A la fois le lithium et le tréhalose, deux inducteurs de la voie autophagique indépendante de mTOR et la rapamycine qui, en inhibant mTOR active l'autophagie, augmentent la dégradation de PrP<sup>Sc</sup> dans les cellules *in vitro* (Heiseke et al., 2009 ; Aguib et al., 2009). Il est cependant également possible que le traitement des cellules avec le lithium réduise la formation de PrP<sup>Sc</sup> en provoquant l'internalisation de PrP<sup>C</sup> et donc la diminution de son expression à la membrane neuronale (Sunyach et al., 2003 ; Heiseke et al., 2009).

Il a été montré récemment que PrP<sup>C</sup> contrôle l'induction de l'autophagie. En effet, L'autophagie induite par la déprivation de sérum survient plus tôt et de manière plus importante dans les neurones hippocampaux déficients en protéine prion cellulaire que dans les neurones sauvages. La réintroduction de PrP<sup>C</sup> entière mais pas de PrP<sup>C</sup> tronquée de la région des répétitions d'octapeptides dans les neurones déficients en PrP<sup>C</sup> permet de supprimer la sur-régulation de l'autophagie consécutive à la privation de sérum, indiquant que la région N-terminale neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup> contenant la séquence des octapeptides répétés régule négativement l'autophagie (Oh et al., 2008). La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> peut donc interférer avec la fonction de cette région et provoquer l'activation de l'autophagie dans les maladies à prions. De plus, l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec la protéine de stress STI-1 est neuroprotectrice via son interaction avec mTOR dans des neurones hippocampiques *in vitro*, lui suggérant un rôle dans le contrôle de l'induction de l'autophagie qui peut être aboli dans les maladies à prions (Roffé et al., 2010).

De nombreux composés ciblant la voie autophagique sont de possibles candidats dans le traitement des maladies à prions. L'administration de la rapamycine permet de réduire la sévérité des symptômes et diminue la déposition de PrP<sup>Sc</sup> dans un modèle expérimental murin de la maladie de GSS (Cortes et al., 2012). Des résultats similaires sont obtenus avec le lithium (Heiseke et al., 2009). L'induction de l'autophagie par l'enzyme Sirt1 (déacétylase des histones de classe III) protège les neurones de la toxicité du peptide PrP(106-126) et de la dysfonction mitochondriale (Jeong et al., 2013). Le mécanisme autophagique neuroprotecteur induit par Sirt1 demande des travaux supplémentaires pour mieux comprendre la voie de signalisation de Sirt1 incluant FOXOs, p53 et PGC $\alpha$ .

#### **4.6. Autophagie chez les souris déficientes en protéine prion cellulaire**

Dpl pourrait activer une voie autophagique aboutissant à la mort neuronale indépendante de BAX. En effet, une augmentation de l'ARNm et des taux des marqueurs de l'autophagie, les protéines Srg1, LC3-II et p62,

sans augmentation de leur ARNm est mesurée dans le cerveau des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (Dron et al., 2005 ; Heitz et al., 2008), suggérant que la dégradation des produits de l'autophagie est altérée chez ces souris. Des vacuoles autophagiques se sont anormalement accumulées dans les compartiments somato-dendritiques et axonaux des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>. Les profils autophagiques sont les plus abondants dans les axones dystrophiques des cellules de Purkinje dans le cortex cérébelleux et dans les terminaisons au niveau des noyaux profonds, suggérant l'initiation axonale de l'autophagie. Ces résultats suggèrent que Dpl provoque une dysfonction de l'autophagie dans les neurones Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>.

## Chapitre II

### Principaux points abordés

- L'apoptose est un mécanisme de mort neuronale programmé participant au développement et à la physiologie de l'organisme. Elle peut être (i) extrinsèque, dépendante d'un récepteur de mort comme TNFR1, (ii) intrinsèque mitochondriale et (iii) provoquée par le stress du réticulum.
- L'autophagie assure le recyclage des protéines et organites endommagés et ainsi contribue à l'homéostasie neuronale notamment au niveau des synapses où elle est initiée. Les cascades d'interactions moléculaires qui sous-tendent l'autophagie sont complexes et régulées par les protéines de la famille Atg ; elles mènent à la dégradation des composants cellulaires et moléculaires par les lysosomes.
- La voie autophagique et la voie apoptotique interagissent par l'intermédiaire de protéines communes aux deux voies telles que Bcl-2, Atg3, Atg5, p53 et caspase-3.
- L'apoptose et l'autophagie interviennent dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions. L'activation de l'apoptose et la dérégulation de la machinerie autophagique contribuent à la mort neuronale dans ces maladies.
- Les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> surexprimant Dpl, le paralogue neurotoxique de PrP<sup>C</sup>, constituent un modèle d'étude des protéines prions et des mécanismes de mort neuronale. Le facteur proapoptotique BAX et l'enrayement de l'autophagie contribuent à la mort prématurée des cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>.

# CHAPITRE III

## Le cervelet

---

Le cervelet est une structure du système nerveux central située à l'arrière du tronc cérébral à la jonction entre le télencéphale et le métencéphale dans la fosse postérieure du crâne (Bossy, 1990, **Figure 15A**). Malgré sa petite taille (10 à 15 % du poids du cerveau), c'est la structure cérébrale contenant le plus de neurones. Les cellules granulaires représentent en effet plus de la moitié des neurones du cerveau humain (Lange, 1975 ; Azevedo et al., 2009). Le cortex cérébelleux présente une architecture cellulaire laminaire comprenant un nombre réduit de types neuronaux facilement identifiables. Cette simplicité en fait un bon modèle expérimental comparé à la complexité du néo-cortex et à la multitude de types de neurones qu'il contient. Trois cordons de substance blanche, les pédoncules cérébelleux (supérieur, moyen et inférieur) relient le cervelet à l'encéphale. Par les pédoncules cérébelleux, le cortex cérébelleux reçoit l'information sensorielle, kinesthésique et motrice qu'il traduit en réponse motrice. Le rôle principal du cervelet est l'apprentissage et le contrôle des mouvements coordonnés. Il détecte la différence ou « erreur motrice » entre le mouvement prévu et le mouvement réalisé et corrige cette erreur par ses projections sur les neurones moteurs suprasegmentaires. Ces corrections s'effectuent pendant et après le mouvement et permettent l'apprentissage moteur. Lorsque le circuit cérébelleux est endommagé, le patient commet des erreurs motrices persistantes dont la nature dépend de l'emplacement de la lésion.

Le cervelet est un bon modèle d'étude de la mort cellulaire. L'absence de cervelet n'étant pas létale, de nombreux modèles murins transgéniques et expérimentaux de déficits cérébelleux ont pu être étudiés au cours du développement et à l'âge adulte. Aussi, l'atteinte du cervelet se manifeste par l'ataxie cérébelleuse : des déficits moteurs et des anomalies de la marche et de la posture qui sont facilement caractérisées. Le cervelet est vulnérable à de nombreuses agressions. Par exemple, il est sévèrement touché par l'ischémie, l'infection par virus Borna ou encore dans le cas de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Huntington (Sarna & Hawkes, 2003 pour revue ; Fukutani et al., 1996, 1997 ; Wegiel et al., 1999). Aussi, le cervelet est très atteint par les effets neurotoxiques des prions.

### 1. Cytoarchitecture du cervelet

Le cervelet est symétrique bilatéralement. Il est subdivisé longitudinalement en trois régions : une médiane, le vermis, une intermédiaire, le paravermis et une latérale constitué des hémisphères (Larsell, 1952). Sa surface est déprimée par de nombreux sillons qui lui confèrent un aspect multi-folié sagittalement. Le cervelet est divisé en lobes antérieur, postérieur et flocculo-nodulaire par les sillons primaire, transverse et postéro-latéral respectivement. Ces trois lobes se subdivisent en lobules qui sont nommés de I à X à partir du lobe antérieur du vermis jusqu'au lobe postérieur. Ainsi, le lobe antérieur contient les lobules IV, le postérieur les lobules IV-IX et le flocculonodulaire le lobule X. La lobulation est très conservée entre les individus et à travers l'évolution, malgré des différences du développement hémisphérique entre espèces (Brodal, 1969).

### 1.1. Structure du cortex et circuit cérébelleux

Le cervelet est composé de deux tissus principaux : une substance grise corticale trilaminaire et d'une substance blanche interne qui renferme les noyaux gris profonds (fastigial, interposé, denté). Histologiquement, le cortex cérébelleux est homogène. Au niveau microscopique, il est constitué par la répétition d'un même circuit élémentaire commun aux vertébrés tétrapodes (**Figure 15B**) et composé d'un petit nombre de types neuronaux : les cellules de Purkinje, les cellules granulaires et les interneurons dont les cellules paniers, les cellules étoilées, les cellules de Golgi, les cellules de Lugaro, les cellules unipolaires en brosse et les cellules candélabres (**Figure 15C, D**). La couche moléculaire externe contient les cellules paniers et étoilées, l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje distribuée en rangées parasagittales et les fibres parallèles provenant des cellules granulaires et faisant synapse avec les cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje constituent une monocouche dense dite couche des cellules de Purkinje située à l'interface des couches moléculaire et granulaire interne. La couche granulaire interne contient les cellules granulaires et les cellules de Golgi. L'axone des cellules de Purkinje est l'unique efférence du cortex cérébelleux ; il innerve les noyaux profonds du cervelet.

Les fibres grimpantes et les fibres moussues constituent les deux voies afférentes majeures du cervelet. D'autres afférences, moins étudiées, comme les afférences nucléocorticales proviennent des noyaux profonds et font synapse dans la couche granulaire interne. Des afférences noradrénergiques et sérotonergiques proviennent respectivement du locus coeruleus et du noyau du raphé. Les premières font synapse sur les cellules de Purkinje et les secondes forment une innervation diffuse dans le cortex (Hökfelt & Fuxe, 1969). Les fibres grimpantes et moussues acheminent les informations sensori-motrices provenant des différentes parties du corps vers les noyaux profonds et le cortex cérébelleux et pourraient sous-tendre les capacités d'apprentissage du cervelet (Ito, 2001).

### 1.2. La cellule de Purkinje, neurone central du circuit cérébelleux

La cellule de Purkinje (CP) est le neurone principal du cortex cérébelleux et constitue l'unique sortie du cortex cérébelleux vers les noyaux profonds (Palay & Chan-Palay, 1974 ; Ito, 1984). Décrite pour la première fois par le physiologiste J. Purkinje en 1837, la CP est constituée d'un soma ovoïde d'environ 20  $\mu\text{m}$  de diamètre d'où émerge une arborisation dendritique plane dans le plan sagittal de 15-20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et de 300-400  $\mu\text{m}$  de large entièrement contenue dans la couche moléculaire. Les troncs dendritiques primaires se ramifient en au moins deux branches dendritiques secondaires puis en de multiples branches tertiaires qui sont couvertes de milliers d'épines dendritiques (de ce fait, elles sont aussi qualifiées de « branches épineuses »). Les épines des dendrites tertiaires établissent des synapses avec les fibres parallèles (glutamatergiques) des cellules granulaires et se distinguent des épines dendritiques situées sur les troncs dendritiques primaires et secondaires établissant des synapses avec les fibres grimpantes des neurones de l'olive inférieure (Palay & Chan-Palay, 1974 ; Ito, 1984 ; Ramon y Cajal, 1911).

Les fibres grimpantes constituent la principale entrée du cortex cérébelleux. Des études d'électrophysiologie, d'autoradiographie et de dégénérescence ont montré qu'elles proviennent exclusivement de neurones situés dans l'olive inférieure (qui comprend l'olive principale, accessoire dorsale et accessoire médiane) et forme avec l'olive supérieure, l'olive bulbaire située dans la partie rostrale du bulbe (Eccles et al., 1967 ;

Courville & Faraco-Cantin, 1978 ; Desclin, 1974). L'olive inférieure reçoit des afférences de nombreuses parties du corps : des projections directes spino-olivaires qui cheminent dans le cordon latéral et antérieur de la moelle épinière et des projections indirectes des noyaux graciles et cunéens, des noyaux vestibulaires, des noyaux du trijumeau, du tectum, du prétegmentum mésencéphalique et du noyau rouge parvocellulaire. Elle reçoit également des projections des noyaux gris centraux et du cortex cérébral et notamment du cortex sensori-moteur. Les projections vers l'olive rostro-caudale sont organisées de façon somatotopique (Apps, 1998), alors que les projections vers l'olive accessoire médiane et caudo-dorsale ne semblent pas clairement définies (Berkley & Hand, 1978). Les axones olivocérébelleux franchissent la ligne médiane et se terminent dans la région contralatérale du cervelet. Seule une faible proportion de ces axones innerve la région ipsilatérale (Chan-Palay et al., 1977 ; Sugihara et al., 1999). A partir du pédoncule cérébelleux inférieur, les axones circulent dans la substance blanche et se connectent dans le cortex en suivant une distribution parasagittale (Azizi & Woodward, 1987). Dans la substance blanche, les axones sont fins (2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre) et myélinisés (Sugihara et al., 1999) et ils se démyélinisent dans la couche des cellules de Purkinje. Les axones s'enroulent ensuite autour de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et forment des varicosités qui établissent des synapses sur des épines portées par les troncs dendritiques principaux des cellules de Purkinje. Chaque CP est contactée par une fibre grimpante et chaque fibre grimpante émet des collatérales pré-corticales à destination des noyaux profonds (Palay & Chan-Palay, 1974 ; Sugihara et al., 1999, 2001 ; Ruigrok & Voogd, 2000) et corticales dans la couche granulaire qui lui permettent de contacter plusieurs cellules de Purkinje (Campbell & Armstrong, 1983 ; Armstrong et al., 1973 ; Wiklund et al., 1984). Par exemple, chez l'homme, une fibre grimpante est capable de contacter 15 cellules de Purkinje (Escobar et al., 1968). L'organisation topographique des connexions olive inférieure-fibre grimpante-cellules de Purkinje-noyaux profonds sera détaillée plus loin.

Le circuit cérébelleux est centré sur la CP dont l'axone émerge du pôle basal du soma, descend à travers la couche granulaire interne et établit des synapses GABAergiques sur les neurones des noyaux profonds. Certaines cellules de Purkinje situées dans les lobules IX, X et le paraflocculus font synapse sur le noyau vestibulaire (Ito, 1984). Des collatérales sont émises le long de l'axone descendant des cellules de Purkinje et entrent dans la couche des cellules de Purkinje dans le même plan sagittal que les dendrites. Elles contribuent aux plexus supra- et infra-ganglionnaire formés au-dessus et en-dessous des cellules de Purkinje et qui permettent l'inhibition de cellules de Purkinje, des cellules de Golgi et des cellules étoilées adjacentes (Palay & Chan-Palay, 1974).

Les cellules de Purkinje reçoivent l'information sensorielle des fibres moussues par l'intermédiaire des cellules granulaires glutamatergiques. La cellule de Purkinje possède une activité pacemaker. Des potentiels d'action (PA) dits « simples » sont évoqués spontanément à une fréquence de 20 à 60 Hz et la régularité de ce patron de décharge est régulé par les entrées excitatrices ou inhibitrices (Llinás & Sugimori, 1980 ; Raman & Bean, 1999). Les afférences moussues et grimpantes sur la CP sont excitatrices et engendrent des réponses électrophysiologiques très différentes. Les cellules granulaires produisent des PA « simples », tandis que les fibres grimpantes induisent des PA plus complexes et synchrones sur les cellules de Purkinje, composés de plusieurs PA sodiques et d'une réponse calcique, qui sont appelés « *complex spike* » (Eccles, 1967).

### 1.3. La cellule granulaire, interneurone excitateur relai des fibres moussues

Les fibres moussues constituent la seconde voie afférente principale du cervelet. Elles proviennent de multiples régions du tronc cérébral et de la moelle épinière : des noyaux spino-cérébelleux, vestibulo-cérébelleux,

réticulaire latéral, noyaux du pont réticulo-tegmental, noyaux cunéens externes et noyaux gris du pont (Palay & Chan-Palay, 1974 ; Voogd & Glickstein, 1998). Tandis que les fibres grimpantes provenant du tronc cérébral entrent dans le cervelet par le pédoncule contralatéral (Mihailoff et al., 1981), celles provenant de la moelle empruntent les pédoncules inférieur et supérieur (Chan-Palay et al., 1977). Comme les fibres grimpantes, les fibres moussues myélinisées cheminent dans la substance blanche et émettent des collatérales dans les noyaux profonds ainsi que sur le soma et les courts dendrites des cellules granulaires (Palay & Chan-Palay, 1974).

Les cellules granulaires reçoivent les terminaisons de plusieurs fibres moussues (ces synapses sont appelées « rosettes ») et les terminaisons axonales inhibitrices des cellules de Golgi, formant ainsi des synapses larges et complexes appelées glomérules. La cellule granulaire relaie les informations provenant des fibres moussues vers les cellules de Purkinje via les fibres parallèles longues de 5 mm qui montent verticalement à partir du soma dans la couche moléculaire où elles se scindent en T pour suivre parallèlement l'axe longitudinal du folium dans les deux directions. Les cellules granulaires font ainsi des synapses dites « en passant » sur les épines des dendrites tertiaires des cellules de Purkinje et sur les interneurons (Palay & Chan-Palay, 1974 ; Voogd & Glickstein, 1998). Une fibre moussue est capable de contacter plusieurs milliers de cellules de Purkinje (Harvey & Napper, 1991). Un rapport de 274 cellules granulaires par CP et une densité de fibres parallèles par mm<sup>2</sup> d'arborisation dendritique de CP de  $6\,070\,000 \pm 11\,000$  fibres parallèles/mm<sup>2</sup> ont été quantifiés (Napper & Harvey, 1988a, 1988b).

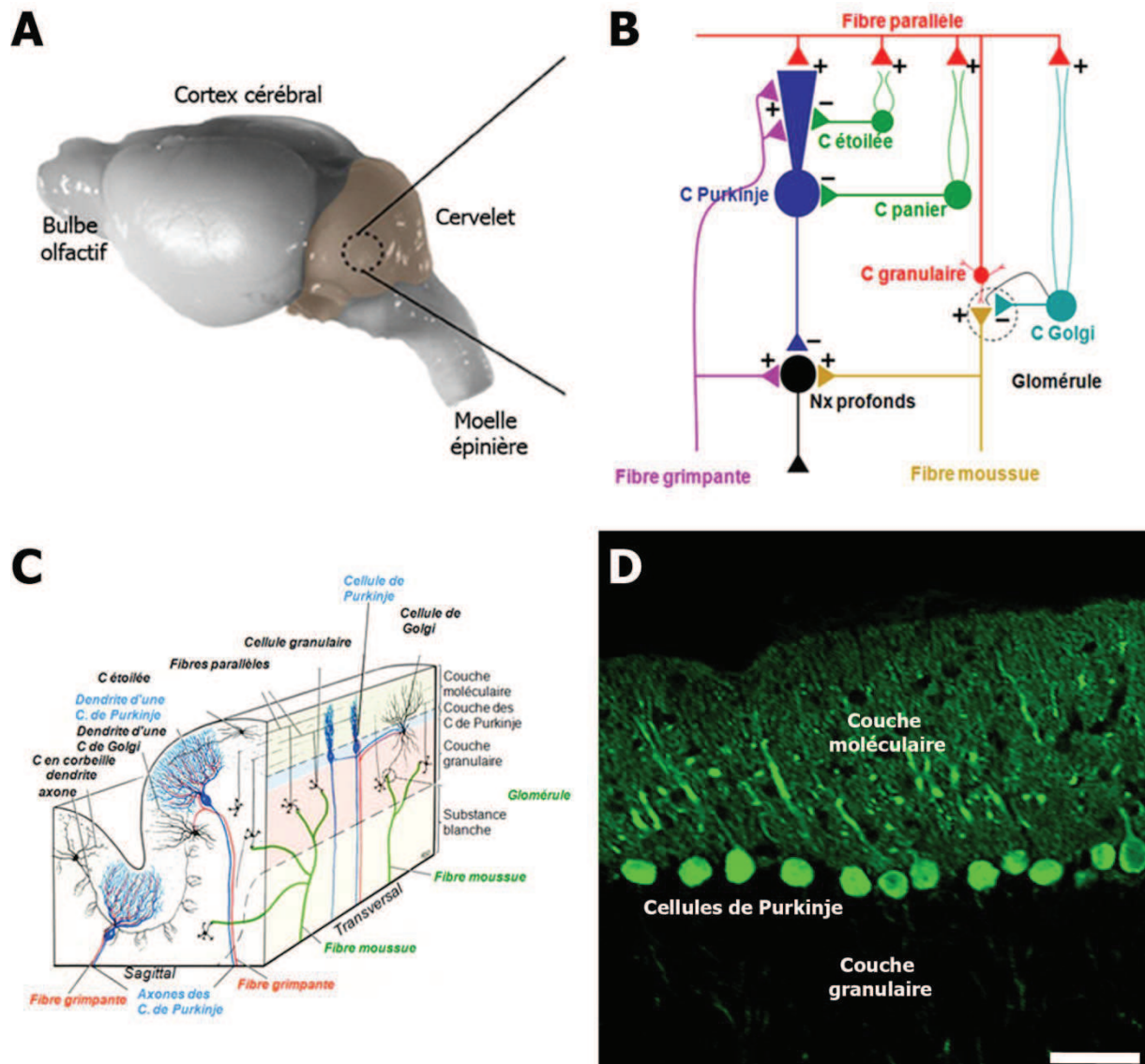
#### 1.4. Les interneurons

Outre les cellules granulaires, le cervelet contient six types d'interneurons dans le cortex cérébelleux : les interneurons paniers, les cellules étoilés, de Golgi, de Lugaro, unipolaires en brosse et candélabres (Palay & Chan-Palay, 1974 ; Mugnaini et al., 2011 ; Lainé & Axelrad, 1994). Hormi les cellules unipolaires en brosse qui sont glutamatergiques, les interneurons sont inhibiteurs (Eccles et al., 1966 ; Aoki et al., 1986).

Les cellules paniers et les cellules étoilées de la couche moléculaire reçoivent les informations des fibres parallèles et établissent des synapses inhibitrices respectivement sur le soma ou sur les dendrites des cellules de Purkinje voisines (Palay & Chan-Palay, 1974). Leur axone est long (500  $\mu$ m) et s'étend dans le plan parasagittal parallèlement à la couche des cellules de Purkinje. Les branches descendantes des cellules paniers forment des structures appelées « paniers » (Somogyi & Hamori, 1976). Les cellules de Golgi découvertes en 1874 par le médecin italien C. Golgi qui leur a donné leur nom sont situées dans la couche granulaire interne. Leur soma de forme polygonale émet des dendrites baso-latéraux connectés aux fibres moussues et des dendrites apicaux connectés aux fibres parallèles. Elles permettent un retour inhibiteur sur les cellules granulaires au niveau des jonctions glomérulaires (Palay & Chan-Palay, 1974), filtrant ainsi les informations entrantes. Les cellules de Lugaro sont situées dans la couche granulaire interne, à proximité du soma des PCs. Leur soma est fusiforme et leurs dendrites montent et se ramifient dans la couche des cellules de Purkinje. De manière étonnante, ces cellules possèdent deux plexus axonaux, l'un orienté de façon parasagittale, l'autre perpendiculaire au premier et projettent sur les cellules paniers et étoilées (Lainé & Axelrad, 1998). Les cellules unipolaires en brosse sont insérées sur la voie fibre moussue-cellule granulaire-CP et sont différemment distribuées selon les lobules, indiquant une localisation régionale précise de ces cellules dans le cortex. Elles possèdent un dendrite unique dont la pointe forme une « touffe » dendritique en forme de brosse qui émet des évaginations ou filopodes en contact avec les fibres moussues (une fibre moussue contactant une cellule unipolaire en brosse) et avec de multiples axones de cellules de Golgi (Mugnaini et al., 2011). Leurs axones innervent d'autres cellules unipolaires



en brosse et de très nombreuses cellules granulaires et sont ainsi capables d'amplifier le signal d'une fibre moussue et de moduler les réponses du circuit cérébelleux. Le soma pyriforme des cellules candélabres sont insérés entre le soma des cellules de Purkinje. Une à deux dendrites émergent du pôle apical et traversent la couche moléculaire jusqu'à la pie-mère. D'autres dendrites, plus fines, ont pour origine la partie proximale des dendrites de la couche moléculaire et parcourent une courte distance dans la couche granulaire interne. Leur axone est horizontal et contacte les cellules de Purkinje. Des branches verticales parcourent la couche moléculaire dans le plan parasagittal. Cette arborisation est semblable à un candélabre (Lainé & Axelrad, 1994).



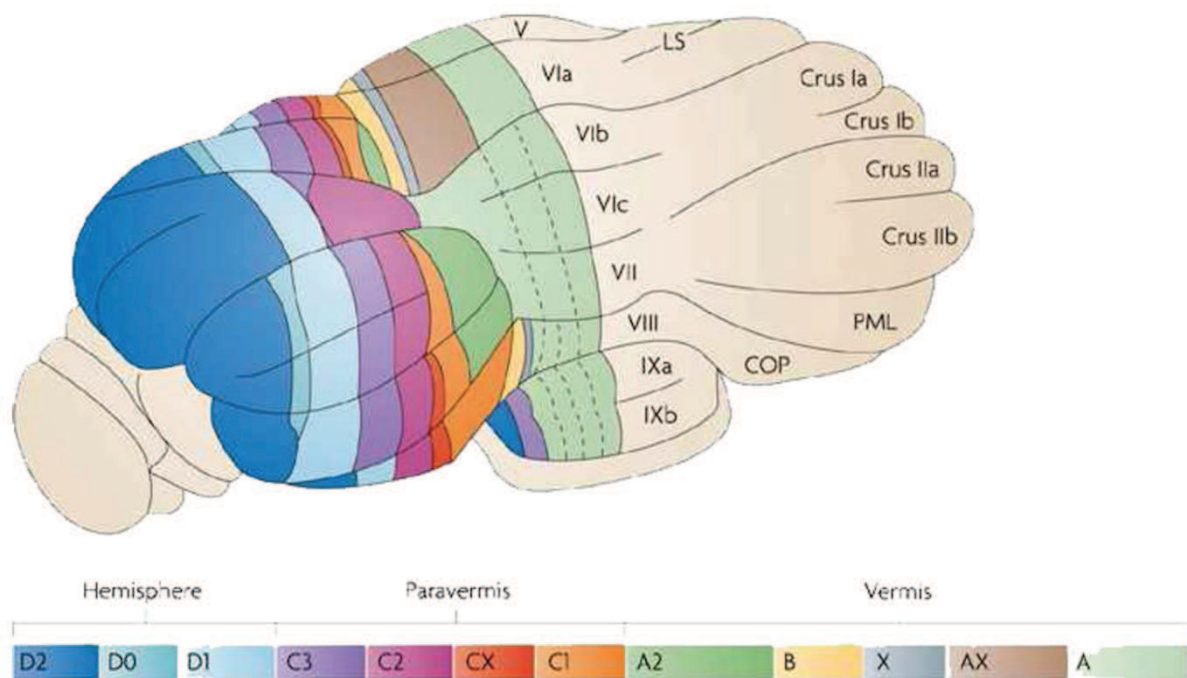
**Figure 1. Cytoarchitecture du cervelet.** **A.** Encéphale de souris en vue latérale. Le cervelet est représenté en brun. **B.** Micro-circuit du cortex cérébelleux. (adaptée de Reeber et al., 2013). **C.** Schéma des principaux types neuronaux du cortex cérébelleux (adapté de Eccles et al., 1967). **D.** Immunohistofluorescence de CaBP, marqueur des cellules de Purkinje. Echelle = 50  $\mu$ m.

## 2. Compartimentation du cortex cérébelleux

### 2.1. Compartimentation des afférences grimpantes : bandes longitudinales et microzones

Dès le début du XIX<sup>e</sup> siècle, l'étude des effets des lésions du cortex cérébelleux a permis de mettre en évidence une corrélation entre des lésions focales effectuées dans l'olive inférieure et la dégénérescence rétrograde des fibres grimpantes se terminant dans le cervelet, suggérant la projection précise de ces fibres dans une région cérébelleuse donnée (Holmes & Steward, 1908). Basés sur des techniques de chromatolyse rétrograde, Brodal & Jansen (1946) proposent une division des projections olivo-corticales en trois zones : les zones médiane et intermédiaire du cervelet reçoivent les projections de l'olive accessoire et la zone latérale du lobe antérieure est innervée par l'olive principale (Brodal & Jansen, 1946). Cependant, l'injection de traceurs radioactifs dans l'olive inférieure montre que les territoires de projection des fibres grimpantes sont organisés en bandes parasagittales dans la couche moléculaire du cervelet (Courville et al., 1974), suggérant une organisation des afférences grimpantes plus complexe que la division en trois zones décrite par Brodal & Jansen. Voogd décrit la connectivité olivo-cérébelleuse en se basant sur la description de l'architecture des fibres grimpantes myélinisées et propose de diviser le cortex cérébelleux en sept zones parasagittales qu'il nomme de A à D, de la zone la plus médiane à la plus latérale. Il montre que ces zones sont conservées chez de nombreuses espèces (Voogd, 1967 ; Voogd & Glickstein, 1998). La zonation des fibres grimpantes proposée par Voogd est ensuite confirmée par des techniques d'enregistrements électrophysiologiques (Oscarsson, 1968, 1969). La zonation en sept bandes est dès lors complétée et 12 zones parasagittales majeures sont aujourd'hui décrites (A, AX, X, B, A2, C1, C2, CX, C3, D1, D0 et D ; Apps & Hawkes, 2009, **Figure 16**).

Une sous-population de neurones de l'olive inférieure contralatérale envoie des fibres grimpantes dans le cortex cérébelleux et les noyaux profonds du cervelet. Aussi, les travaux d'Oscarsson permettent de diviser les cellules de Purkinje appartenant à une même zone en sous-populations d'environ 200  $\mu\text{m}$  de large, en fonction de leur champ récepteur. Les auteurs appellent « microzone » le groupe de fibres grimpantes qui partagent les mêmes champs récepteurs périphériques, notamment dans les colonnes corticales, et qui innervent une bande étroite de cellules de Purkinje projetant en retour vers les noyaux profonds. Les microzones contiendraient environ 1000 cellules de Purkinje distribuées en une bande perpendiculaire à l'axe du folium (Apps & Garwics, 2005). Dans certaines zones (B, C1, C2), les microzones sont arrangées de façon topographique et contrôlent les mouvements fins via le tractus rubrospinal et cortico-spinal. De plus, les neurones de l'olive inférieure qui projettent vers une même microzone sont couplés électriquement via des jonctions communicantes qui synchronisent leur activité. Des expériences d'électrophysiologie montrent une synchronisation des PA complexes dans le crus 1 et 2 qui reflète le couplage électrique des neurones de l'olive (Wolfe et al., 1973 ; Bengtsson & Jörntell, 2009). Aussi, une fibre grimpante émet de trois à cinq collatérales qui chacune va contacter dans le plan parasagittal une CP appartenant à la même microzone ou à des microzones adjacentes (Van der Want et al., 1989). De ce fait, une fibre peut contacter les lobules I à V et VII appartenant à une même microzone mais également les lobules VI, VII et VIII (Sugihara, 2001), indiquant que des neurones voisins de l'olive inférieure peuvent se distribuer à plusieurs microzones. La description des terminaisons des projections grimpantes montrent que celles-ci se terminent dans le cortex cérébelleux en dessinant un champ récepteur en forme de patch conservé entre les espèces (Logan & Robertson, 1986 ; Sugihara, 1999). Cette désignation en « patch » n'est pas sans rappeler l'organisation des fibres moussues en mosaïque de patches dans le cervelet.



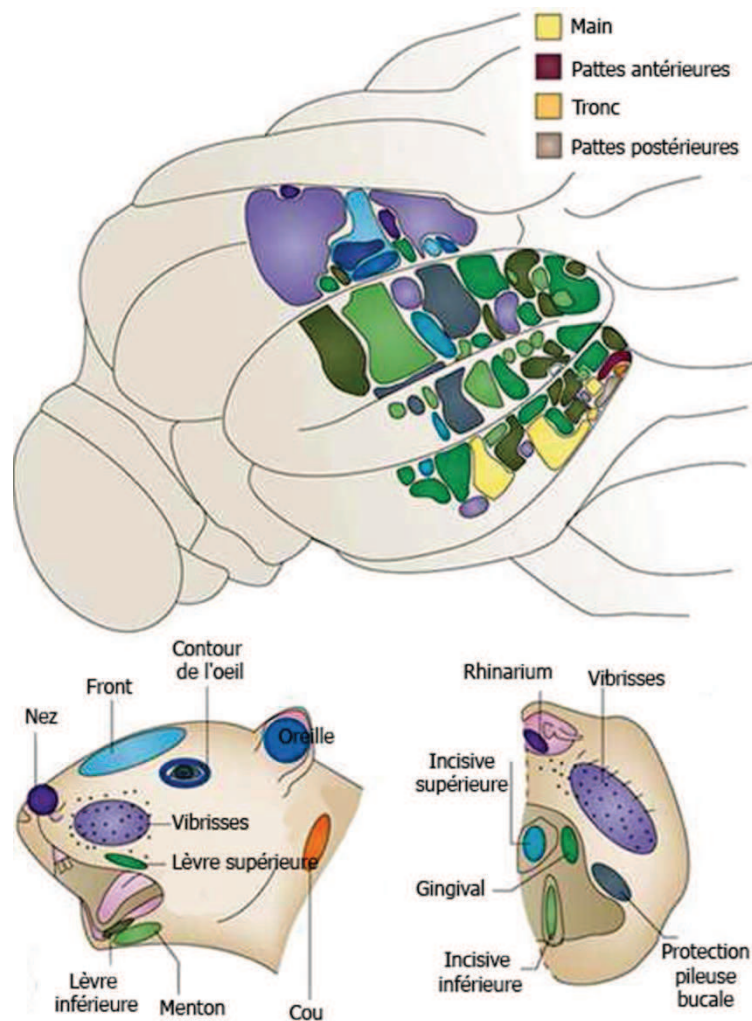
**Figure 16. Compartimentation des afférences grimpantes.** Douze bandes parasagittales constituant les territoires de projection des fibres grimpantes traversent les lobules cérébelleux du vermis, du paravermis et des hémisphères. LS, lobule simple ; PML, lobule paramédian ; COP, copula pyramidis. Adaptée de [Apps & Hawkes, 2009](#).

## 2.2. Compartimentation des afférences mousues

L'enregistrement électrophysiologique des potentiels des cellules granulaires évoqués en réponse à diverses stimulations mécaniques ou tactiles à la surface du corps, ont permis d'identifier les champs récepteurs des fibres mousues en se basant sur la mesure des variations des fréquences et des latences de décharge des cellules granulaires ([Shambes et al., 1978](#) ; [Joseph et al., 1978](#)). Cette technique montre que les champs récepteurs des fibres mousues dessinent à la surface du cortex cérébelleux, des territoires ou « patches » de moins de 1 mm<sup>2</sup> ([Stein & Glickstein, 1992](#)). Deux régions distinctes du corps peuvent ainsi être représentées dans un même patch. Aussi, deux régions éloignées du cortex cérébelleux peuvent représenter une même région du corps, indiquant une redondance de l'information issue d'une région donnée ([Stein & Glickstein, 1992](#)). Cette redondance peut être expliquée par l'émission de plusieurs colatérales par les fibres mousues qui peuvent se distribuer à différents patches ([Woolston et al., 1982](#)). Par exemple, les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sont une source majeure de fibres mousues et possèdent différentes représentations somatotopiques de modalités sensorielles qui sont transmises en patches dans de multiples compartiments du cortex cérébelleux ([Quy et al., 2011](#)). Il en est de même pour l'organisation topographique des projections issues du cortex cérébral. En effet, les champs récepteurs associés à une stimulation du cortex sensoriel sont identiques aux champs récepteurs sensoriels tactiles ([Provini et al., 1968](#) ; [Bower et al., 1981](#)). De manière intéressante, les mécanorécepteurs cutanés induisent un signal transmis dans différentes colonnes du cortex cérébelleux visualisés sous la forme d'une mosaïque de patches, indiquant que la somatotopie des fibres grimpantes est fractionnée (**Figure 17**). Cela signifie que, bien que la projection de fibres provenant de différentes régions du corps est

localisée de manière précise dans des patches dans le cortex cérébelleux, l'organisation des afférences et donc des patches est discontinue (Woolston et al., 1982). En accord avec cette organisation en mosaïque, d'autres auteurs montrent que les projections cunéo-cérébelleuses forment des bandes parasagittales dans le lobe antérieur du cervelet (Ji & Hawkes, 1994 ; Tolbert & Gutting, 1997 ; Alisky & Tolbert, 1997 ; Sultan, 2001)<sup>18</sup>.

En résumé, les champs récepteurs des fibres moussues apparaissent donc comme des patches organisés en mosaïques qui dessinent des bandes parasagittales à plus faible résolution dans le cortex cérébelleux.



**Figure 17. Compartmentation des afférences moussues : une mosaïque de patches.** Vue dorso-latérale du cervelet de rat montrant la distribution spatiale des champs récepteurs enregistrés dans la couche granulaire en réponse à des stimulations mécaniques de différentes parties du corps (couleurs). Adaptée de Apps & Hawkes, 2009.

<sup>18</sup> En fonction des techniques utilisées, l'organisation des afférences moussues est différente et reste sujette à débat. Alors que certains auteurs qui utilisent des techniques d'électrophysiologie sont en faveur d'une organisation fractionnée en mosaïques de patches (Woolston et al., 1982), des expériences d'hodologie utilisant différents traceurs neuronaux montrent soit une organisation parasagittale des projections soit une organisation lobulaire classique (Künzle, 1975 ; Hoddevik & Walberg, 1979 ; Kawamura & Hashikawa, 1981). Certaines études en IRMf remettent en question l'organisation parasagittale et confirment la somatotopie fractionnée (Peeters et al., 1999), alors que d'autres réfutent la somatotopie fractionnée en observant un homunculus et des champs récepteurs organisés en bandes parasagittales (Grodd et al., 2001).

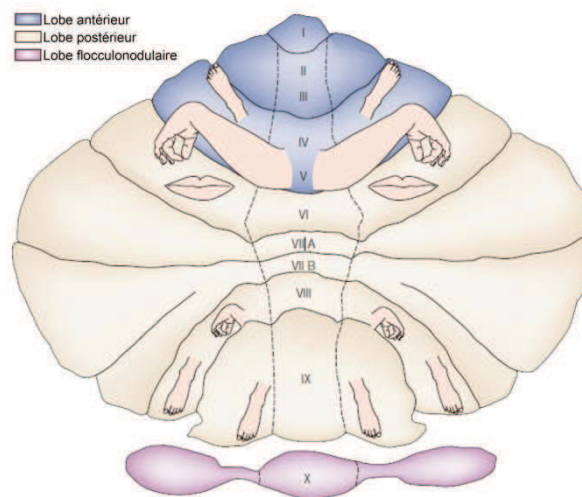
### 2.3. Convergence des afférences grimpantes et moussues

Les afférences grimpantes et moussues sont toutes deux organisées de manière topographique dans le cortex cérébelleux. Tandis que les premières projettent dans la couche moléculaire selon un patron de bandes parasagittales subdivisibles en microzones et se terminent en patches, les autres projettent sur les cellules granulaires en une mosaïque de patches organisés en bandes parasagittales. Une convergence sur les mêmes cellules de Purkinje de ces deux voies associées à une même région du corps peut dès lors être postulée. L'enregistrement électrophysiologique *in vivo* de cellules de Purkinje unitaires et de fibres moussues après la stimulation des vibrisses ou des pattes chez le chat ou le rat montrent un chevauchement des entrées grimpantes et moussues sur une même CP (Provini et al., 1968 ; Thach, 1967, 1970 ; Ferin et al., 1971 ; Eccles, 1973). En effet, dans le crû 2, les champs récepteurs des fibres grimpantes des cellules de Purkinje et des cellules granulaires sous-jacentes associées aux fibres moussues sont similaires (Bower & Woolson, 1983 ; Brown & Bowler, 2001). De plus, la cartographie du lobe antérieur du cervelet recevant les afférences cutanées de la patte avant du chat a mis en évidence qu'une CP pouvait intégrer différentes modalités sensorielles (nociceptives, cutanées ou proprioceptives) (Ekerot et al., 1991 ; Jörntell et al., 1996). Les informations provenant d'un même champ récepteur cutané sont acheminées via les fibres grimpantes et moussues qui se recouvrent dans une microzone donnée du cervelet (Garwicz et al., 1998). Les fibres grimpantes et moussues contactant un même groupe de cellules de Purkinje partagent le même champ récepteur. Cependant, alors que le champ récepteur des fibres moussues et grimpantes est similaire pour toutes les cellules de Purkinje enregistrées dans une zone donnée du cervelet, le champ récepteur diffère pour les fibres parallèles. En effet, un champ récepteur cutané contacte via les fibres parallèles un groupe de cellules de Purkinje distantes de la zone contactée par les afférences moussues, suggérant que les cellules granulaires peuvent relayer les informations provenant des afférences moussues jusqu'à des patches de cellules de Purkinje éloignés qui partagent le même champ récepteur que les fibres grimpantes (Ekerot & Jörntell, 2001). Les fibres parallèles pourraient donc participer à la communication inter-modulaire sous-tendant la coordination motrice.

### 2.4. La somatotopie des efférences

L'étude des efférences du cervelet constituées par les axones des cellules de Purkinje montre que celles-ci sont organisées de manière somatotopique. La stimulation du lobe antérieur du cortex cérébelleux du chat induit des mouvements localisés (Dow & Moruzzi, 1958). De même, la stimulation du lobule simple provoque des mouvements de la face et de la mâchoire, celle du culmen provoque le mouvement des pattes antérieures et postérieures et la lingula provoque les mouvements de la queue. Les muscles du tronc sont représentés médialement tandis que les muscles des membres sont représentés latéralement (**Figure 18**). Comme pour les afférences, les efférences cérébelleuses sont doubles et représentées symétriquement dans le cortex.

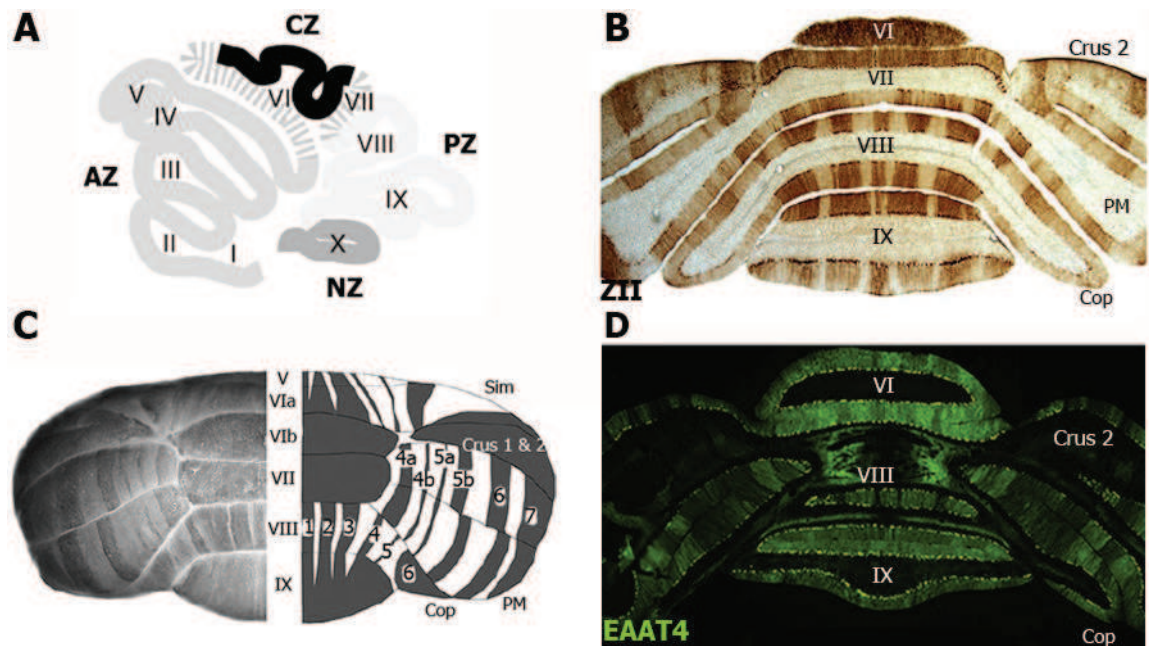
L'utilisation de techniques d'hodologie et d'électrophysiologie montre que les efférences principales, comme les afférences, s'organisent selon une topographie en bandes parasagittales vers les noyaux profonds et la partie latérale du noyau vestibulaire. Les cellules de Purkinje qui se terminent dans les noyaux interposés et dentés sont situés respectivement dans le paravermis et les hémishères. En retour, ces zones fonctionnelles diffèrent dans le type d'afférences et sont supposées être impliquées dans différents aspects de l'activité motrice. Par exemple, le vermis contrôle de la position et la locomotion (Thach & Bastain, 2004) tandis que le paravermis et les hémisphères contrôlent les mouvements guidés visuellement et les mouvements synchronisés (Cooper et al., 2000).



**Figure 18. Somatotopie du cervelet.** Carte sensorimotrice représentant les bras, les pieds et les lèvres sur le cervelet humain proposée par Grodd et al., 2001.

## 2.5. Les zébrines, marqueurs moléculaires de la compartimentation du cervelet

L'expression de nombreux marqueurs appelés « zébrines » révèle l'existence de sous-populations de cellules de Purkinje formant des zones transversales et des bandes parasagittales rostro-caudales dans le cortex cérébelleux. Il existe quatre zones transversales chez la souris : antérieure (AZ) comprenant les lobules I-V, centrale (CZ) comprenant les lobules VI et VII, postérieure (PZ) constituée du lobule VIII et IX et nodulaire comprenant le lobule X (Armstrong & Hawkes, 2000a ; Ozol et al., 1999). Chaque zone transverse est ensuite divisée en bandes parasagittales (Hawkes, 2014 pour revue). Le marqueur le plus étudié est la zébrine-II (ZII) qui est l'enzyme aldolase-C impliquée dans la glycolyse (Ahn et al., 1994). Cette protéine est exprimée par les cellules de Purkinje de certaines bandes parasagittales définissant un patron d'expression reproductible entre individus (Hawkes & Leclerc, 1987) et entre espèces, bien que des variations de taille des bandes soient observées entre espèces (Sillitoe et al., 2005 ; Marzban & Hawkes, 2011). Le patron d'expression de ZII présente une bande médiane et six bandes symétriques de part et d'autre de la ligne médiane. Les bandes positives (ZII+) sont nommées P+ et numérotées de 1 à 7 du centre (P1+) vers les hémisphères (la bande la plus latérale est P7+) et les bandes négatives (ZII-) sont nommées P- et numérotées de la même manière. L'expression de marqueurs tels que NOS (nitric oxide synthase) ou la nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (NADPH) dans les cellules granulaires révèle une topographie de bandes et de patches alignés avec les bandes de cellules de Purkinje (Hawkes & Turner, 1994 ; Schilling et al., 1994 ; Ozol & Hawkes, 1997 ; Hawkes et al., 1998) (**Figure 19**).



**Figure 19. Compartimentation biochimique du cervelet.** **A.** Schéma des zones transversales vermales du cervelet. AZ, zone antérieure ; CZ, zone centrale ; PZ, zone postérieure ; NZ, zone nodulaire. **B.** Coupe transversale de cervelet marquée par immunoperoxydase de ZII (adaptée de [Marzban et al., 2004](#)). **C.** Coté gauche : vue dorsale d'un hémicervelet marqué par l'immunohistochemie de ZII/aldolase-C par la technique du *whole-mount*. Coté droit : schéma de la vue dorsale d'un hémicervelet. Les lobules sont numérotés de V à IX dans le vermis. Sim, lobule simple ; PM, paramédian ; Cop, copula pyramidis. 1-7, bandes ZII P1+ à P7+ (adaptée de [Furutama et al., 2010](#)). **D.** Coupe transversale de cervelet de souris transgénique EAAT4-eGFP où EAAT4 est visualisée par la fluorescence d'eGFP.

Nous avons vu que la projection topographique des fibres grimpantes et moussues est organisée en bandes parasagittales dans le cortex. La question se pose alors de savoir si ces bandes de projection correspondent aux bandes de cellules de Purkinje exprimant les zébrines. Des études combinées de traçage antérograde et d'immunohistochemie ont défini des cartes topographiques montrant la correspondance des bandes de projection des fibres grimpantes ([Gravel et al., 1987](#) ; [Voogd et al., 2003](#) ; [Sugihara & Shinoda, 2004](#) ; [Sugihara & Quy, 2007](#)) et des fibres moussues ([Gravel & Hawkes, 1990](#) ; [Armstrong et al., 2009](#)) avec les bandes ZII(+) ou ZII(-). Les fibres grimpantes qui se terminent sur les cellules de Purkinje ZII+ libèrent plus de glutamate par PA que celles se terminant sur les cellules de Purkinje ZII(-) ([Paukert et al., 2010](#)). De ce fait, les fibres grimpantes génèrent un potentiel post-synaptique excitateur prolongé dans les bandes ZII(+) par rapport aux bandes ZII(-), ce qui se traduit par une dépolarisation prolongée des cellules de Purkinje induite par les fibres grimpantes. Cette prolongation augmente l'influx calcique et facilite les changements d'activité des synapses de fibres grimpantes et de fibres parallèles sur les cellules de Purkinje ([Hansel et al., 2001](#) ; [Safo et al., 2006](#) ; [Mathy et al., 2009](#)). Aussi, des différences régionales d'expression des transporteurs du glutamate (EAATs et mGluRs) par les cellules de Purkinje ont été mises en évidence.

## **Chapitre III**

### **Principaux points évoqués**

- Le cervelet est constitué par la répétition quasi-cristalline d'un même circuit composé d'un petit nombre de types neuronaux dont les propriétés biochimiques et électrophysiologiques sont bien connues et font du cervelet un bon modèle expérimental.
- Le cervelet intègre les informations sensori-motrices périphériques et communique avec les aires sensorielles et motrices pour contrôler les mouvements. De plus, ses connections avec d'autres régions cérébrales l'impliquent dans des fonctions cognitives et émotionnelles.
- Des sous-populations de cellules de Purkinje définies par l'expression de marqueurs biochimiques, leurs afférences grimpantes et moussues et des cibles extracorticales spécifiques constituent des compartiments anatomo-fonctionnels formant un patron de bandes parasagittales dans le cortex cérébelleux.



# OBJECTIFS DE LA THESE

---

**1.** Les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> meurent par apoptose dépendante de BAX et par une voie indépendante de BAX encore inconnue. Le dysfonctionnement du flux autophagique qui survient dans ces neurones pourrait contribuer à la mort des cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>.

**La dérégulation du flux autophagique induite par Dpl dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> conduit-elle à l'apoptose dépendante de BAX ou constitue-t-elle une voie de mort distincte ?**

→ Etude I (non-publiée)

**2.** L'analyse des voies de mort neuronale activées dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> demande une étude mécanistique dans un système *ex vivo* et permettant la modulation expérimentale de l'apoptose et de l'autophagie plus aisée que chez l'animal.

**Les cultures organotypiques de cervelet constituent-elles un système adéquat pour l'étude des rôles respectifs et relatifs de l'apoptose et de l'autophagie dans la mort neuronale induite par la condition Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et par les prions infectieux ?**

→ Etude I : publication 1

**3.** Les paramètres endogènes locaux qui participent à la spécificité cellulaire des effets neurodégénératifs des prions sont encore mal connus. La sensibilité différentielle à la condition Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> des sous-populations de cellules de Purkinje définies par la compartimentation anatomofonctionnelle du cervelet suggère que certains caractères biochimiques et/ou anatomiques de cette compartimentation pourraient influencer la neuroinvasion et la neurotoxicité des prions dans le cervelet.

**L'organisation anatomique du cervelet est-elle un paramètre local de la neuroinvasion et de la neurotoxicité des prions ? Les différentes sous-populations de cellules de Purkinje ont-elles une sensibilité spécifique aux prions ?**

→ Etude II (non-publiée)

**4.** L'infection de cultures neuronales par les prions provoque une augmentation du taux de récepteurs TNFR1 à la membrane plasmique, capable de sensibiliser les neurones aux effets de la cytokine proinflammatoire TNF- $\alpha$ .

**La neuroinvasion par des prions aux effets particulièrement sévères dans le cervelet modifie-t-elle l'expression de TNFR1 *in vivo* ? Quels types cellulaires surexpriment TNFR1 dans le cervelet infecté ?**

→ Etude III (non-publiée)

# **CONTRIBUTIONS EXPERIMENTALES**

# ETUDE I

## Apoptose et autophagie dans le cervelet des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> déficientes en protéine prion

---

### Contexte scientifique

Les fonctions neuroprotectrices de PrP<sup>C</sup> restant encore mal comprises, la souris mutante NgsK *Prnp*<sup>0/0</sup> présente un intérêt particulier car la neurotoxicité de Dpl vis-à-vis des cellules de Purkinje du cervelet qui caractérise ce modèle n'est effective qu'en l'absence de PrP<sup>C</sup> (Shmerling et al., 1998 ; Atarashi et al., 2003 ; Anderson et al., 2004 ; Watts & Westaway, 2007), bien que la neurotoxicité de Dpl lui soit intrinsèque (Lemaire-Vieille et al., 2013). Il nous paraît donc important de connaître les mécanismes sous-jacents à la mort des cellules de Purkinje NgsK pour comprendre les mécanismes neuroprotecteurs contrôlés par PrP<sup>C</sup> et avec lesquels Dpl interfère.

Les travaux précédents de S. Heitz au laboratoire montrent que si un processus apoptotique intrinsèque impliquant le facteur BAX (Heitz et al., 2006) et pouvant classiquement être contrôlé par la surexpression de BCL-2 (Heitz et al., 2007) est impliqué dans la mort des cellules de Purkinje NgsK *Prnp*<sup>0/0</sup>, un certain nombre de cellules de Purkinje NgsK *Prnp*<sup>0/0</sup> meurent en dépit de l'absence de BAX ou de l'augmentation de BCL-2 chez les double mutants NgsK *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> et NgsK *Prnp*<sup>0/0</sup>-*Hu-Bcl-2* respectivement. Ceci indique qu'un processus, indépendant de BAX, pourrait concourir à la mort des cellules de Purkinje NgsK. Un tel processus pourrait résulter du dérèglement du flux autophagique qui semble bloqué au stade de l'autolysosome dans les cellules de Purkinje NgsK (Heitz et al., 2008) à l'instar d'autres pathologies neuronales (Cataldo et al., 1996 ; Nixon et al., 2005a). La question qui se pose alors est de savoir si le dérèglement de l'autophagie observé est une étape préliminaire d'un processus conduisant à l'apoptose dépendante de BAX ou bien constitue un processus distinct qui aboutira à la mort des cellules de Purkinje NgsK par une autre voie.

### Objectif de l'étude

Afin de caractériser les voies de mort neuronale activées dans les cellules de Purkinje déficientes en PrP<sup>C</sup> et d'y distinguer les participations respectives de l'absence de PrP<sup>C</sup> et de son paralogue Dpl, j'ai mis en œuvre deux approches, l'une *in situ* en microscopie électronique par transmission visant à déterminer le niveau d'activation de l'autophagie de ces neurones dans le cervelet des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> et l'autre dans un système *ex vivo* de cultures organotypiques de tranches de cervelet que j'ai installé au laboratoire. J'ai estimé la validité de ce système pour une étude mécanistique de l'apoptose et de l'autophagie dans les neurones cérébelleux *Prnp*<sup>0/0</sup>.

## 1. Autophagie dans les cellules de Purkinje des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* : Approche ultrastructurale qualitative et quantitative *in situ*

L'analyse ultrastructurale des cellules de Purkinje des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* menée auparavant par S. Heitz au laboratoire montre l'accumulation d'autolysosomes dans les corps cellulaires, les axones et les terminaisons présynaptiques des cellules de Purkinje de ce mutant. L'augmentation des taux de marqueurs de dégradation autophagique tels que LC3, p62 et SCRG1 sans modification de leur expression génique suggère un blocage du flux autophagique dans ces neurones (Heitz et al., 2008, 2009). Dans cette étude, j'ai cherché à savoir si l'autophagie est activée dans les cellules de Purkinje du double mutant *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* et dans quelle proportion de cette population neuronale. Dans le cervelet du double mutant, la présence de cellules de Purkinje « autophagiques » c'est-à-dire remplies d'autolysosomes en raison d'un blocage du flux autophagique à l'instar des cellules de Purkinje *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*, serait en faveur de l'existence d'une voie neurotoxique indépendante de BAX. Le maintien chez les souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* de la proportion de neurones « autophagiques » estimée chez les souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* pourrait signifier que l'autophagie est activée dans les cellules de Purkinje qui survivent du fait de la délétion de *Bax*. Une diminution de cette proportion chez les doubles mutants pourrait refléter une disparité de la réponse des cellules de Purkinje à la condition *Ngsk*, l'autophagie n'étant pas activée dans les neurones sauvés par la délétion de *Bax*. Enfin, une augmentation de cette proportion traduisant l'activation de l'autophagie dans un plus grand nombre de neurones *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* que *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* pourrait résulter d'un effet secondaire de l'absence de BAX. Par ailleurs, j'ai analysé l'activation de l'autophagie dans les cellules de Purkinje de la souris ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* qui ne surexprime pas *Dpl* afin de savoir qui de l'expression ectopique de *Dpl* ou de l'absence de *PrP<sup>C</sup>* est à l'origine de l'activation autophagique dans les cellules de Purkinje *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*.

J'ai visualisé et quantifié les cellules de Purkinje « autophagiques » en microscopie électronique par transmission qui est une technique standard à cet effet puisqu'elle permet de visualiser les autophagosomes à double membrane dans les cellules. Mon analyse a porté sur les cellules de Purkinje de souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*, *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* prélevées au cours du processus dégénératif provoqué par la condition *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* aux âges de 4-5 mois, 6-8 mois et 9-12 mois.

### 1.1. Les cellules de Purkinje des mutants *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* sont le siège d'une autophagie anormale

L'examen des cellules de Purkinje au microscope électronique par transmission permet de révéler les organites caractéristiques des stades successifs de l'autophagie qui sont présents dans les cellules de Purkinje, tels que les phagophores (**Figure 20A**) et les autophagosomes à double membrane à différents stades de maturation. On distingue des vésicules à double membrane séquestrant des organites reconnaissables (**Figure 20B**), des vésicules à double membrane au contenu hétérogène voisines de lysosomes prêts à fusionner (**Figure 20C**) et des autolysosomes à membrane simple et au contenu hétérogène opaque aux électrons (**Figure 20D**).

Les organites autophagiques sont rares dans les cellules de Purkinje des souris sauvages (**Figure 20E**), ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>+/+</sup> : Bax<sup>+/+</sup>* âgées de 12 mois (**non-montrés**). Inversement, une fréquence anormale de profils autophagiques est observée dans le cytosol somatique de cellules de Purkinje *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>*. Chez ces mutants, le neuroplasma des cellules de Purkinje peut contenir un nombre important

d'organites autophagiques le plus souvent des autolysosomes jusqu'à saturation. Des enroulements membranaires serrés occupent souvent l'intérieur des autolysosomes.

### 1.2. Le cervelet des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* contient plus de cellules de Purkinje « autophagiques » que le cervelet des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>*

Les cellules de Purkinje « non autophagiques » contenant moins de 3 organites autophagiques (type 1, **Figure 20E**) sont les plus fréquentes dans l'échantillon de la population neuronale étudiée dans les 3 génotypes mutants et non mutants. Les rares organites autophagiques observés témoignent probablement d'autophagie physiologique. Les cellules de Purkinje « autophagiques » contenant plus de 3 organites autophagiques et considérées comme affectées d'une autophagie pathologique ne sont observées que dans le cortex cérébelleux des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>*. Elles sont soit de type 2 (autophagie modérée) avec un nombre important d'organites autophagiques (plus de 3) dans un neuroplasma d'aspect normal (**Figure 20F**) ou de type 3 (autophagie forte) quasiment remplies d'autolysosomes.

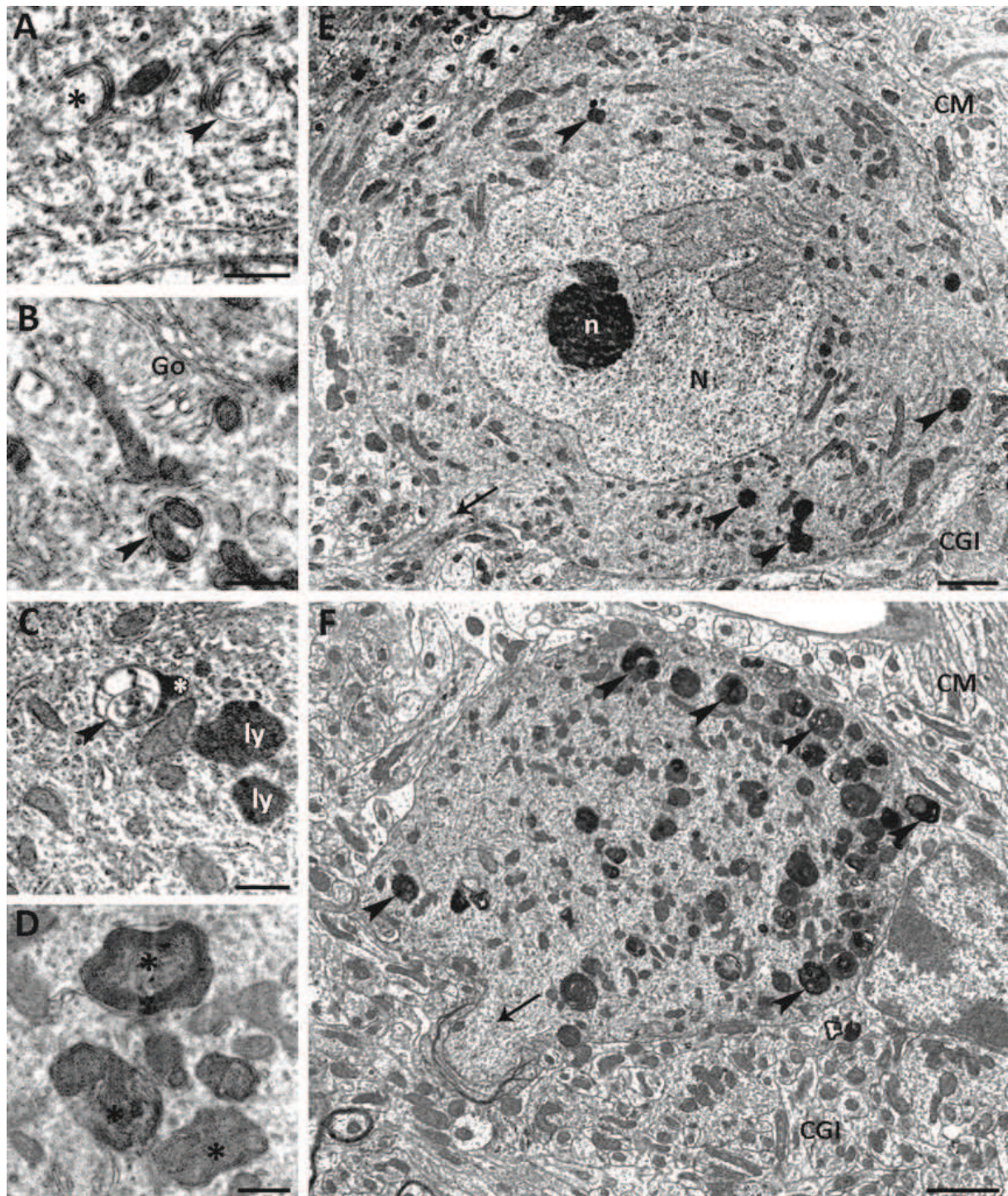
Les proportions des cellules de Purkinje autophagiques et non autophagiques dans le cortex cérébelleux des souris ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>*, *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*, *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>+/+</sup>* sont présentées dans les **Tableaux 1** et **2**.

Âge (mois)	Génotype			
	<i>Ngsk Prnp<sup>0/0</sup></i>	<i>Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup></i>	ZH-I <i>Prnp<sup>0/0</sup></i>	<i>Ngsk Prnp<sup>+/+</sup> : Bax<sup>+/+</sup></i>
4,5	7,5 % ± 0,7 n = 2	5,9 % ± 2,1 n = 3	-	-
6,5	15,0 % ± 7,9 n = 3	1,8 % ± 1,0 n = 3	-	-
12	14,8 % ± 6,0 n = 2	5,0 % ± 1,7 n = 3	0,5 % n = 1	0 % n = 3

**Tableau 1. Pourcentage de cellules de Purkinje autophagiques dans le cervelet des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*, *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>*, ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>+/+</sup> : Bax<sup>+/+</sup>*.**

Autophagie	Génotype	
	<i>Ngsk Prnp<sup>0/0</sup></i> n = 7	<i>Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup></i> n = 10
Modérée	3,3 % ± 1,4	0,2 % ± 0,2
Forte	8,7 % ± 6,1	4,3 % ± 2,8

**Tableau 2. Pourcentage de cellules de Purkinje au profil autophagique modéré ou fort dans le cervelet des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>*.**

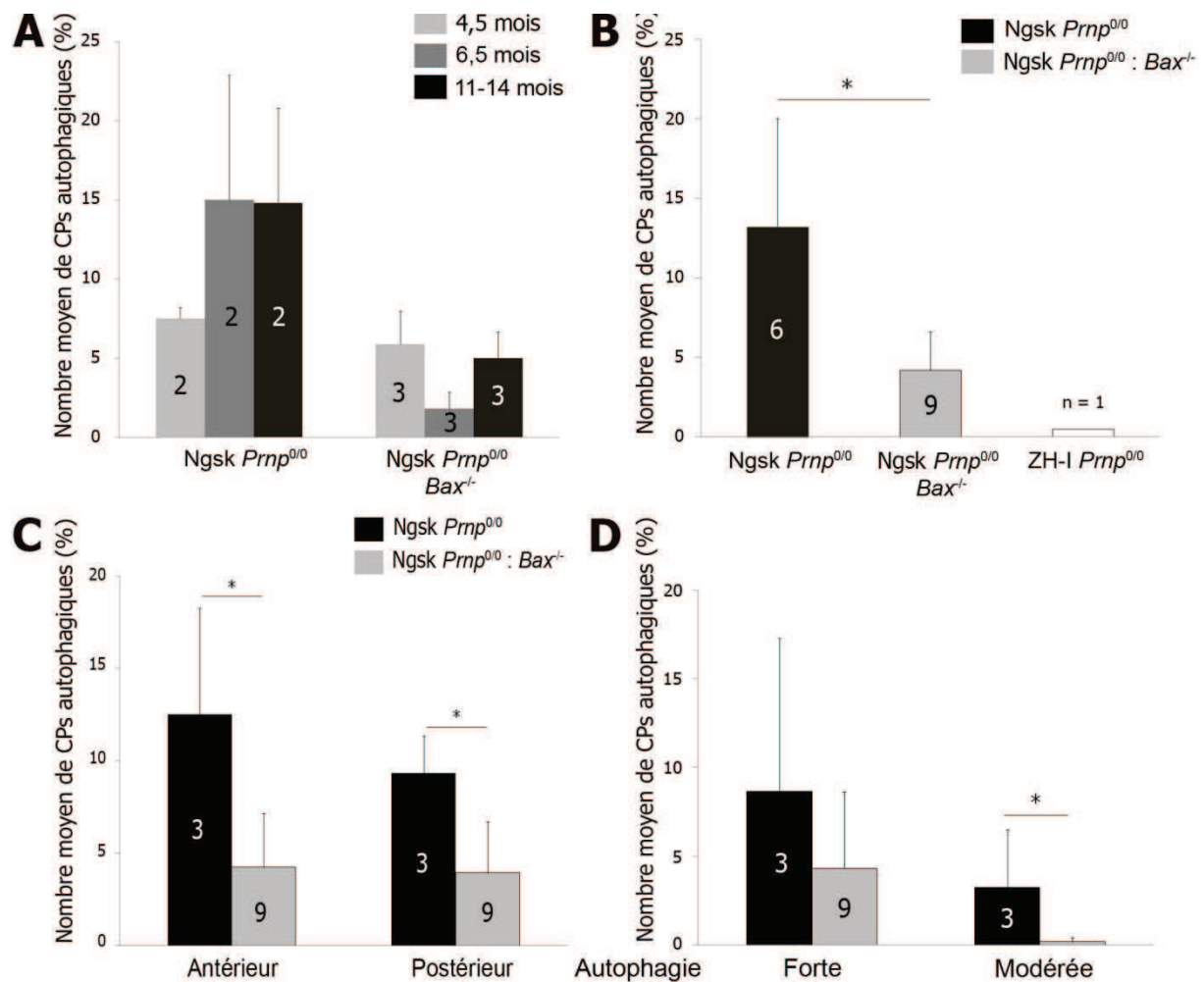


**Figure 20. Autophagie dans les cellules de Purkinje *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>*.** **A-D.** Etapes ultrastructurales de l'autophagie : du phagophore à l'autolysosome. **A.** Phagophore (\*), autophagosome à double membrane (tête de flèche). **B.** Autophagosome séquestrant deux mitochondries (tête de flèche). **C.** Fusion d'un autophagosome (tête de flèche) avec un lysosome (\*). Ly, lysosomes. **D.** Autolysosomes (\*). **A-D.** Echelle = 500 nm. **E.** Cellule de Purkinje sauvage. Quelques lysosomes et corps de lipofuscine (têtes de flèche) sont visibles dans le cytoplasme somatique du neurone. N, noyau ; n, nucléole. **F.** Cellule de Purkinje « autophagique ». De nombreux autophagosomes, lysosomes et autolysosomes (têtes de flèche) s'accumulent dans le neuroplasma. **E-F.** CM, couche moléculaire ; CGI, couche granulaire interne ; flèche, départ de l'axone. Echelle = 2  $\mu$ m.

L'analyse quantitative du pourcentage de cellules de Purkinje autophagiques montre que les cellules de Purkinje autophagiques des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> sont plus importantes que celles des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> à tous les âges étudiés : 4,5 mois (7,5 % ± 0,7 contre 5,9 % ± 2,1), 6,5 mois (15,0 % ± 7,9 contre 1,8 % ± 1,0) et 12 mois (14,8 % ± 6,0 contre 5,0 % ± 1,7, **Figure 21A**). Cependant, les différences entre les pourcentages de cellules de Purkinje autophagiques à chaque âge étudié chez les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> ne sont pas statistiquement significatives ( $p > 0,05$ , **Figure 21A**), bien qu'une hausse importante, de ce pourcentage survienne chez les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> à 6,5 mois (antérieur : 2,0 % ± 1,3 ; médian 1,6 % ± 0,9 ; postérieur 1,8 % ± 1,3 ;  $p > 0,05$ ) et 12 mois (antérieur 6,7 % ± 2,1 ; médian 4,8 % ± 1,5 ; postérieur 3,6 % ± 2,6 ;  $p > 0,05$ ). Une baisse de ce pourcentage survient chez les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> âgées de 6,5 mois (**Figure 21A**). L'analyse statistique montre que cette différence est significative entre les deux génotypes tous âges confondus ( $p = 0,003$ , **Figure 21B**).

Le pourcentage de cellules de Purkinje autophagiques du niveau antérieur du cervelet des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (12,5 % ± 5,8) et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> (4,3 % ± 2,9) et postérieur du cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (9,3 % ± 2,0) et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> (4,0 % ± 2,8) tous âges confondus sont significativement différentes (antérieur :  $p = 0,007$  et postérieur :  $p = 0,012$ , **Figure 21C**). Cette différence existe également entre les cellules de Purkinje modérément autophagiques (type 2 : 3,2 % ± 1,4 Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> contre 0,20 % ± 0,2 Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> ;  $p < 0,05$ ) mais n'est pas significative ( $p = 0,22$ ) entre les cellules de Purkinje fortement autophagiques (Type 3 : 7,9 % ± 4,8 Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> contre 4,0 % ± 2,4 Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup>) tous âges confondus (**Figure 21D**).

En résumé, en comparaison des mutants Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, le pourcentage des cellules de Purkinje « autophagiques » a diminué dans le cervelet des double mutants Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> dès l'âge de 4,5 mois alors que les mutants ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> ne présentent pas d'autophagie anormale. Ceci suggère que l'autophagie n'est pas activée dans les cellules de Purkinje sauvées par l'absence de BAX. Certaines cellules de Purkinje Ngsk pourraient répondre à Dpl par l'apoptose dépendante de BAX et d'autres par un dysfonctionnement de l'autophagie.



**Figure 21. Analyse quantitative de l'autophagie dans les cellules de Purkinje (CPs).** **A.** Pourcentage de CPs autophagiques dans le cervelet de souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> Bax<sup>-/-</sup>* à 4,5, 6,5 et 11-14 mois. Le nombre d'animaux est indiqué dans les barres. **B.** Pourcentage de CPs autophagiques dans le cervelet de souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*, *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> Bax<sup>-/-</sup>* et *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* âgées de 4,5 à 12 mois. \* p < 0,05. **C.** Pourcentage de CPs autophagiques dans les niveaux antérieur et postérieur du cervelet de souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> Bax<sup>-/-</sup>* âgées de 4,5 à 12 mois. **D.** Pourcentage de CPs à autophagie modérée (type 2) et forte (type 3) dans le cervelet de souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> Bax<sup>-/-</sup>*.



## 2. Mort neuronale dans le cervelet des souris déficientes en protéine prion Ngsk $Prnp^{0/0}$ , NSE-Dpl $Prnp^{0/0}$ et ZH-I $Prnp^{0/0}$ : approche morphologique et biochimique en culture organotypique

L'étude mécanistique de la mort neuronale induite par la condition Ngsk requiert l'utilisation d'un système *in vitro* permettant des approches pharmacologiques et moléculaires plus aisées qu'*in vivo*. Les cultures organotypiques de cervelet, initialement développées chez le rat par la méthode des « roller-tubes » (Gähwiler et al., 2001) a été adaptée à l'étude du cervelet de souris par une méthode plus simple qui consiste à maintenir les tranches de tissu sur une membrane semi-perméable (Stoppini et al., 1991 ; Lonchamp et al., 2006). Dans les cultures de cervelet de souris, la présence de cellules gliales et d'autres neurones crée un microenvironnement favorable à la différenciation et au développement morphologique et physiologique des cellules de Purkinje, proche des conditions *in vivo* (Stoppini et al., 1991). J'ai mis en œuvre ce système au laboratoire pour caractériser les effets de déficiences du gène *Prnp* sur la survie des cellules de Purkinje. Le cervelet est prélevé à 8 jours après la naissance (P8) afin d'éviter la période de mort neuronale développementale qui survient naturellement dans le cervelet à P3 (Dusart et al., 2006).

Dans un premier temps, j'ai étudié le développement et la survie des cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques de cervelet par une approche morphométrique et quantitative au cours d'une période de culture de 3 semaines. J'ai comparé les cultures de cervelet de souris sauvages et déficientes en PrP<sup>C</sup> en l'absence (ZH-I  $Prnp^{0/0}$ ) ou en présence de Dpl (souris hétérozygotes Ngsk  $Prnp^{+/0}$ , homozygotes Ngsk  $Prnp^{0/0}$  et NSE-Dpl  $Prnp^{0/0}$ ). En parallèle, j'ai analysé par Western blot l'expression de marqueurs neuronaux et gliaux pour évaluer la composition cellulaire des cultures et l'expression de marqueurs autophagiques et apoptotiques afin de déterminer l'état d'activation de ces deux processus dans les conditions *ex vivo* du système organotypique en complément d'une analyse ultrastructurale. Enfin, j'ai tenté des expériences préliminaires pour étudier les effets neurodégénératifs des prions infectieux des souches de tremblante 22L et 139A, dans ce système.

Cette étude a été partiellement publiée en 2013.

**Publication 1.** A. Ragagnin, A. Guillemain, N. J. Grant, Y.J.R. Bailly (2013) Neuronal autophagy and prion proteins. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* YJR Bailly (Ed.), pp. 377-419. ISBN: 978-953-51-1062-0, InTech Publisher.

### 2.1. Déficit développemental des cellules de Purkinje Ngsk $Prnp^{0/0}$ , NSE-Dpl $Prnp^{0/0}$ et ZH-I $Prnp^{0/0}$ en culture organotypique

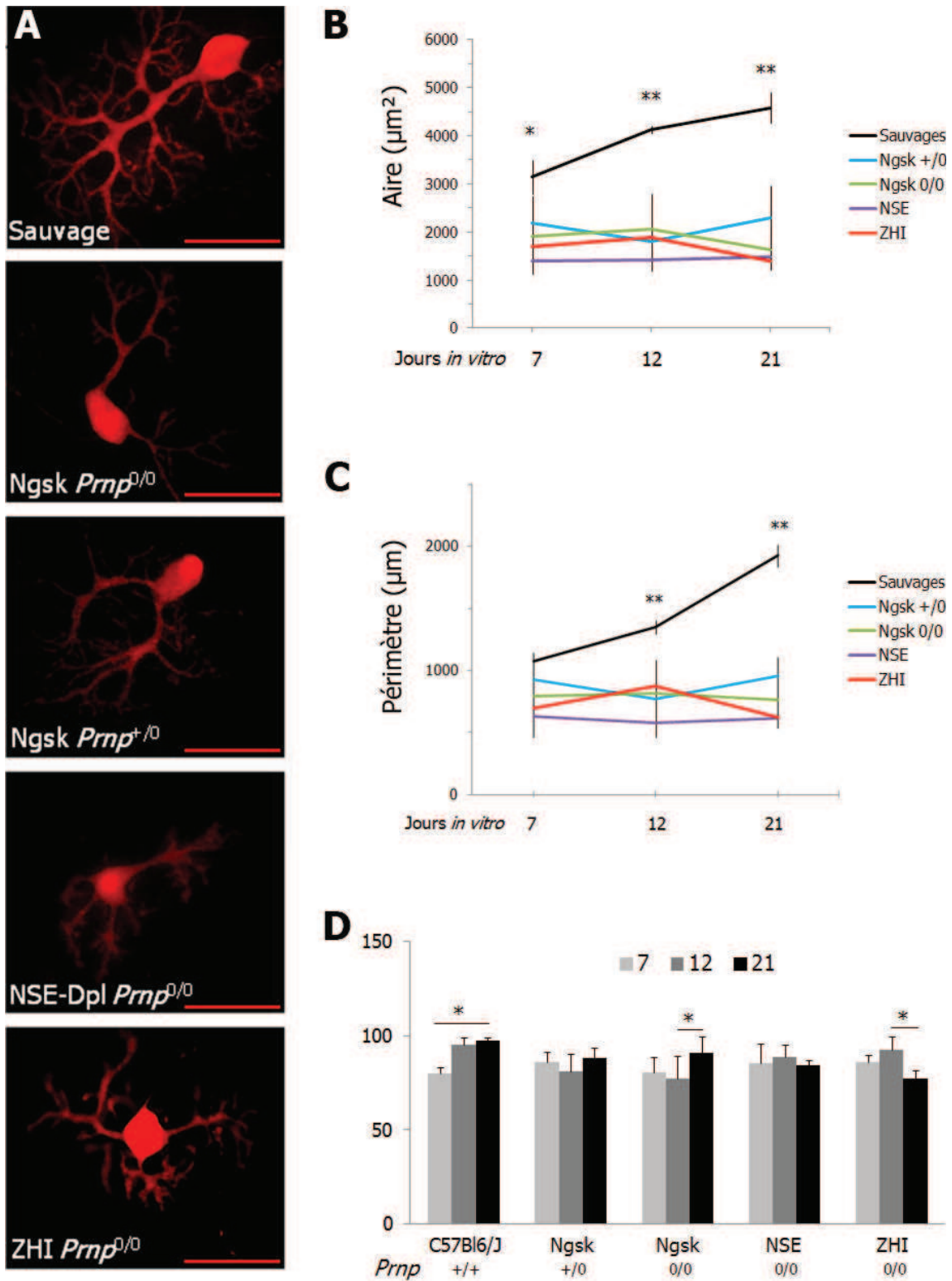
Dans les cultures organotypiques, certaines cellules de Purkinje immunoréactives pour CaBP, marqueur spécifique de ces neurones, se développent isolément et poussent des prolongements dendritiques dans toutes les directions. Une atrophie des cellules de Purkinje est observée dans les cultures mutantes  $Prnp^{0/0}$  (**Figure 22A**). Pour évaluer le développement des cellules de Purkinje des différents génotypes, l'aire et le périmètre cellulaires ainsi que l'extension dendritique maximale ont été mesurés sur au moins 20 cellules de Purkinje isolées par culture issue d'un même animal (**Tableau 3**).

L'interaction des facteurs « temps de culture » et « génotype » a un effet significatif sur ces trois dimensions (aire  $p = 0,006$  ; périmètre  $p < 0,001$  ; extension dendritique  $p = 0,008$ ). Dans le cervelet sauvage, l'aire (**Figure 22B**), le périmètre (**Figure 22C**) et l'extension dendritique (**Figure 22D**) augmentent significativement entre 7 jours (aire :  $3151,9 \mu\text{m}^2 \pm 352,7$  ; périmètre :  $1070,2 \mu\text{m} \pm 74,1$  ; extension dendritique :  $80,0 \mu\text{m} \pm 3,1$ ) et 21 jours de culture (aire :  $4579,2 \mu\text{m}^2 \pm 321,3$  ; périmètre :  $1926,0 \mu\text{m} \pm 89,0$  ; extension dendritique :  $97,4 \mu\text{m} \pm 1,8$  ; test de Tukey : aire et périmètre :  $p < 0,001$  ; extension dendritique :  $p = 0,024$ ), tandis qu'aucune variation significative de l'aire ni du périmètre n'est mesurée durant cette période chez les mutants *Prnp<sup>0/0</sup>* (**Tableau 3** ; *Ngsk Prnp<sup>+/-0</sup>* : aire :  $p = 0,950$  et périmètre :  $p = 0,976$  ; *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* : aire :  $p = 0,444$  et périmètre :  $p = 0,945$  ; *NSE-Dpl Prnp<sup>0/0</sup>* : aire :  $p = 0,972$  et périmètre  $p = 0,994$  ; *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* : aire :  $p = 0,513$  et périmètre :  $p = 0,771$ ). Le développement dendritique des cellules de Purkinje est similaire après 7 jours de culture entre les génotypes sauvages et mutants ( $p > 0,05$ , **Figure 22A, D**). Cependant, bien qu'une augmentation significative de l'extension dendritique maximale soit constatée entre 7 et 21 jours dans les cultures sauvages ( $p = 0,024$ ), cette dimension ne varie pas significativement pendant cette période chez les mutants ( $p > 0,05$ ). Les trois dimensions mesurées ne diffèrent pas significativement entre les cellules de Purkinje hétérozygotes *Ngsk Prnp<sup>+/-0</sup>* et homozygotes *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* au cours de la période de culture (J7 :  $p = 0,855$  ; J12 :  $p = 0,944$  ; J21 :  $p = 0,992$ ).

Ces résultats montrent un déficit similaire du développement des cellules de Purkinje *Prnp<sup>0/0</sup>*, indépendamment de l'expression de Dpl dans les cultures organotypiques.

Génotype	Jours <i>In vitro</i>	n	Aire ( $\mu\text{m}^2$ )	Périmètre ( $\mu\text{m}$ )	Extension dendritique ( $\mu\text{m}$ )
C57Bl6/J	7	3	$3151,9 \pm 352,7$	$1070,2 \pm 74,1$	$80,0 \pm 3,1$
	12	3	$4127,0 \pm 75,6$	$1347,2 \pm 54,9$	$95,4 \pm 3,8$
	21	3	$4579,2 \pm 321,3$	$1926,0 \pm 89,0$	$97,4 \pm 1,8$
<i>Ngsk Prnp<sup>+/-0</sup></i>	7	3	$2178,4 \pm 564,7$	$925,4 \pm 114,9$	$85,7 \pm 5,8$
	12	5	$1796,7 \pm 387,2$	$770,3 \pm 280,6$	$80,8 \pm 9,7$
	21	3	$2288,5 \pm 673,6$	$956,4 \pm 153,9$	$88,3 \pm 5,1$
<i>Ngsk Prnp<sup>0/0</sup></i>	7	8	$1915,4 \pm 594,2$	$789,5 \pm 230,8$	$80,4 \pm 8,4$
	12	7	$2061,8 \pm 735,8$	$811,1 \pm 255,8$	$77,4 \pm 11,9$
	21	7	$1635,5 \pm 166,5$	$759,3 \pm 85,9$	$90,7 \pm 8,7$
<i>NSE-Dpl Prnp<sup>0/0</sup></i>	7	3	$1404,7 \pm 263,5$	$628,0 \pm 170,1$	$85,1 \pm 10,4$
	12	5	$1409,8 \pm 212,8$	$577,3 \pm 118,6$	$88,5 \pm 6,6$
	21	3	$1486,7 \pm 129,0$	$612,1 \pm 47,2$	$84,3 \pm 2,8$
<i>ZH-I Prnp<sup>0/0</sup></i>	7	5	$1696,9 \pm 414,4$	$698,5 \pm 215,4$	$85,9 \pm 3,8$
	12	5	$1884,4 \pm 410,2$	$874,4 \pm 212,9$	$92,7 \pm 6,6$
	21	5	$1387,3 \pm 167,7$	$619,4 \pm 81,0$	$77,1 \pm 4,5$

**Tableau 3.** Aire, périmètre et extension dendritique moyens  $\pm$  écart-type des cellules de Purkinje du cervelet de souris sauvages (C57Bl6/J), hétérozygotes *Ngsk Prnp<sup>+/-0</sup>*, homozygotes *Prnp<sup>0/0</sup>* exprimant Dpl (*Ngk*, *NSE-Dpl Prnp<sup>0/0</sup>*) ou non (*ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>*) à 7, 12 et 21 jours en culture organotypique. n, nombre d'animaux.



**Figure 22. Développement des cellules de Purkinje sauvages et mutantes *Prnp*<sup>0/0</sup> après 7, 12 et 21 jours de culture organotypique.** **A.** Cellules de Purkinje immunofluorescentes pour CaBP dans les cultures de cervelet sauvage, Ngsk *Prnp*<sup>+ /0</sup>, Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, NSE-Dpl *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZHI-*Prnp*<sup>0/0</sup>. Echelle = 50 μm. **B-D.** Analyses quantitatives de l'aire (**B**), du périmètre (**C**) et de l'extension dendritique maximale (**D**) des cellules de Purkinje sauvages et *Prnp*<sup>0/0</sup> en culture à 7, 12 et 21 jours. n ≥ 3 animaux par génotype et par temps de culture. **B, C.** \* p < 0,05 et \*\* p < 0,001 (mutants par rapport aux sauvages). **D.** \* p < 0,05.

## 2.2. Les cellules de Purkinje *Prnp<sup>0/0</sup>* meurent au cours de la première semaine de culture

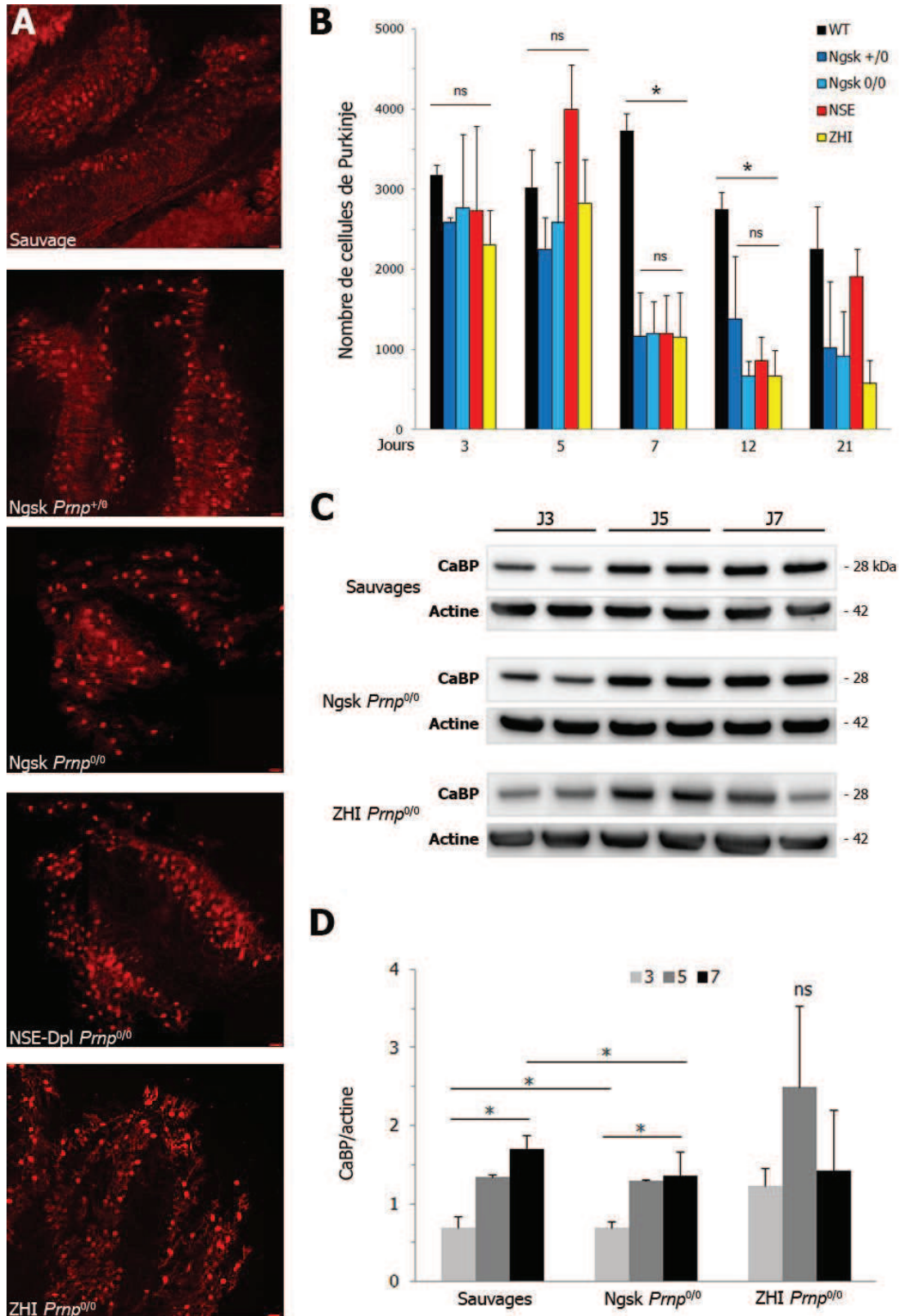
Les cellules de Purkinje survivantes visualisées en immunofluorescence pour CaBP restent le plus souvent groupées en multicouches et conservent une polarité axonale et dendritique quasi normales, bien qu'elles soient privées de leurs afférences grimpantes et moussues dans les cultures organotypiques (**Figure 23A**). Aussi, la distribution en monocouche qu'elles présentent *in situ* n'est pas toujours maintenue *ex vivo*. Une diminution du nombre de ces neurones est visualisée dans les cultures organotypiques mutantes *Prnp<sup>0/0</sup>* (**Figure 23A**). Pour confirmer la perte observée, les cellules de Purkinje ont été comptées à 3, 5, 7, 12 et 21 jours dans les cultures organotypiques de cervelet des souris mutantes *Ngsk Prnp<sup>+/-</sup>* et *Prnp<sup>0/0</sup>*, *NSE-Dpl Prnp<sup>0/0</sup>* et *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* et sauvages (**Figure 23B, Tableau 4**). L'interaction des facteurs « temps en culture » et « génotype » a un effet significatif sur le nombre de cellules de Purkinje ( $p < 0,001$ ). Après 3 et 5 jours de culture, le nombre moyen de cellules de Purkinje n'est pas significativement différent dans les cultures organotypiques sauvage (à 5 jours :  $3018 \pm 473$ ) et mutantes (à 5 jours : *Ngsk Prnp<sup>+/-</sup>* :  $2242,7 \pm 408,5$   $p = 0,308$  ; *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* :  $2585,5 \pm 746,4$   $p = 0,778$  ; *NSE Prnp<sup>0/0</sup>* :  $3998,3 \pm 558,1$   $p = 0,850$  et *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* :  $2823,5 \pm 542,1$   $p = 0,985$ ). Alors que le nombre de cellules de Purkinje reste stable dans les cultures sauvages entre 3 ( $3175,3 \pm 131$ ) et 21 jours ( $2257,0 \pm 521,3$ ) *in vitro* ( $p = 0,159$ ), une perte importante de cellules de Purkinje survient après 7 jours dans les cultures organotypiques de tous les mutants (test de Tukey :  $p < 0,001$ ). En plus d'être de cinétique identique. Cette perte présente une cinétique et une amplitude similaires chez tous les mutants (68-69% de perte par rapport au sauvage, **Figure 23B**).

De manière surprenante, la perte des cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques *Ngsk* et *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* constatée à 7 jours n'est pas reflétée par la mesure des quantités de CaBP en Western blot dans les extraits préparés entre 3 et 7 jours. En effet, alors que CaBP augmente entre 3 et 7 jours chez *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* ( $p < 0,05$ ), comme chez le sauvage, aucune différence significative n'est mesurée chez *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* (**Figure 23C, D**).

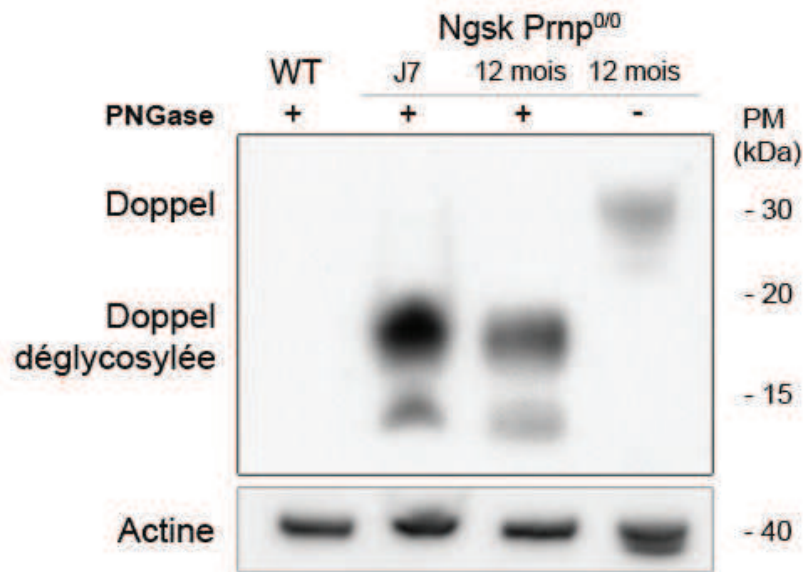
Comme le nombre de cellules de Purkinje *Ngsk* et *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* ne diffère pas significativement dans les cultures, j'ai vérifié l'expression de Dpl dans les cultures organotypiques *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* par Western blot. La forme déglycosylée de Dpl dont le poids moléculaire est situé entre 15 et 20 kDa est détectée après le traitement des extraits au N-glucosidase F (PNGase) dans les cultures organotypiques de cervelet *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et dans le cervelet *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* adulte, mais pas dans les extraits sauvages (**Figure 24**). Ceci indique que Dpl est bien exprimée dans les tranches de cervelet en culture organotypique, mais ne semble pas être impliquée dans la mort des cellules de Purkinje au cours de la période de culture.

Génotype	n	J7	J12	J21
C57Bl6/J	9	3151,9 ± 352,7	4127,0 ± 75,6	4579,2 ± 321,3
<i>Ngsk Prnp<sup>+/-</sup></i>	11	2178,4 ± 564,7	1796,7 ± 387,2	2288,5 ± 673,6
<i>Ngsk Prnp<sup>0/0</sup></i>	22	1915,4 ± 594,2	2061,8 ± 735,8	1635,5 ± 166,3
<i>NSE-Dpl Prnp<sup>0/0</sup></i>	11	1404,7 ± 263,5	1409,8 ± 212,8	1486,7 ± 129,0
<i>ZH-I Prnp<sup>0/0</sup></i>	15	1696,9 ± 414,4	1884,4 ± 410,2	1387,3 ± 167,7

**Tableau 4.** Nombre de cellules de Purkinje ± écart-type dans les cultures organotypiques de cervelet sauvages (C57Bl6/J), hétérozygotes *Ngsk Prnp<sup>+/-</sup>*, homozygotes *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*, *NSE-Dpl Prnp<sup>0/0</sup>* et *ZH-I Prnp<sup>0/0</sup>* à 7, 12 et 21 jours de culture. n, nombre d'animaux.



**Figure 23. Survie des cellules de Purkinje (CPs) dans les cultures organotypiques de cervelet de souris sauvages et mutantes *Prnp*<sup>0/0</sup>.** **A.** CPs immunofluorescentes pour CaBP dans le cervelet des souris sauvages et mutantes *Prnp*<sup>0/0</sup> après 7 jours de culture. **B.** Analyse quantitative du nombre de CPs dans les cultures de cervelet de souris sauvages et mutantes *Prnp*<sup>0/0</sup> entre 3 et 21 jours de culture. n ≥ 3 souris par génotype et par temps de culture. \* p < 0,05 ; ns, non-significatif. **C.** Western blot de CaBP à 3, 5 et 7 jours (J3-7) dans les cultures organotypiques de cervelet de souris sauvage, Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZHI-*Prnp*<sup>0/0</sup>. L'actine est utilisée comme contrôle de la quantité de protéines déposée. **D.** Analyse quantitative du signal de CaBP mesuré par Western blot, rapporté à celui de l'actine. n = 3 souris par génotype et par temps de culture.

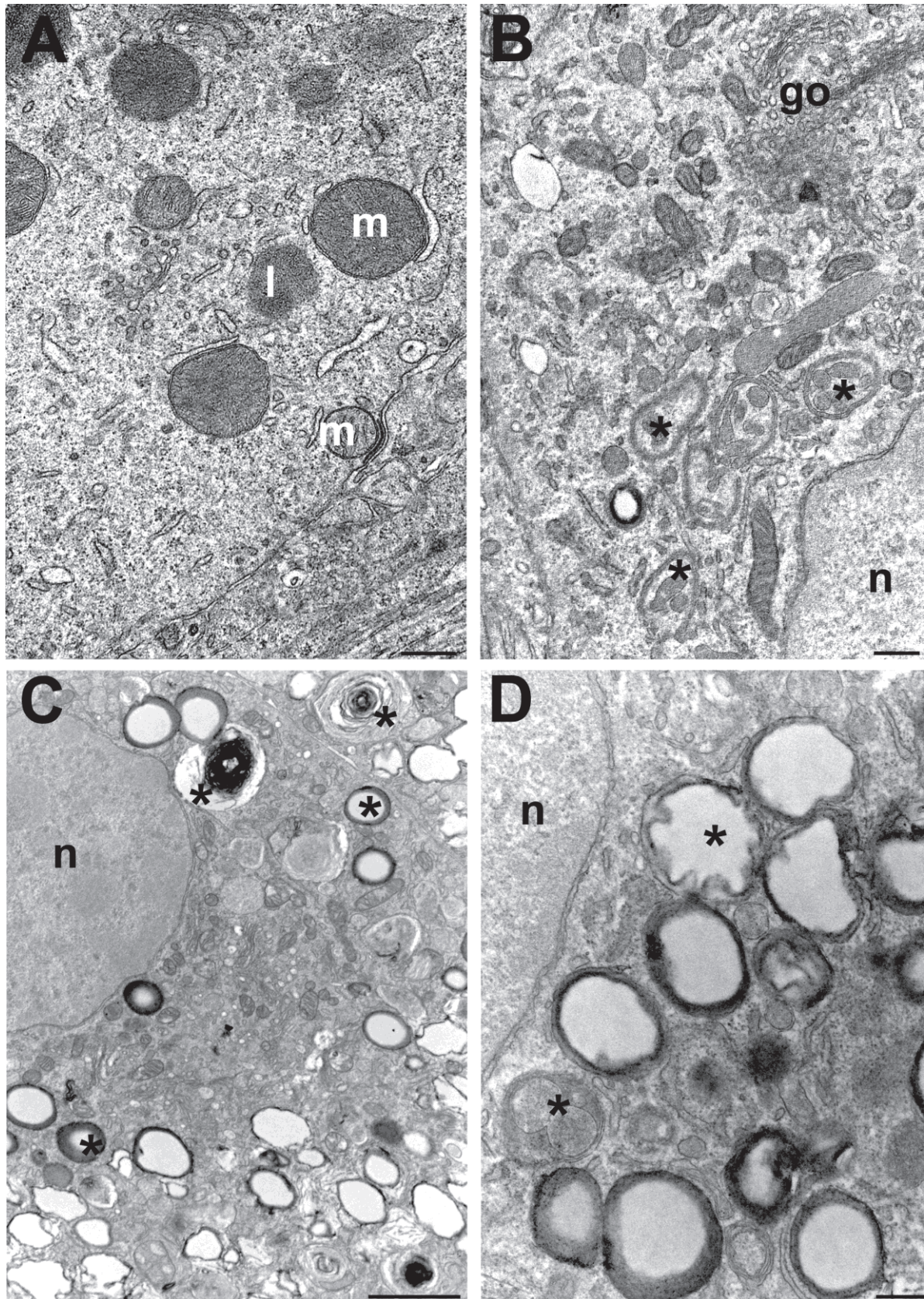


**Figure 24. Western blot de Doppel dans le cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> après 7 jours en culture organotypique.** La présence de Dpl est détectée dans une culture de cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (7 jours) et *in situ* dans le cervelet d'une souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> adulte (12 mois), mais pas d'une souris sauvage (WT). Après un traitement par la PNGase (peptide N-glucosidase), Dpl est déglycosylée et migre entre 15 et 20 kDa. L'actine est utilisée comme contrôle de la quantité de protéines déposées.

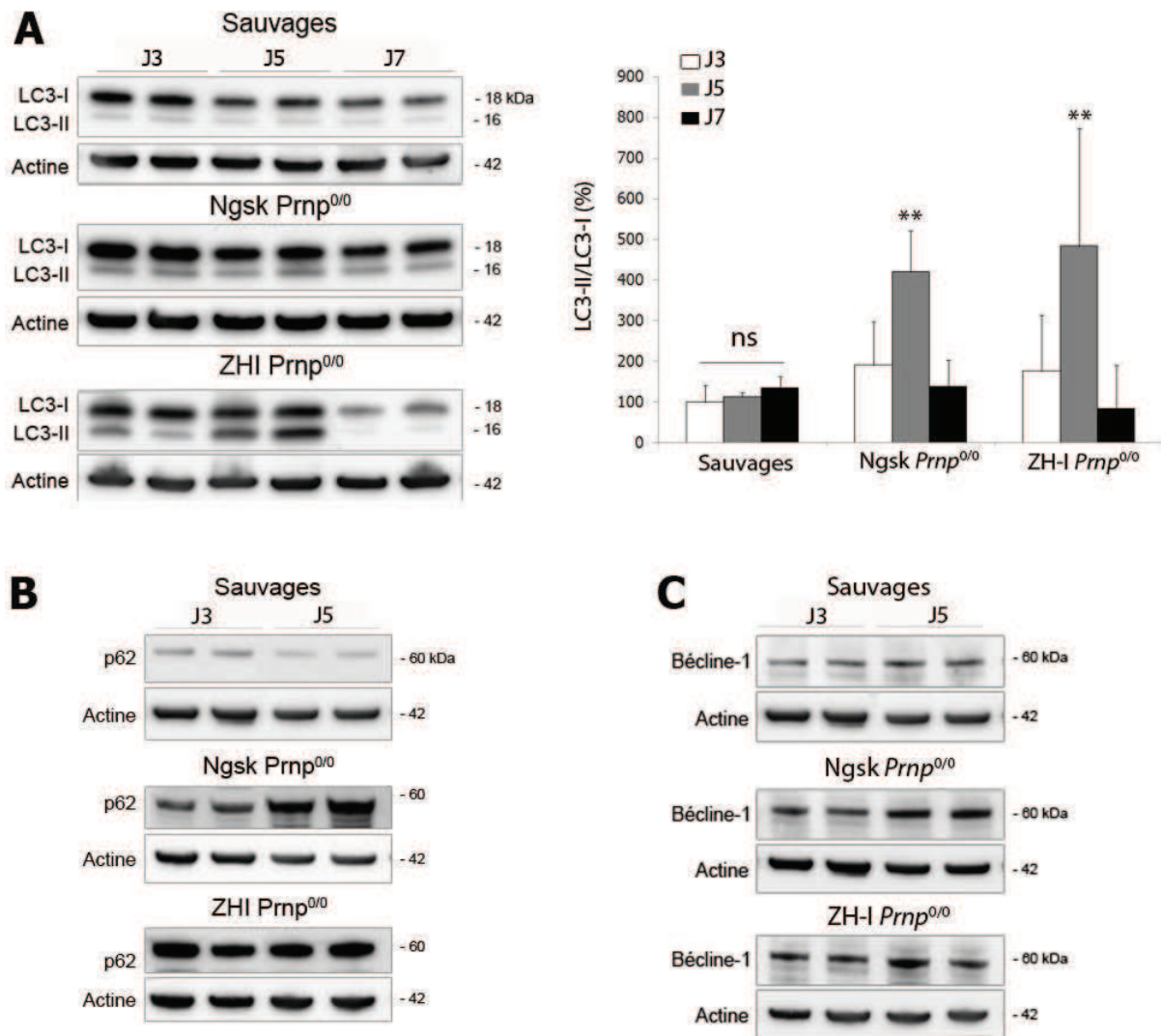
### 2.3. Activation de l'apoptose et de l'autophagie dans les cultures organotypiques de cervelet des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup>

L'observation des cellules de Purkinje au niveau ultrastructural dans les cultures organotypiques de cervelet de souris sauvages et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> permet de visualiser les autophagosomes à double membrane caractéristiques de l'autophagie. Après 7 et 12 jours de culture, alors que les autophagosomes sont rarement observés dans les cellules de Purkinje sauvages (**Figure 25A**), le neuroplasma des cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> contient des organites autophagiques à différents stades de maturation (**Figure 25B, C, D**).

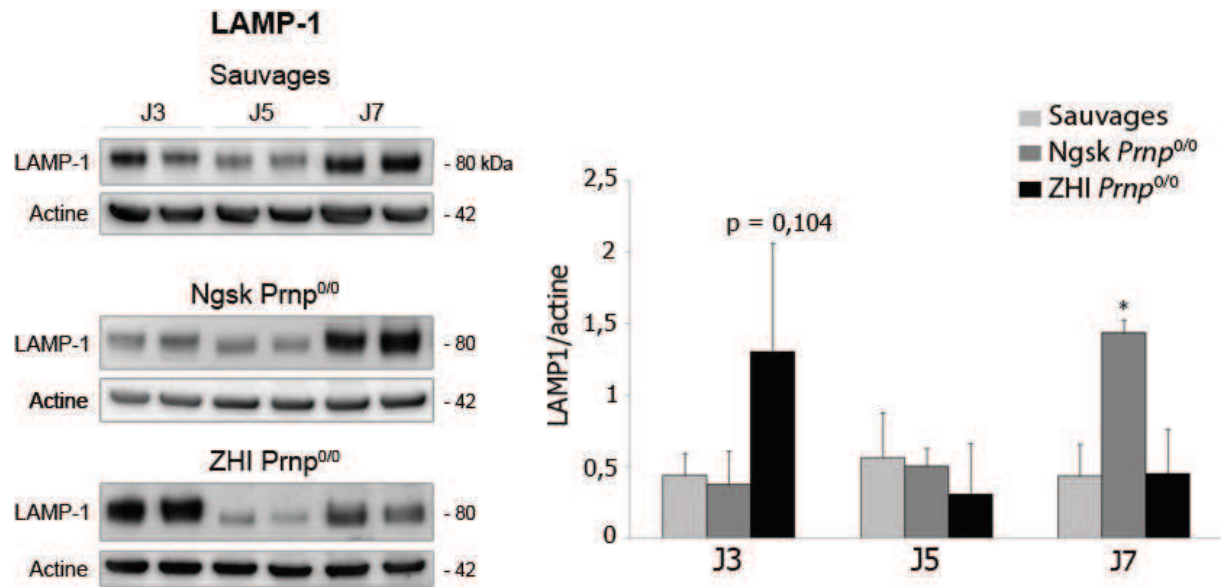
Les marqueurs de l'autophagie et de l'apoptose ont été recherchés en Western blot dans les cultures organotypiques de cervelet des souris sauvages, Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> après 3, 5 et 7 jours de culture, c'est-à-dire au cours de la période de perte des cellules de Purkinje *Prnp*<sup>0/0</sup>. Les protéines autophagiques LC3B-II, p62 et bécline-1 qui interviennent respectivement dans les étapes de séquestration des composants à dégrader et la formation de l'autophagosome ainsi que le récepteur lysosomal LAMP-1 impliqué dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes ont fait l'objet de cette étude. De faibles quantités de LC3B-II, p62 et bécline-1 sont détectées dans les cultures organotypiques sauvages. Ces trois marqueurs augmentent de quatre à cinq fois dans les cultures Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> après 5 jours de culture comparé aux cultures sauvages. Après 7 jours de culture, le taux de LC3B-II dans les cultures organotypiques Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> est retombé au même niveau que dans les cultures organotypiques sauvages (**Figure 26A**). Dans les cultures organotypiques Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup>, p62 et bécline 1 sont augmentées après 3 et 5 jours, alors que leur quantité est faible chez le sauvage (**Figures 26B, C**). L'augmentation de p62 est plus importante chez ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> que chez Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (**Figure 26B**), alors que l'inverse est observé pour bécline-1 (**Figure 26C**). Les taux des deux marqueurs sont retombés à un niveau faible après cette période. Les quantités de LAMP-1 ne varient pas significativement dans les cultures de cervelet ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> mais sont significativement augmentées dans les cultures Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> de 7 jours (**Figure 27**).



**Figure 25. Ultrastructure de cellules de Purkinje (CPs) sauvage (A) et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> en culture organotypique (B, C, D).** A. Cytoplasme de CP sauvage après 12 jours de culture. Noter la mitochondrie séparée de la membrane plasmique par un saccule de réticulum, trait caractéristique des CPs. Echelle = 500 nm. B, C, D. Autophagie dans le cytoplasme de CPs Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> à 7 jours de culture. Les astérisques indiquent les vésicules autophagiques en formation (B) et différents stades de formation des autophagolysosomes (C). Echelle = 500 nm. D. Détails des profils autophagiques. Echelle = 2  $\mu$ m. go, dictyosome de l'appareil de Golgi ; l, lysosome ; m, mitochondrie ; n, noyau.

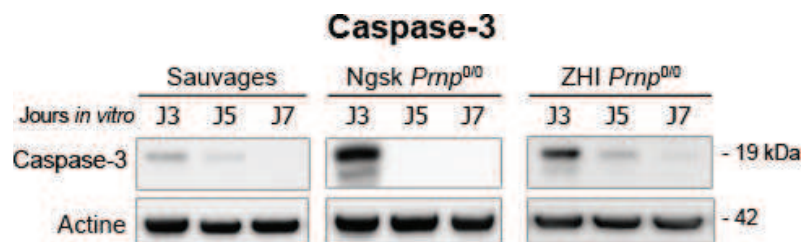






**Figure 27.** Western blot de LAMP-1 dans les cultures organotypiques de cervelet sauvage et mutants Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> après 3, 5 et 7 jours *in vitro* (J3, J5, J7). La quantification de l'intensité du signal rapporté à l'actine montre une augmentation de LAMP-1 à J7 dans le cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> qui témoigne d'une activité lysosomale plus intense. \*  $p < 0,05$  ;  $n = 3$  animaux par génotype et par temps en culture. L'actine est utilisée comme contrôle.

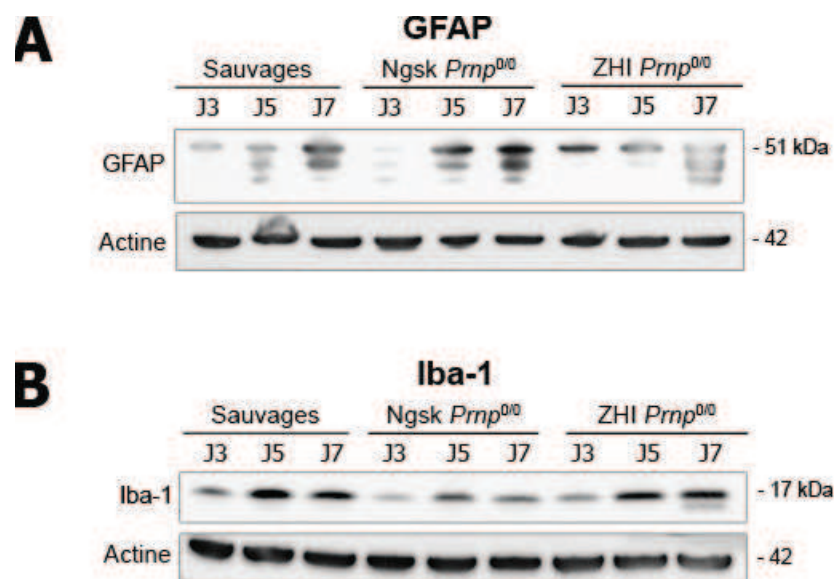
La caspase-3 active qui témoigne de l'activation de l'apoptose est mise en évidence par Western blot dans les extraits de cultures organotypiques de cervelet de souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> préparés pendant la période de perte des cellules de Purkinje entre 3 et 7 jours de culture. La caspase-3 active est plus abondante après 3 jours de culture chez Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> que chez ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> alors qu'elle n'est pas détectée dans les cultures organotypiques de cervelet de souris sauvages (**Figure 28**).



**Figure 28.** Western blot de caspase-3 dans les cultures organotypiques de cervelet sauvages et mutants Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> après 3, 5 et 7 jours *in vitro* (J3, J5, J7). L'augmentation de caspase-3 dans les cultures organotypiques mutantes Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> à 3 jours témoigne d'une induction importante de l'apoptose. L'actine est utilisée comme contrôle.

## 2.4. Inflammation dans les cultures organotypiques de cervelet

Les cultures organotypiques de cervelet contiennent des astrocytes et des cellules microgliales qui sont impliqués dans l'inflammation du tissu. Pour examiner l'évolution de ces cellules dans les cultures organotypiques, j'ai examiné l'expression d'un marqueur spécifique de chaque population cellulaire par Western blot à 3, 5 et 7 jours de culture. L'expression du marqueur d'astrocytes GFAP augmente dans les cultures de cervelet de souris sauvage et mutantes et ce, plus fortement chez les mutants *Ngsk* et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* (**Figure 29A**). L'expression d'Iba-1, un marqueur de la microglie active augmente plus tôt, entre 3 et 5 jours dans toutes les cultures sauvages et mutantes (**Figure 29B**). Ceci suggère que l'activation des cellules microgliales et l'apparente astrogliose ne sont pas liées à la condition mutante *Prnp<sup>0/0</sup>*, mais seraient plutôt une conséquence (neuroprotectrice ?) aux conditions de culture.

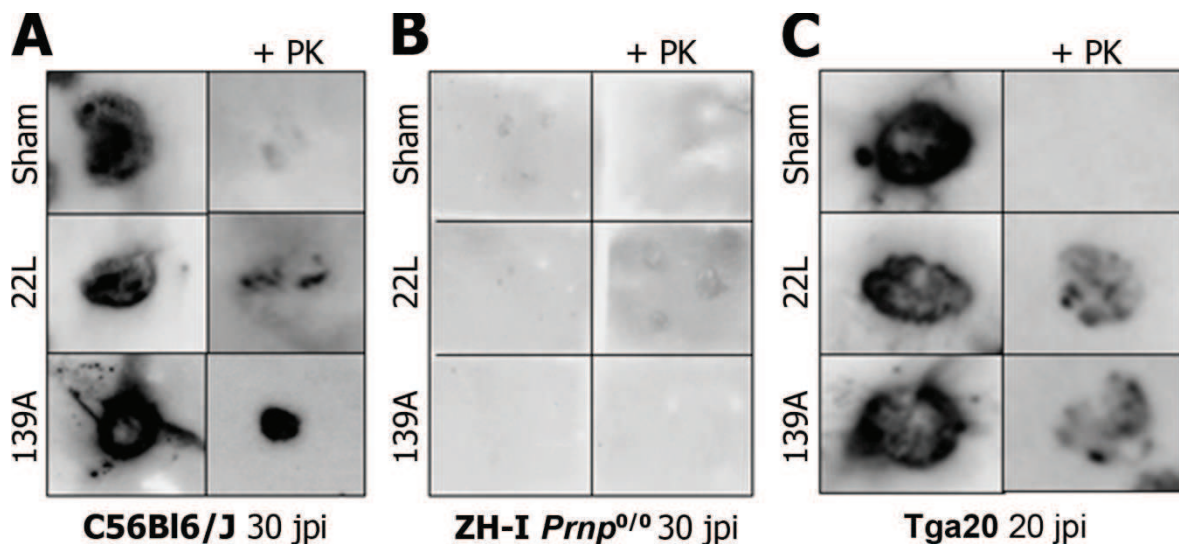


**Figure 29.** Western blot de GFAP (**A**) et Iba-1 (**B**) dans les cultures organotypiques de cervelet sauvages et mutants *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* après 3, 5 et 7 jours *in vitro* (J3-7). La prolifération des astrocytes suggérée par l'augmentation de GFAP à 7 jours de culture semble plus importante chez les mutants *Ngsk* et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* (**A**), tandis que l'activation de la microglie visualisée par l'augmentation d'Iba-1 entre 3 et 5 jours (**B**) survient dans les cultures sauvage et mutantes. L'actine est utilisée comme contrôle.

## 3. Validation des cultures organotypiques de cervelet pour l'étude des effets neurodégénératifs des prions infectieux : approche expérimentale préliminaire

Des effets neuropathologiques ont été décrits récemment dans les cultures organotypiques de cervelet infectés par des prions (Falsig et al., 2008). Avec Aurélie Guillemain en stage d'Ingénieur AgroParisTech au laboratoire, j'ai mis au point le protocole d'infection des cultures organotypiques par les souches de tremblante 22L et 139A. En utilisant la technique de l'histoblot, PrP<sup>22L</sup> et PrP<sup>139A</sup> sont détectées dans les cultures organotypiques de cervelet sauvage (C57Bl6/J) et Tga20 infectées par 22L ou 139A, après digestion par la protéinase K (PK, **Figure 30**). PrP<sup>Sc</sup> n'est pas détectée dans les cultures non-infectées (sham), ni dans les

cultures ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> infectées. Ces résultats montrent que PrP<sup>Sc</sup> est produite dans les cultures organotypiques de cervelet infectées et confirme que la production de PrP<sup>Sc</sup> requiert l'expression de PrP<sup>C</sup> dans le tissu.



**Figure 30. Histoblots des cultures organotypiques de cervelet infectées par la souche 22L ou 139A.** Détection de PrP<sup>C</sup> (sans traitement PK) et de PrP<sup>Sc</sup> (après traitement PK) dans les cultures non-infectées (sham) ou infectées (22L et 139A) de souris C57Bl6/J à 30 jpi (A), ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> à 30 jpi (B) et Tga20 à 20 jpi (C).

Les effets de l'infection sur la survie des cellules de Purkinje sont ensuite analysés après 30 jours de culture post-infection. Les cellules de Purkinje survivantes visualisées par l'immunofluorescence de CaBP (**Figure 31A**) ont été comptées après 30 jours post-infection par 22L ou 139A dans les cultures organotypiques de cervelet sauvage (C57Bl6/J), Tga20 et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (**Tableau 5, Figure 31B, C**).

L'analyse quantitative des cellules de Purkinje montre une perte de cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques C57Bl6/J infectées par 22L ( $22 \pm 2$  CPs survivantes par tranche) et 139A ( $145 \pm 63$  CPs par tranche) par rapport aux cultures non-infectées (sham :  $220 \pm 27$  CPs survivantes par tranche, **Figure 31A, B**). Aussi, une perte de cellules de Purkinje survient dans les cultures Tga20 infectées par 22L ( $293 \pm 68$  CPs survivantes par tranche) et 139A ( $191 \pm 31$  CPs survivantes par tranche) par rapport au sham ( $357 \pm 71$  CPs survivantes par tranche, **Figure 31A, C**). Une perte des cellules de Purkinje ZH-I survient aussi dans les cultures infectées par 22L et non-infectées (**Figure 31A, Tableau 5**). Cette perte est vraisemblablement provoquée par la condition mutante *Prnp*<sup>0/0</sup> et non par l'infection par les prions, en accord avec mes précédents résultats (**Figure 23A, B**).

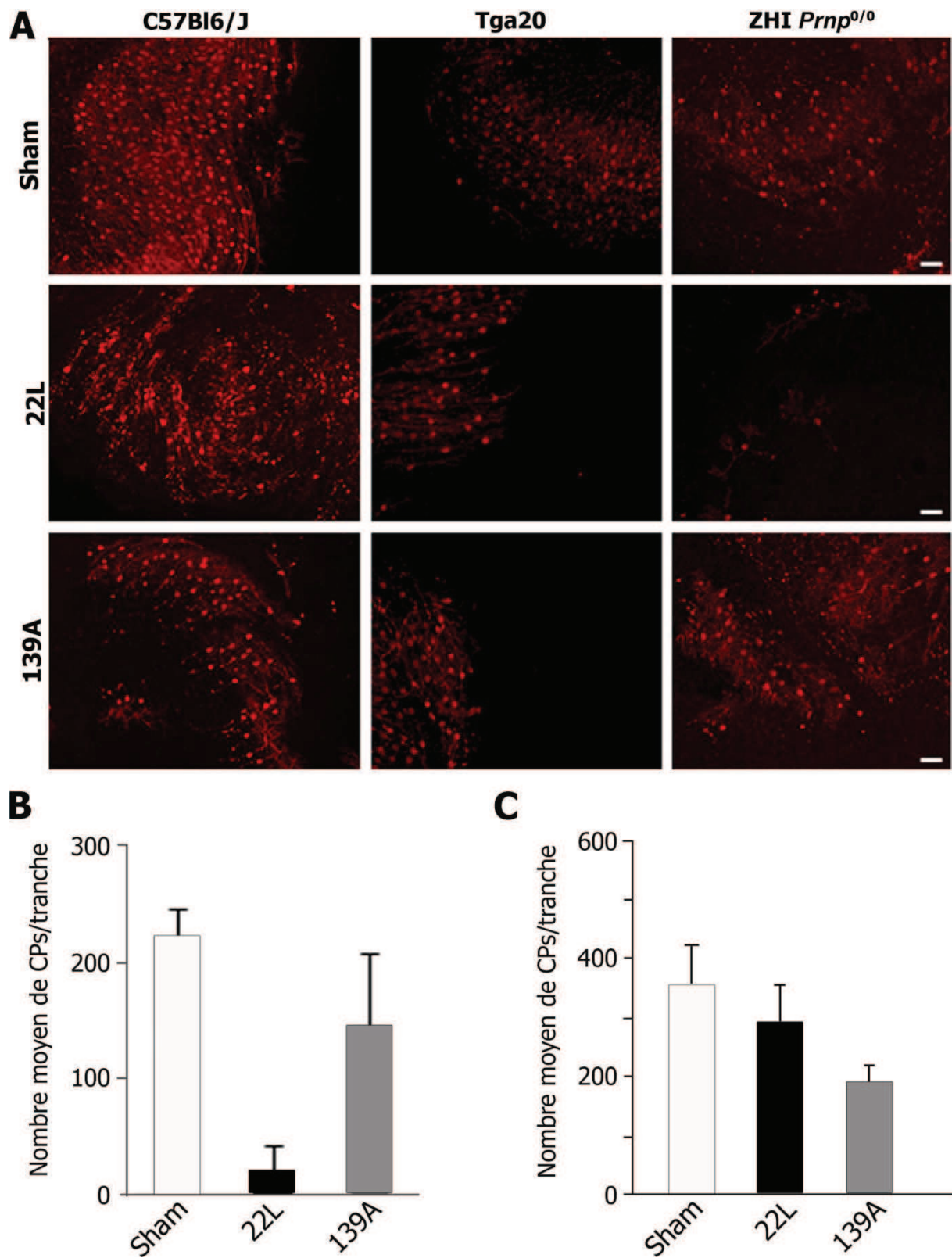
Ces résultats préliminaires semblent indiquer que l'infection par 22L et 139A provoque la mort des CPs *ex vivo* ( $n = 1$  ; 1 à 5 tranches/animal).

Génotype	n	Sham	22L	139A
C57Bl6/J	1	220 ± 27	22 ± 21	145 ± 63
Tga20	1	357 ± 71	293 ± 68	191 ± 31
ZH-I <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	1	130 ± 14	-	402 ± 38

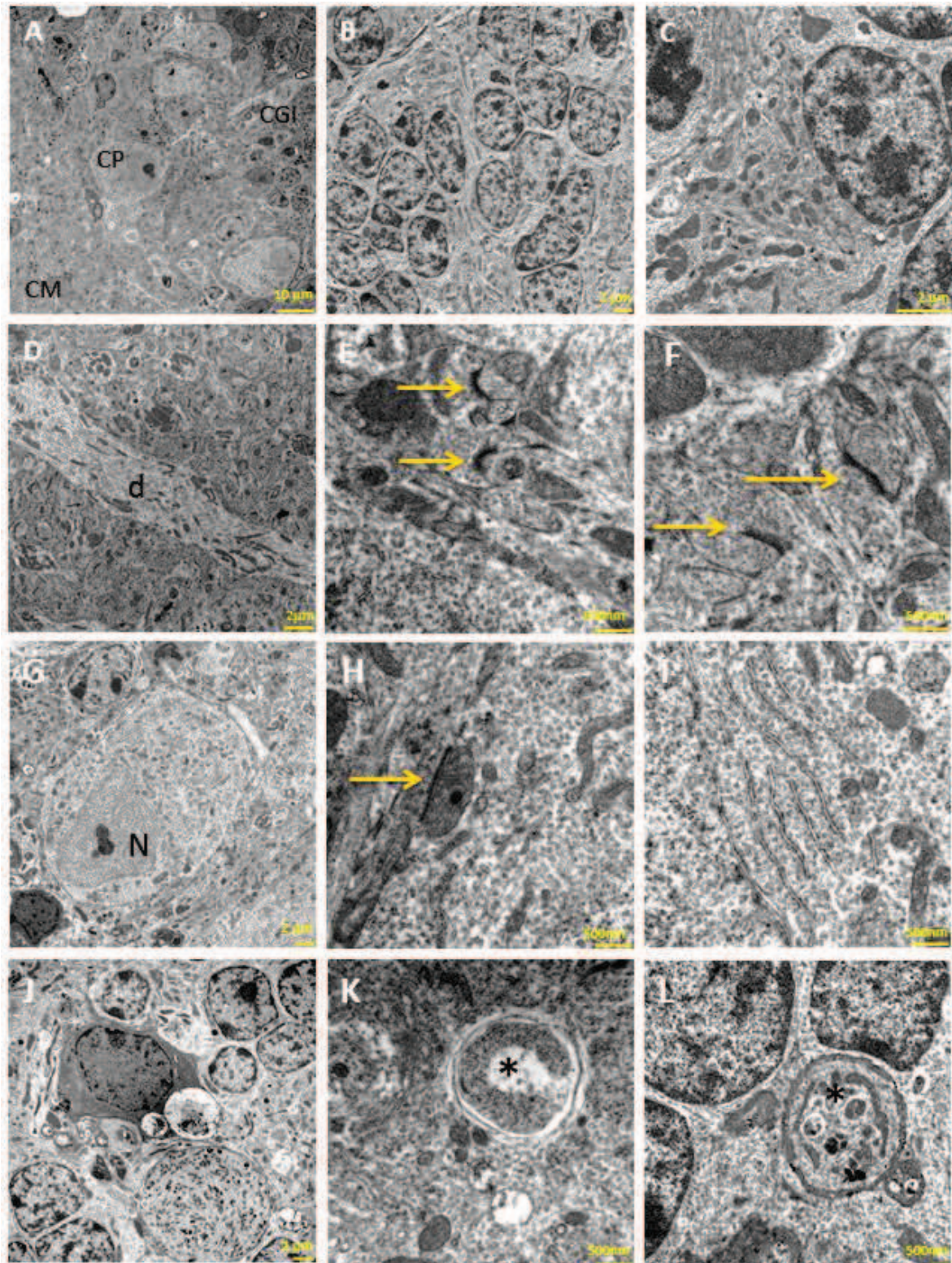
**Tableau 5.** Nombre de cellules de Purkinje ± écart-type dans les cultures organotypiques de cervelet sauvage (C57Bl6/J), Tga20 et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> non-infectées (sham) et infectées par 22L et 139A. n, nombre d'animaux (1 à 5 tranches/animal).

Après 30 jours de culture, l'organisation trilaminaire du cervelet est assez bien préservée dans les cultures organotypiques non-infectées. L'observation des tranches de cervelet au microscope électronique par transmission ne montre pas de modifications évidentes de l'ultrastructure cellulaire. La couche granulaire interne contient de nombreuses cellules granulaires dont le noyau riche en chromatine condensée et dense aux électrons est contenu dans un cytoplasme somatique restreint (**Figure 32B**). Ces neurones sont souvent groupés dans le neuropile contenant en majorité des dendrites, des axones et des profils astrocytaires (**Figure 32B, C**). La couche moléculaire contient des dendrites de cellules de Purkinje, des axones de cellules granulaires et des interneurons. Certaines épines dendritiques de cellules de Purkinje ayant perdu leurs afférences présynaptiques ont conservé leur densité post-synaptique et sont enveloppées de prolongements gliaux (**Figure 32D, E, F**). Les cellules de Purkinje sont identifiées par leur localisation à l'interface entre les couches granulaire et moléculaire bien qu'elles ne forment plus une monocouche, leur grande taille somatique, un nucléole bien visible et un neuroplasma riche en REG et en mitochondries séparées de la membrane plasmique par un saculle lisse (**Figure 32D, E, F, G**). Des figures de lyse, des cellules apoptotiques au contenu sombre et vacuolisé et des autophagosomes somatiques, dendritiques et axonaux sont parfois visibles (**Figure 32J, K, L**). Ces observations indiquent que les cultures organotypiques permettent la survie des neurones dans des conditions quasi-physiologiques à en juger par leur ultrastructure et l'établissement de relations synaptiques fonctionnelles.

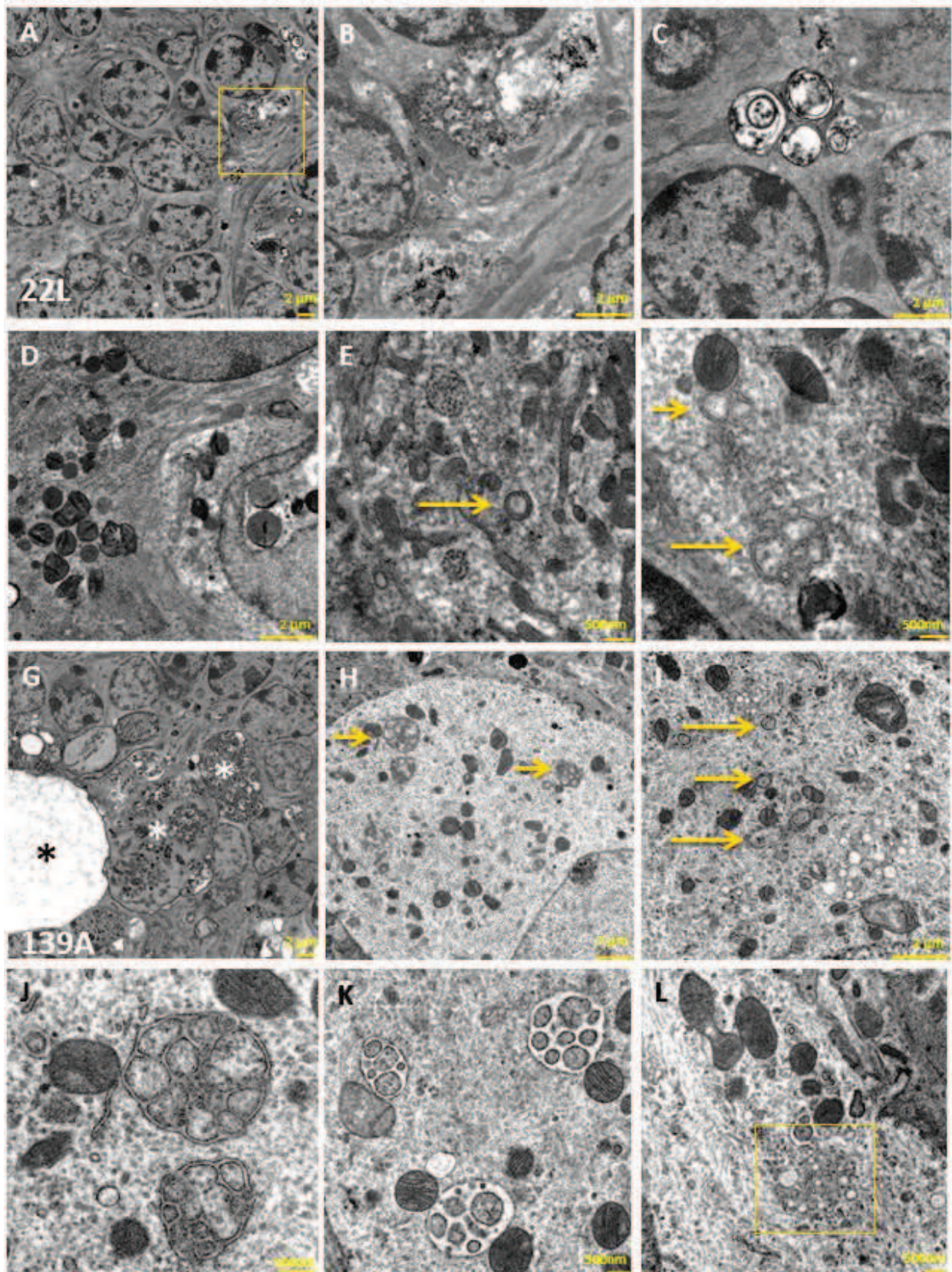
Après 30 jours post-infection, de nombreuses vacuoles, autophagosomes, autolysosomes et lysosomes sont visibles dans les cellules granulaires des cultures organotypiques de cervelet infectées par la tremblante 22L (**Figure 33B-D**). Les cellules de Purkinje contiennent des autophagosomes à double membrane et des organites de différentes tailles composées de REG réticulé formant des compartiments cytoplasmiques réguliers (**Figure 33I-K**). Certaines figures observées suggèrent l'évolution de ces structures en vacuoles à contenu multi-vésiculaire (**Figure 33L**). Aucune différence notable n'est observée dans la couche moléculaire infectée comparée aux cultures non-infectées. Ces observations n'ont porté que sur une tranche de cervelet infectée par 22L et une tranche de cervelet infecté par 139A mais des altérations ultrastructurales similaires ont été observées dans les deux cas, suggérant qu'elles sont spécifiques des effets des prions dans ce système. Ceci devrait être confirmé par une étude ultrastructurale plus approfondie.



**Figure 31. A.** Immunofluorescence de CaBP dans les cultures organotypiques de cervelet de souris C57Bl6/J, Tga20 et ZHI *Prnp*<sup>0/0</sup> infectées par 22L et 139A. Echelle = 100 $\mu$ m. **B, C.** Nombre moyen de cellules de Purkinje par tranche de cervelet non-infectées (sham) et infectées par 22L et 139A à 30 jpi. **B.** Cultures sauvages C57Bl6/J. **C.** Cultures Tga20.



**Figure 32. Ultrastructure du tissu cérébelleux de souris C57Bl6/J en culture organotypique non infectée à 30 jpi (sham).** **A.** Organisation des cultures organotypiques C57Bl6/J à 30 jpi non infectées (sham). **B.** Cellules granulaires. **C.** Neuropile de la couche granulaire. **D.** Neuropile de la couche moléculaire avec un dendrite (d) de cellule de Purkinje (CP). **E, F.** Synapses asymétriques sur épines dendritiques de CPs et d'interneurones (flèches). **G.** Cellule de Purkinje. N, noyau **H.** Mitochondrie séparée de la membrane plasmique par un saccule lisse. **I.** Réticulum endoplasmique granuleux dans une CP. **J.** Cellule dégénérative au cytoplasme dense et vacuolisé. **K.** Mitochondrie (\*) en cours de dégradation autophagique. **L.** Figures autophagiques dans un axone (\*) de CP.



**Figure 33. Ultrastructure du tissu cérébelleux de souris C57Bl6/J en culture organotypique infectée par 22L (A-F) et 139A (G-L) à 30 jpi. A. Couche granulaire interne (CGI). B, C, D. Détails du neuropile de la CGI montrée en A (encart), montrant des figures autophagiques (B, C) et de nombreux lysosomes (D). E-F. Cytoplasme de cellules de Purkinje (CPs) montrant des structures particulières (flèches). G. Neuropile de la CGI contenant des profils dégénératifs (\*). H-L. Détails de cytoplasme de CPs montrant des structures réticulées (flèches) à différents stades (I-K) et des vacuoles (L).**

## Etude I

### Résumé & conclusions

- La suppression de BAX protège un certain nombre de cellules de Purkinje de la neurotoxicité induite par Doppel dans le cervelet des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> dépourvues de protéine prion cellulaire. L'absence de BAX diminue aussi le nombre de neurones autophagiques. Ceci suggère que l'autophagie n'est pas activée dans les cellules de Purkinje sauvées par la suppression de BAX et que certains de ces neurones répondent à la condition Ngsk par l'apoptose dépendante de BAX et d'autres par un dysfonctionnement autophagique.
- Dans les cultures organotypiques de cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZHI *Prnp*<sup>0/0</sup>, l'activation de l'autophagie et de l'apoptose est contemporaine de l'atrophie et de la mort des cellules de Purkinje au cours de la première semaine suggérant que l'absence de protéine prion est suffisante pour provoquer la mort neuronale dans ce système.
- Les effets neuropathologiques des prions dans le cerveau sont reproduits *ex vivo* dans les cultures organotypiques de cervelet qui constituent un système avantageux pour l'étude mécanistique des voies de mort neuronale activées par les déficits d'origine transgénique ou infectieuse de la protéine prion.



## ETUDE II

# Compartimentation anatomique de la pathogenèse des prions dans le cervelet de souris

---

### Contexte scientifique

Les prions peuvent être distingués par la signature lésionnelle spécifique laissée par chaque « souche de prion » dans le cerveau. Cette signature anatomo-pathologique est caractérisée par la densité de la spongiose, la topographie et la forme de la déposition de PrP<sup>Sc</sup> ainsi que par la sévérité et la spécificité de la mort neuronale dans le cerveau<sup>19</sup>. Ainsi, les paramètres qui tracent la signature neurodégénérative spécifique d'un prion ou les déterminants de sa neurotoxicité sont la souche, la route de neuroinvasion et des paramètres cellulaires locaux encore mal connus. On connaît la vulnérabilité précoce de certaines populations neuronales comme par exemple les neurones sérotonergiques centraux (Vidal et al., 2009), qui témoignent de l'influence de tels paramètres probablement biochimiques. Le cervelet est une cible majeure de certaines souches de prions comme la MCJ et son organisation histologique est soupçonnée d'être impliquée dans la neuroinvasion chez les patients atteints de MCJ sporadique et familiale (Armstrong & Cairns, 2003 ; Jarius et al., 2003 ; King et al., 2003 ; Xiao et al., 2013). Aussi, la sensibilité différentielle des sous-populations de cellules de Purkinje à la condition Ngsk (i.e. à la neurotoxicité de Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup>) semble suivre un patron topographique correspondant à la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cervelet (Heitz et al., 2007). Ceci suggère que certains caractères biochimiques et/ou anatomiques de cette compartimentation pourraient influencer la neuroinvasion et la neurotoxicité des prions dans le cervelet. En d'autres termes, les effets neurodégénératifs des prions sont-ils influencés par l'organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet ?

### Objectif de l'étude

A la recherche de facteurs locaux intervenant dans la spécificité neuronale de la toxicité des prions, cette deuxième étude a pour objectif de mettre en évidence une éventuelle corrélation topographique des effets neuropathologiques des prions à l'organisation anatomique du cervelet. J'ai utilisé à cet effet la souche de tremblante 22L aux effets particulièrement sévères dans le cervelet (Fraser and Dickinson, 1967, 1968 ; Kim et al., 1987) dont j'ai analysé par des techniques d'histologie et d'immunohistochimie, l'impact anatomo-pathologique dans le cervelet de souris infectées par voie intra-cérébelleuse (i.cb), intracérébrale (i.c.) et intrapéritonéale (i.p.) susceptibles d'aboutir à des signatures anatomopathologiques distinctes (Kim et al., 1990). J'ai ainsi analysé la reproductibilité inter-individuelle et entre ces différentes voies d'infection, du patron anatomo-

---

<sup>19</sup> Voir § Introduction, chapitre I, 5. Anatomopathologie des maladies à prions dans le système nerveux central, p31.

pathologique de 22L dans le cortex cérébelleux. J'ai ensuite comparé la topographie des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> et de la perte des neurones cérébelleux au patron de la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cortex cérébelleux.

### 1. Topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> aux stades précliniques

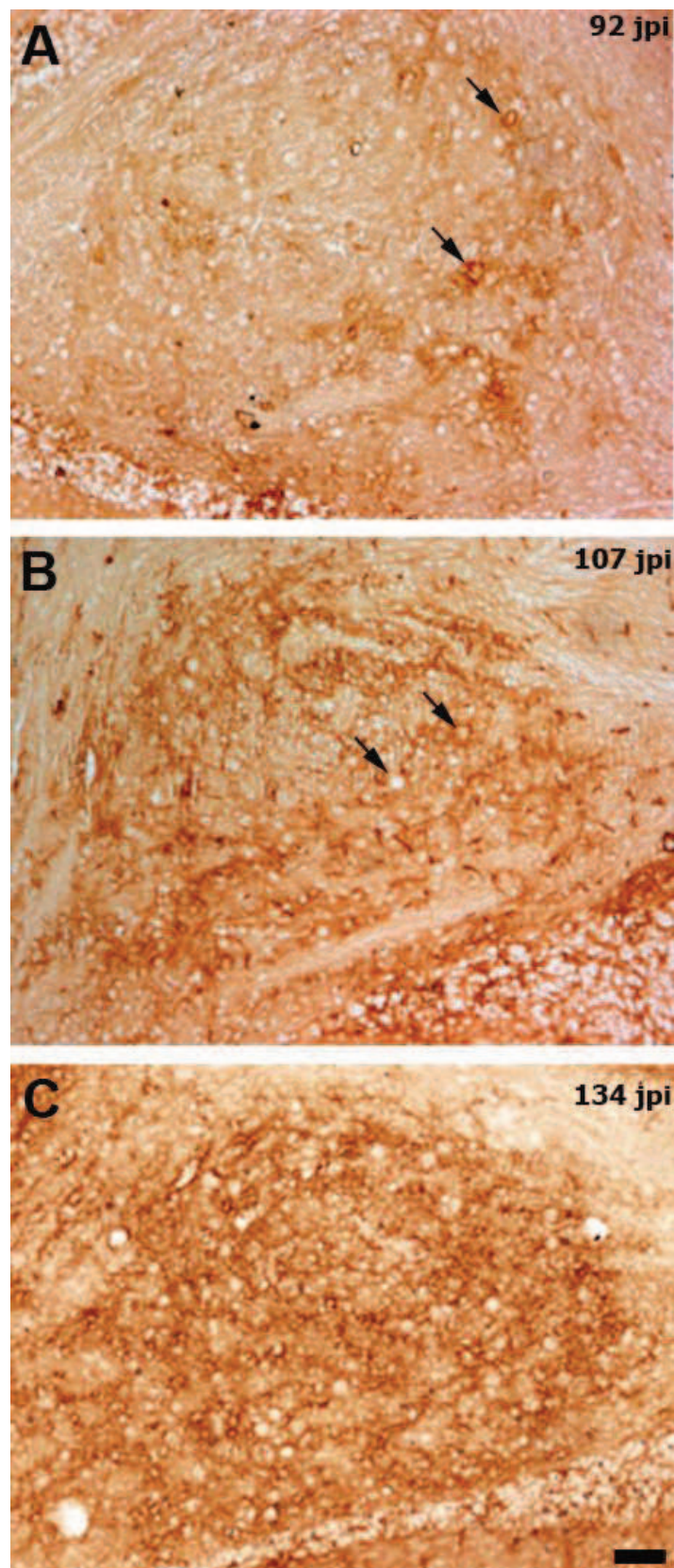
La distribution des dépôts de PrP<sup>Sc22L</sup> en immunohistochimie a été étudiée aux stades précliniques 92 et 107 jpi dans le cervelet des souris infectées par voie i.cb. Au stade préclinique 92 jpi, PrP<sup>22L</sup> est détectée au niveau des neurones des noyaux profonds fastigial, interposé et denté (**Figure 34A**). Des dépôts de PrP<sup>22L</sup> apparaissent sous forme diffuse entre les cellules granulaires et par plaques dans la couche granulaire interne et s'étendent occasionnellement dans la couche moléculaire inférieure (**Figure 35 A, B, C**). Ces dépôts apparaissent fins et granuleux dans la couche moléculaire où ils forment des travées verticales (**Figure 35E**) et correspondent souvent à des dépôts plus importants dans les couches des cellules de Purkinje et granulaire interne sous-jacentes. Cette distribution est observée dans les lobules III, IV-V, VI et IX (**Figure 35A**) du vermis et dans les hémisphères au niveau du lobule simple, des paraflocculi et du crus 1 où s'est formée une bande constituée de travées de PrP<sup>22L</sup> (**Figure 35G**).

A un stade préclinique plus avancé (107 jpi), les dépôts de PrP<sup>22L</sup> gagnent en intensité et en étendue dans les noyaux profonds et le cortex cérébelleux (**Figure 34B**). Les dépôts diffus de PrP<sup>22L</sup> se sont étendus à la couche granulaire interne de tous les lobules du vermis, aux lobules paramédian, copula, simple (**Figure 35F**), crus 1 et 2 (**Figure 35H**) des hémisphères ainsi qu'aux flocculi et paraflocculi. Les dépôts forment des travées verticales dans la couche moléculaire des lobules IV, V, VI, IX et X du vermis et de la copula pyramidis, du paramédian et du crus 1 et 2. Des groupes de travées délimitent des bandes de forte immunoréactivité PrP<sup>22L</sup> dans les lobules IX et X du vermis et dans les lobules simple (**Figure 35F**), crus 1, crus 2, (**Figure 35H**), paramédian, copula pyramidis et les flocculi des hémisphères (**Figures 35A, B**). La bande observée dans le crus 1 au stade préclinique 92 jpi (**Figure 35G**) est toujours visible au stade 107 jpi (**Figure 35H**).

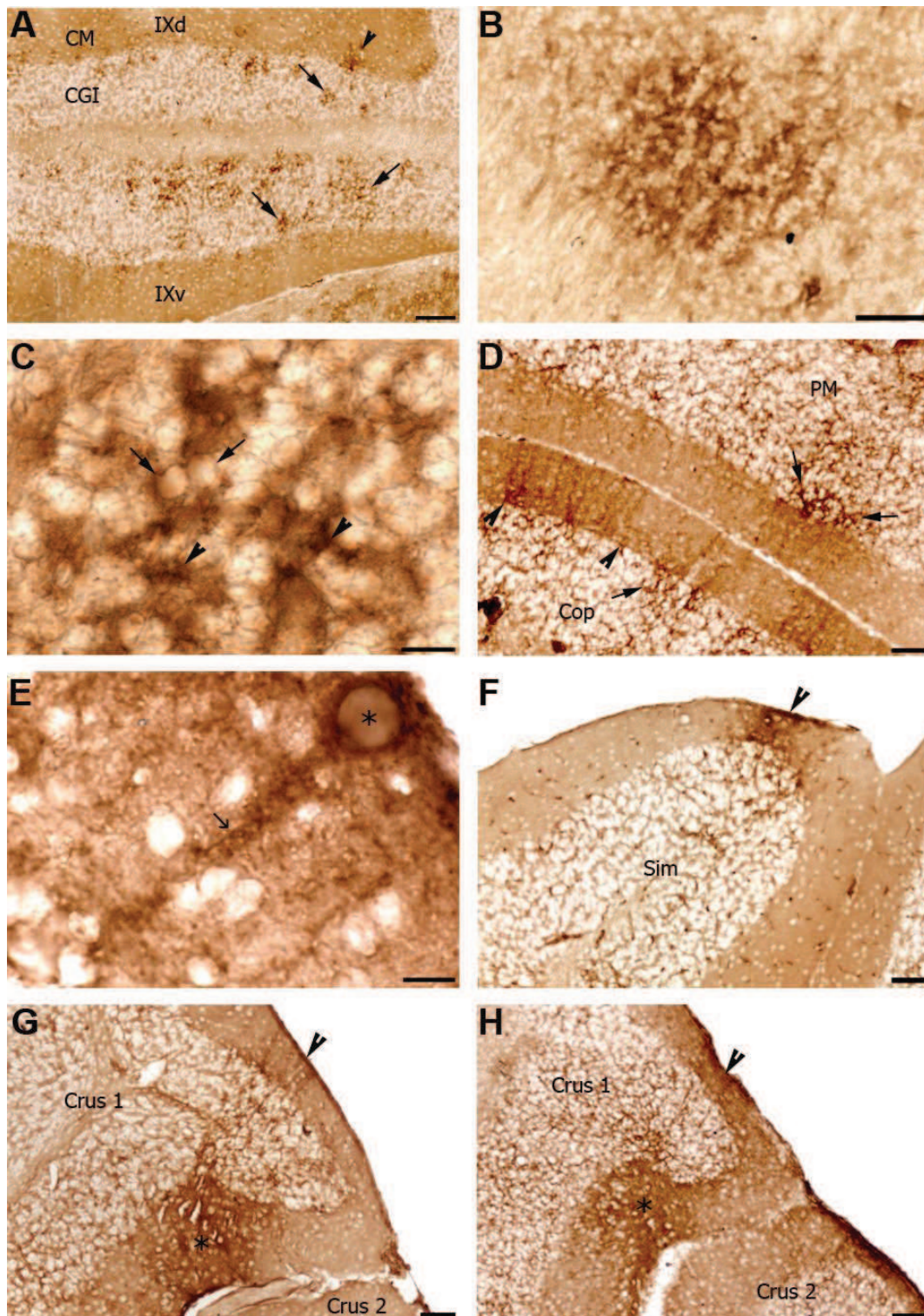
### 2. Topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> aux stades cliniques

Aux stades cliniques 134-156 jpi, PrP<sup>22L</sup> s'est accumulée dans tout le neuropile des noyaux profonds fastigial, denté et interposé des souris infectées par voie i.cb. (**Figures 34C, 36A**), i.c. (**Figure 37A**) et i.p. (**Figure 38A**). Dans le cortex cérébelleux, quelque soit la voie d'inoculation de 22L, PrP<sup>22L</sup> forme des travées et des bandes de travées verticales dans la couche moléculaire du vermis et des hémisphères. Les dépôts de PrP<sup>22L</sup> sont les plus intenses dans la couche des cellules de Purkinje et la CGI sous-jacentes aux bandes et travées de PrP<sup>22L</sup> de la couche moléculaire (**Figures 39-42**).

Ainsi, les bandes de dépôts de PrP<sup>22L</sup> traversent le cervelet dans le plan sagittal chez toutes les souris analysées aux stades cliniques. L'étude comparée de ces bandes aux niveaux antérieur, médian et postérieur du cervelet montre qu'elles forment un patron topographique reproductible d'un animal à l'autre et indépendant de la voie d'inoculation i.cb. (n=3), i.c. (n=4) et i.p. (n=3). Le patron de « banding » de PrP<sup>22L</sup> est défini par une bande médiane flanquée d'au moins 7 bandes parasagittales (**Figures 37, 38, 39**).



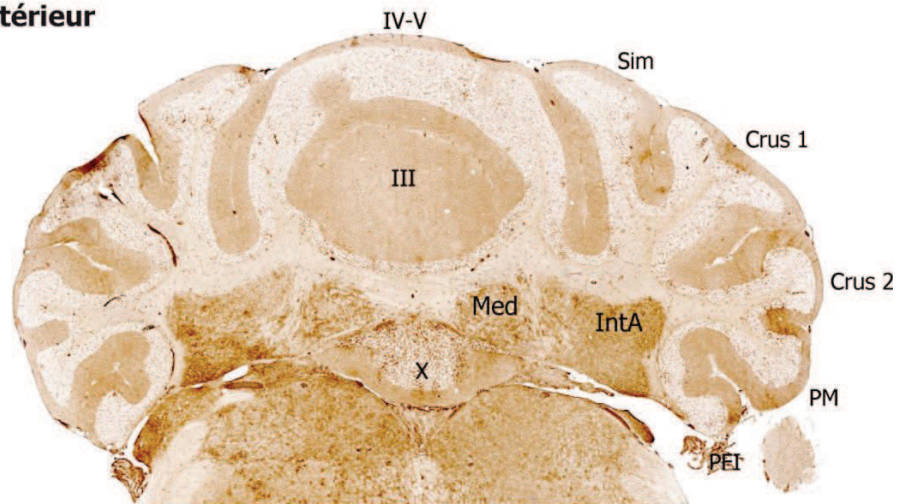
**Figure 34. Région médiane du noyau fastigial. Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup>.** Les dépôts amyloïdes de PrP<sup>22L</sup> envahissent progressivement le noyau autour des neurones fastigiens (flèches) au cours des stades précliniques 92 jpi (A) et 107 jpi (B) et clinique 134 jpi (C). Echelle = 50  $\mu$ m.



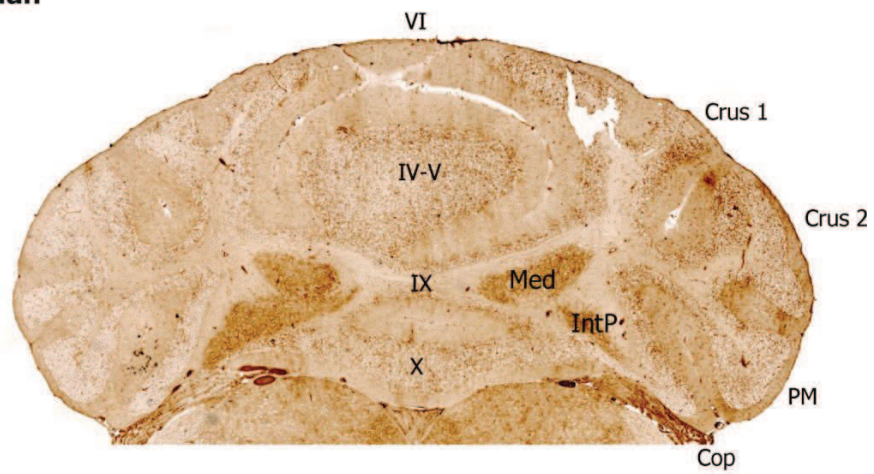
**Figure 35. Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux aux stades précliniques 92 (A, B, C, E, G) et 107 jpi (D, F, H) après inoculation intracérébelleuse i.cb.** A. Dépôts immunoréactifs diffus dans la couche granulaire interne (CGI, flèches) et la couche moléculaire (CM, têtes de flèche) du lobule vermal IX (IXd, dorsal ; IXv, ventral). B. Dépôt de PrP<sup>22L</sup> formant une « plaque » dans la CGI du lobule VI vermal. C. Fort grossissement de B montrant la localisation intercellulaire de PrP<sup>22L</sup> dans la CGI (têtes de flèches). Flèches, cellules granulaires. D. PrP<sup>22L</sup> forme des groupes de travées verticales dans la CM (têtes de flèches) en continuité avec des zones de forte immunoréactivité dans la CGI (flèches). PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis. E. Dépôts de PrP<sup>22L</sup> en travées verticales dans la CM du crus 1 (flèches). \*, vacuole de spongiose. F. Bande de dépôts de PrP<sup>22L</sup> dans la CM et la CGI (tête de flèche) de l'apex du lobule simple (Sim). G-H. Une bande de dépôt de PrP<sup>22L</sup> traverse l'apex du crus 1 dorsal (tête de flèche) et ventral (\*) aux deux stades précliniques 92 et 107 jpi. Echelle = 50 µm (A, B, D, F-H) et 10 µm (C, E).

**A**

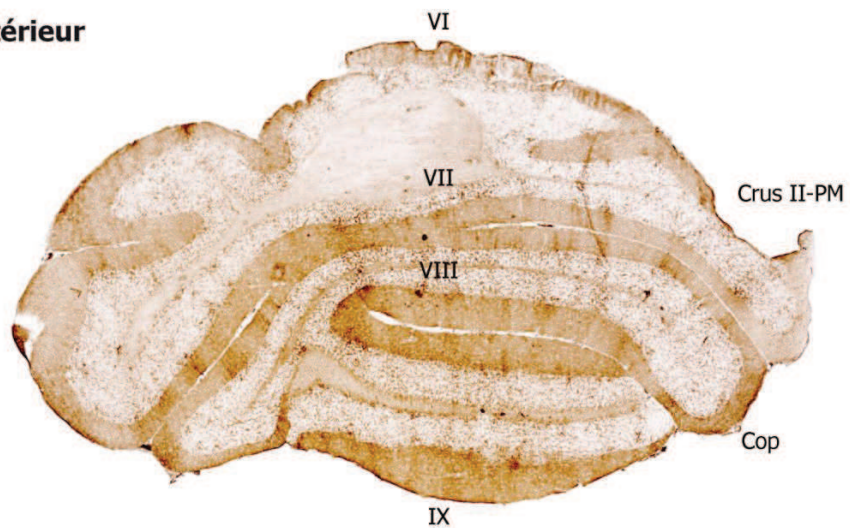
**Antérieur**



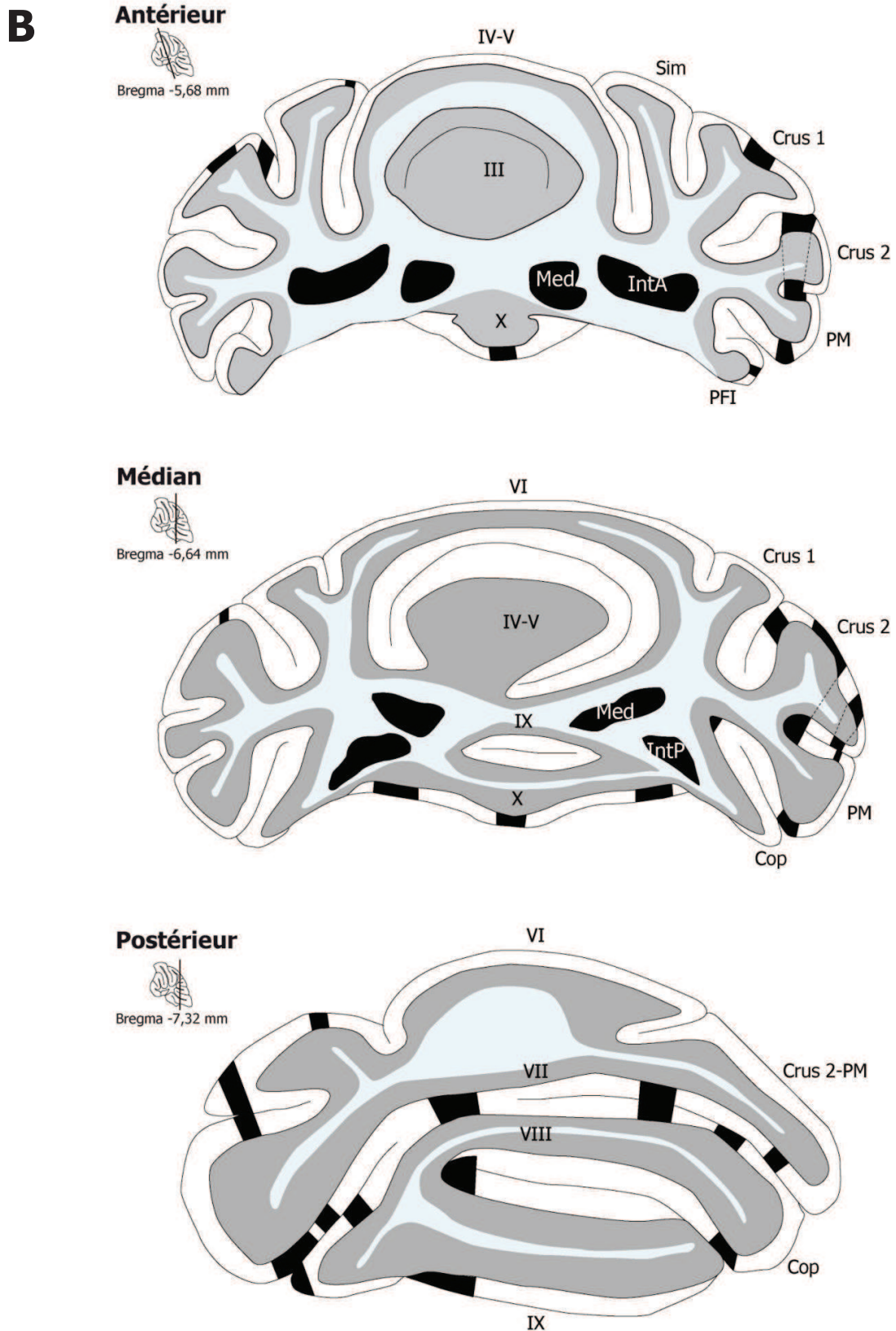
**Médian**



**Postérieur**

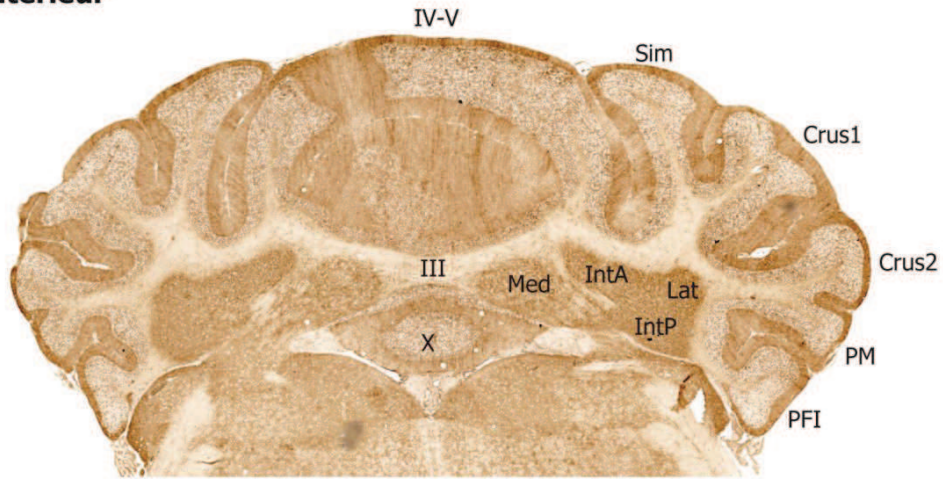


500  $\mu$ m

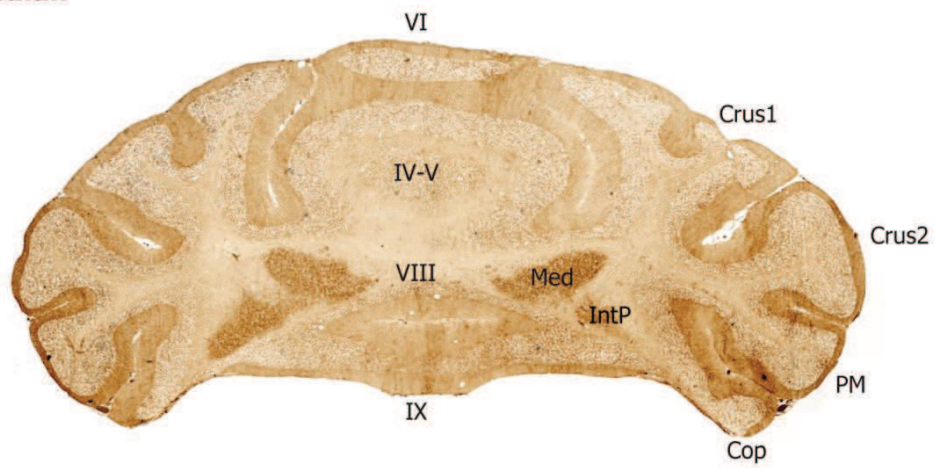


**Figure 36. Coupes transversales de cervelet aux niveaux antérieur, médian et postérieur de souris infectées par 22L i.cb. aux stades précliniques 92-107 jpi. A. Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup>. B. Patron des bandes PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet. Med, noyau médian (fastigial) ; IntA, IntP, régions antérieure et postérieure du noyau interposé ; Sim, lobule simple ; PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis.**

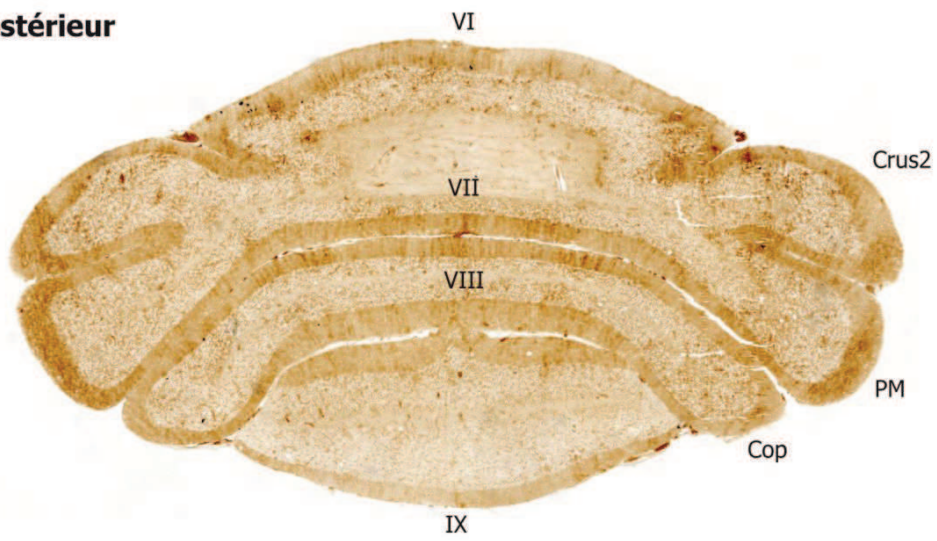
**A** Antérieur



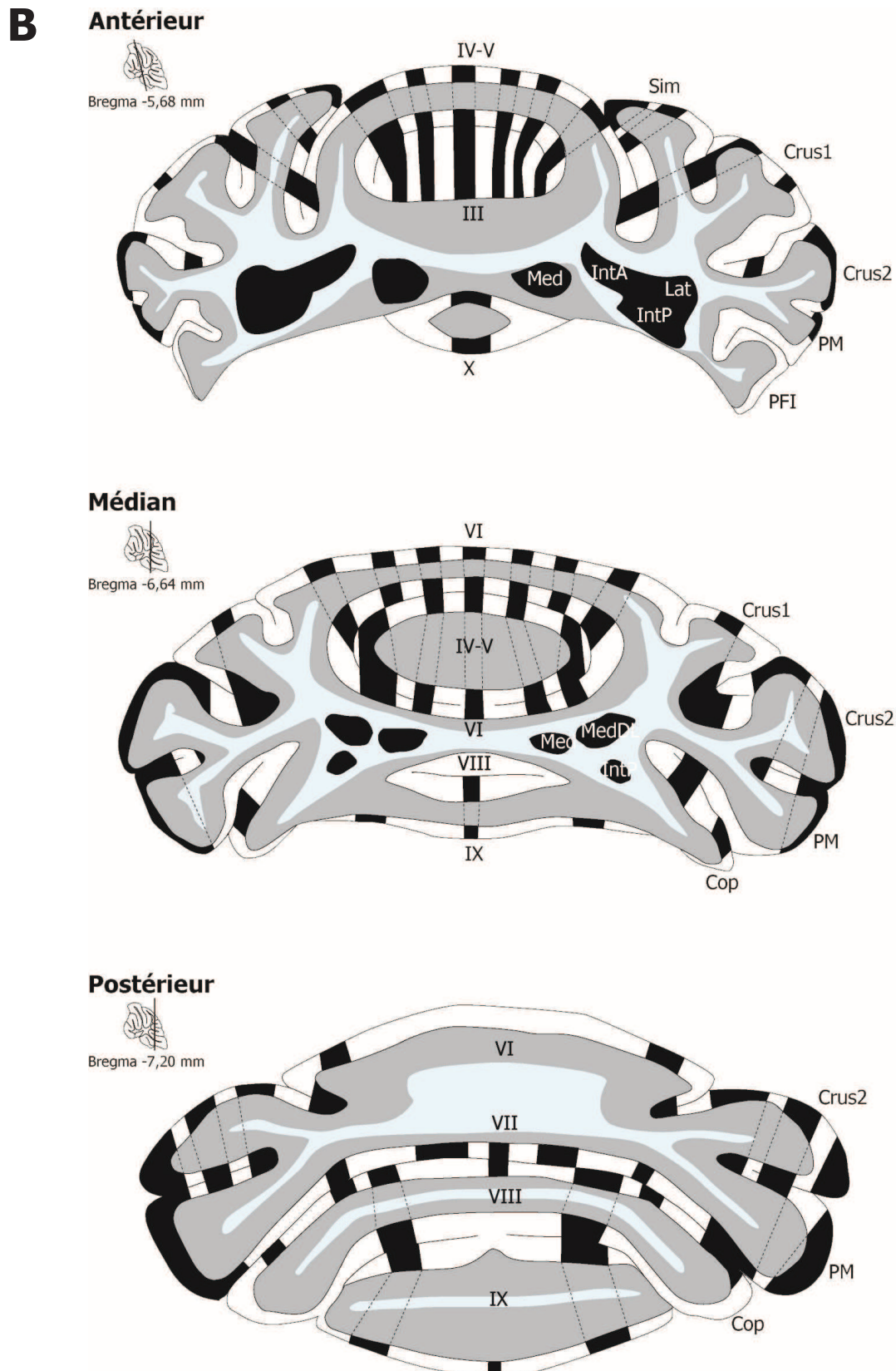
**Médian**



**Postérieur**



500  $\mu$ m

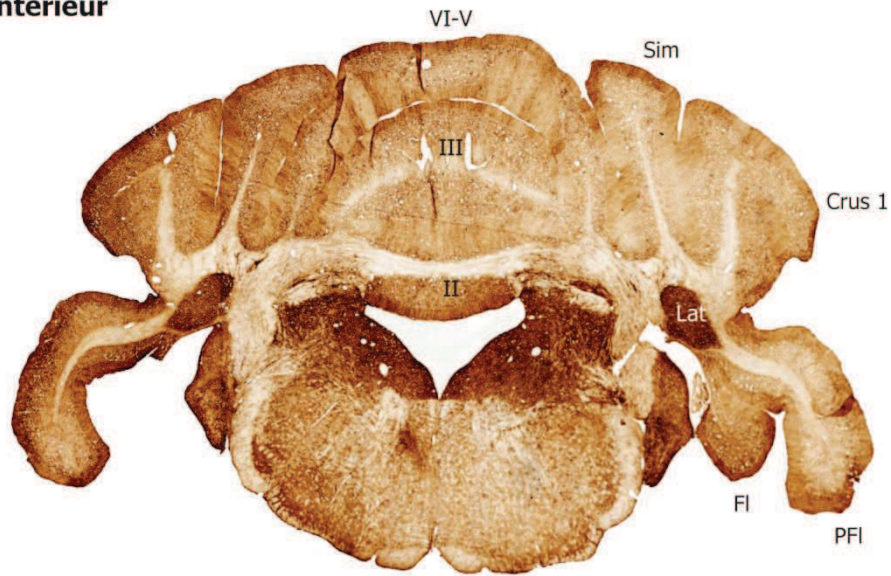


**Figure 37. Coupes transversales de cervelet aux niveaux antérieur, médian et postérieur de souris infectées par 22L i.cb. aux stades cliniques 134-156 jpi. A. Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup>. B. Patron des bandes PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet. Med, noyau médian(fastigial) ; IntA, région antérieure du noyau interposé ; IntP, région postérieure du noyau interposé ; Lat, noyau latéral (denté) ; Sim, lobule simple ; PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis.**

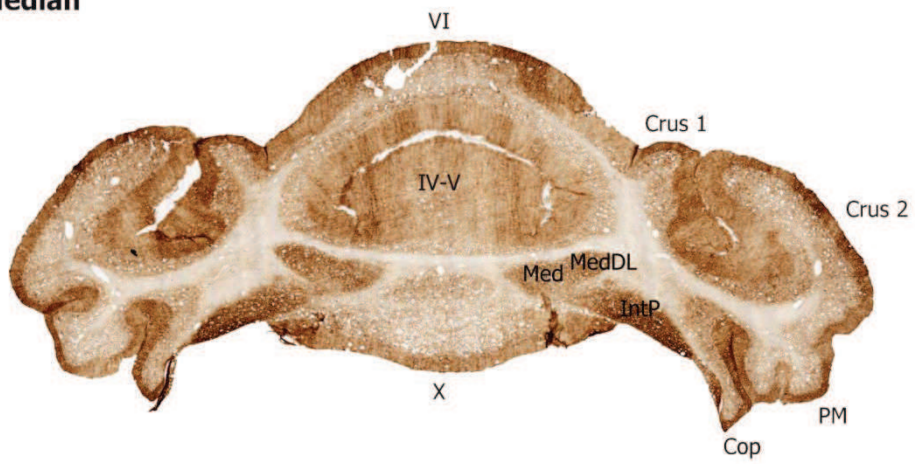


**A**

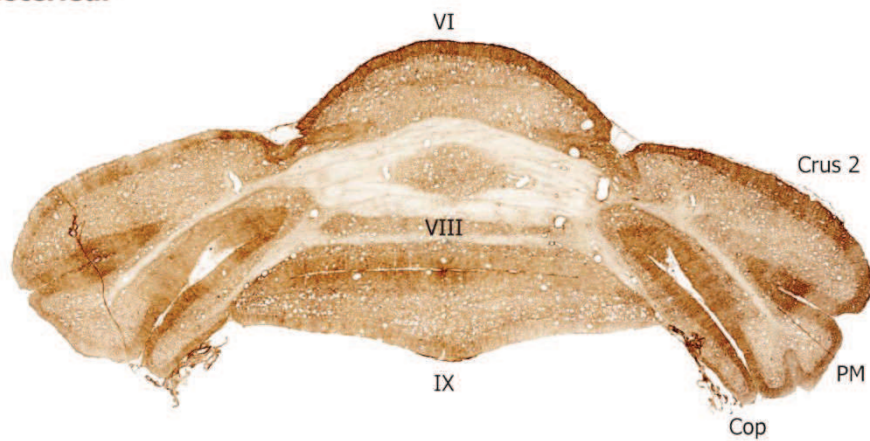
**Antérieur**



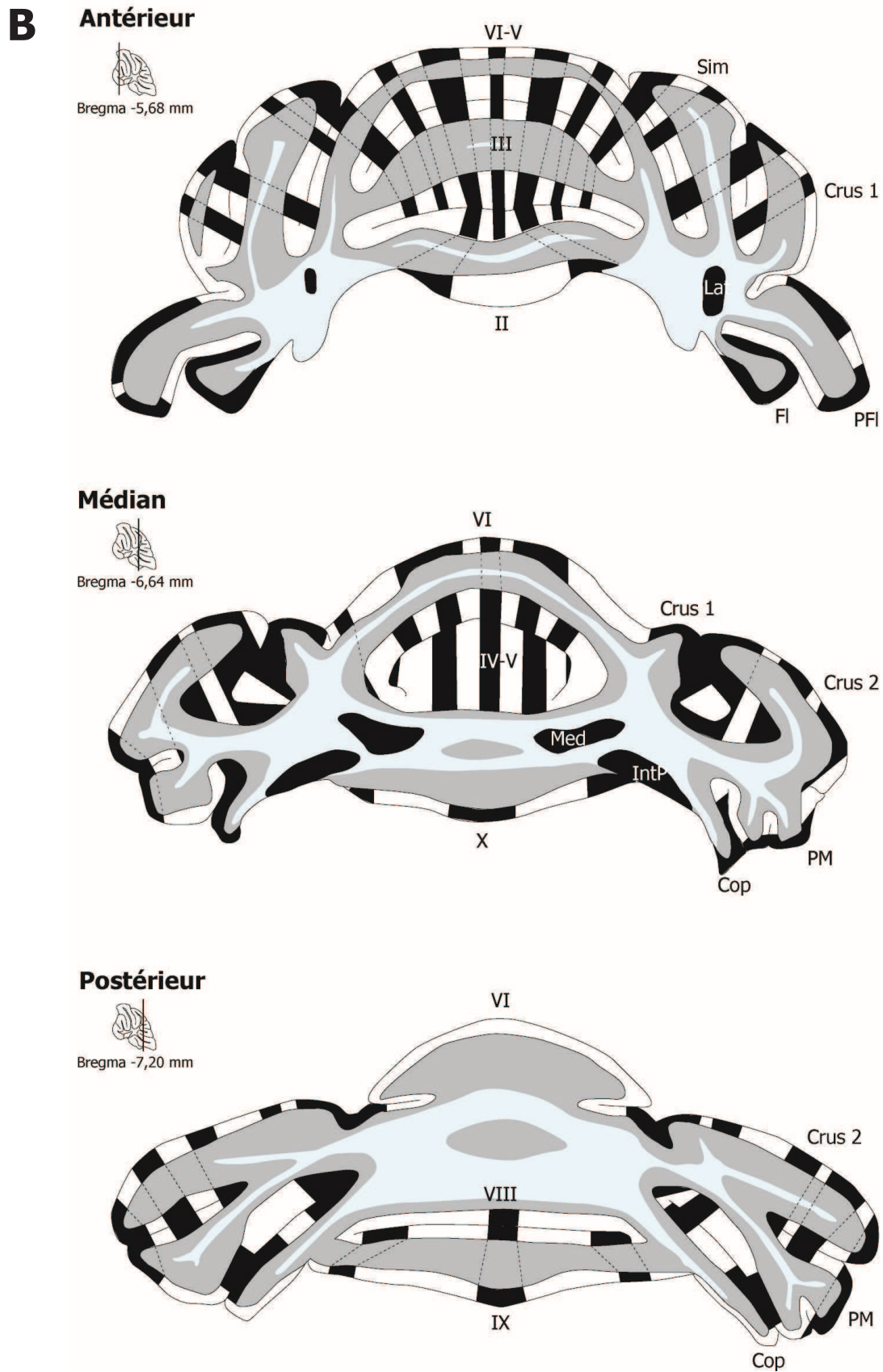
**Médian**



**Postérieur**



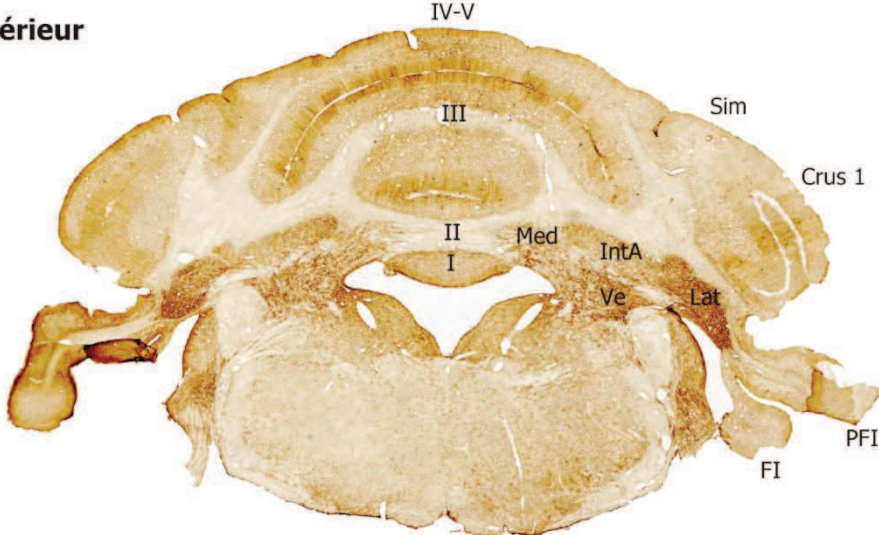
500 μm



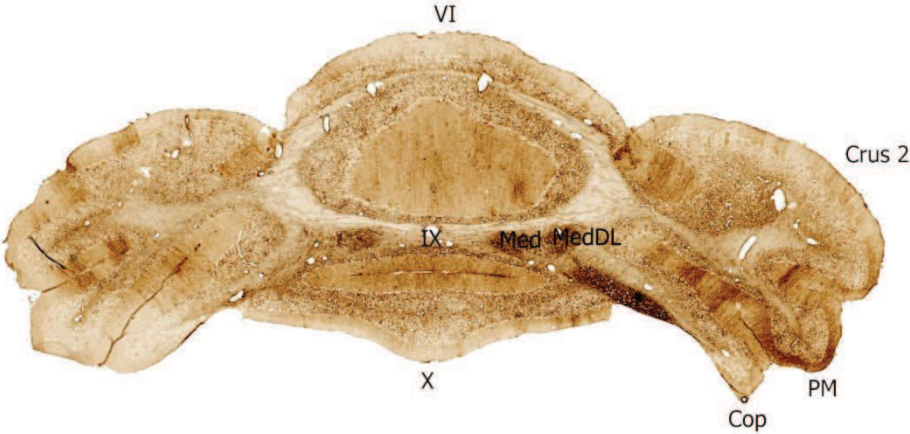
**Figure 38. Coupes transversales de cervelet aux niveaux antérieur, médian et postérieur de souris infectées par 22L i.c. aux stades cliniques 139-153 jpi. A. Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup>. B. Patron des bandes PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet. Med, noyau médian (fastigial) ; IntP, région postérieure du noyau interposé ; Lat, noyau latéral (denté) ; Sim, lobule simple ; PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis.**

**A**

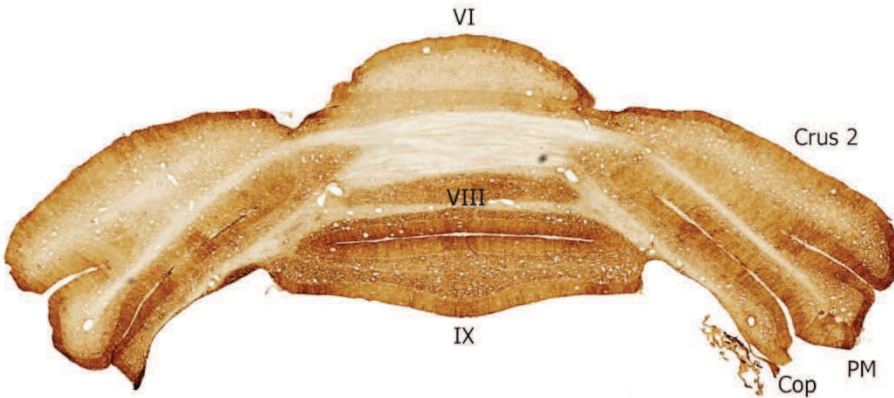
**Antérieur**



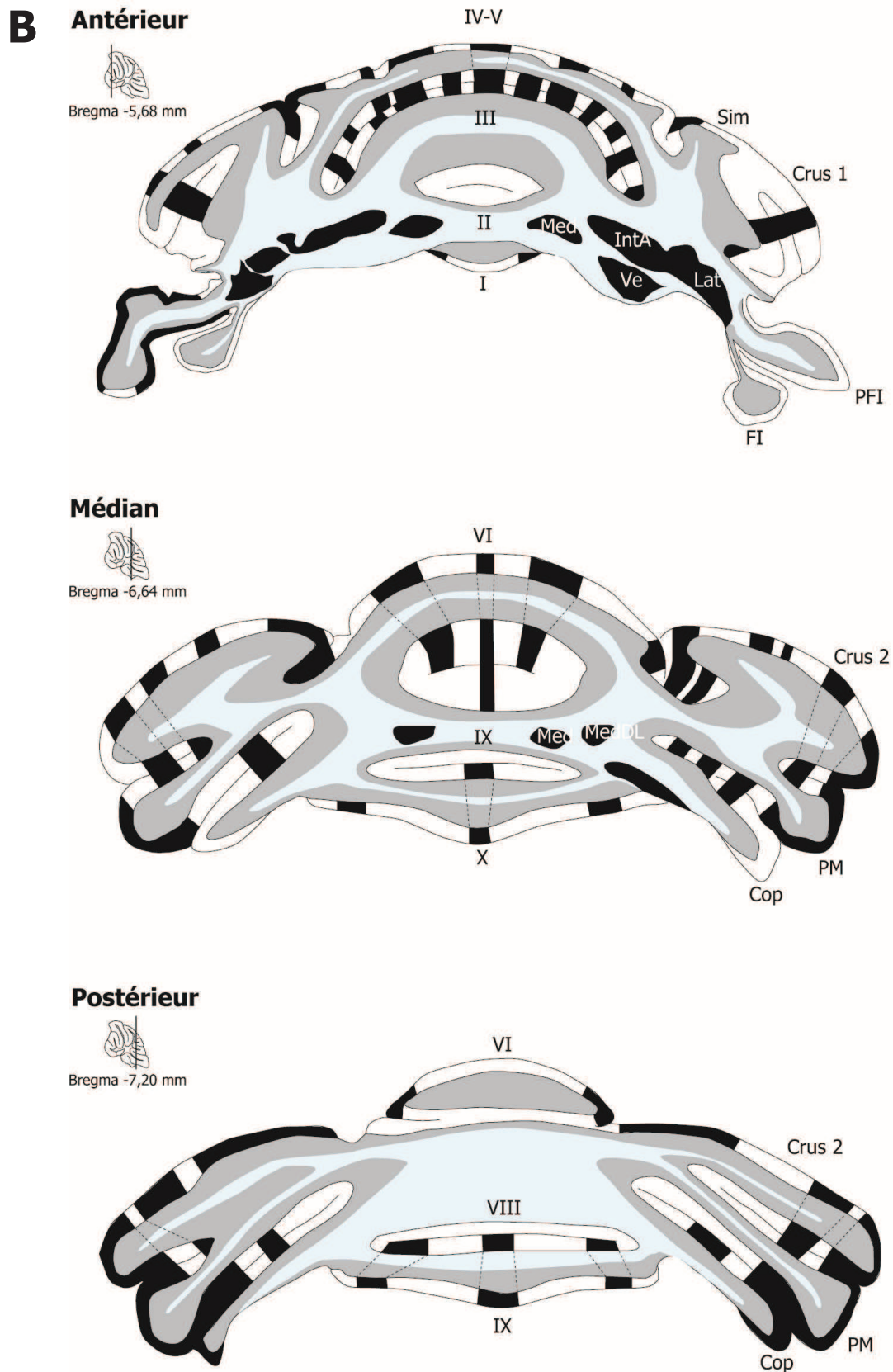
**Médian**



**Postérieur**



500  $\mu$ m



**Figure 39. Coupes transversales de cervelet aux niveaux antérieur, médian et postérieur de souris infectées par 22L i.p. aux stades cliniques 193-205 jpi. A. Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup>. B. Patron des bandes PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet. Med, noyau médian ; IntA, région antérieure du noyau interposé ; Sim, lobule simple ; PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis.**

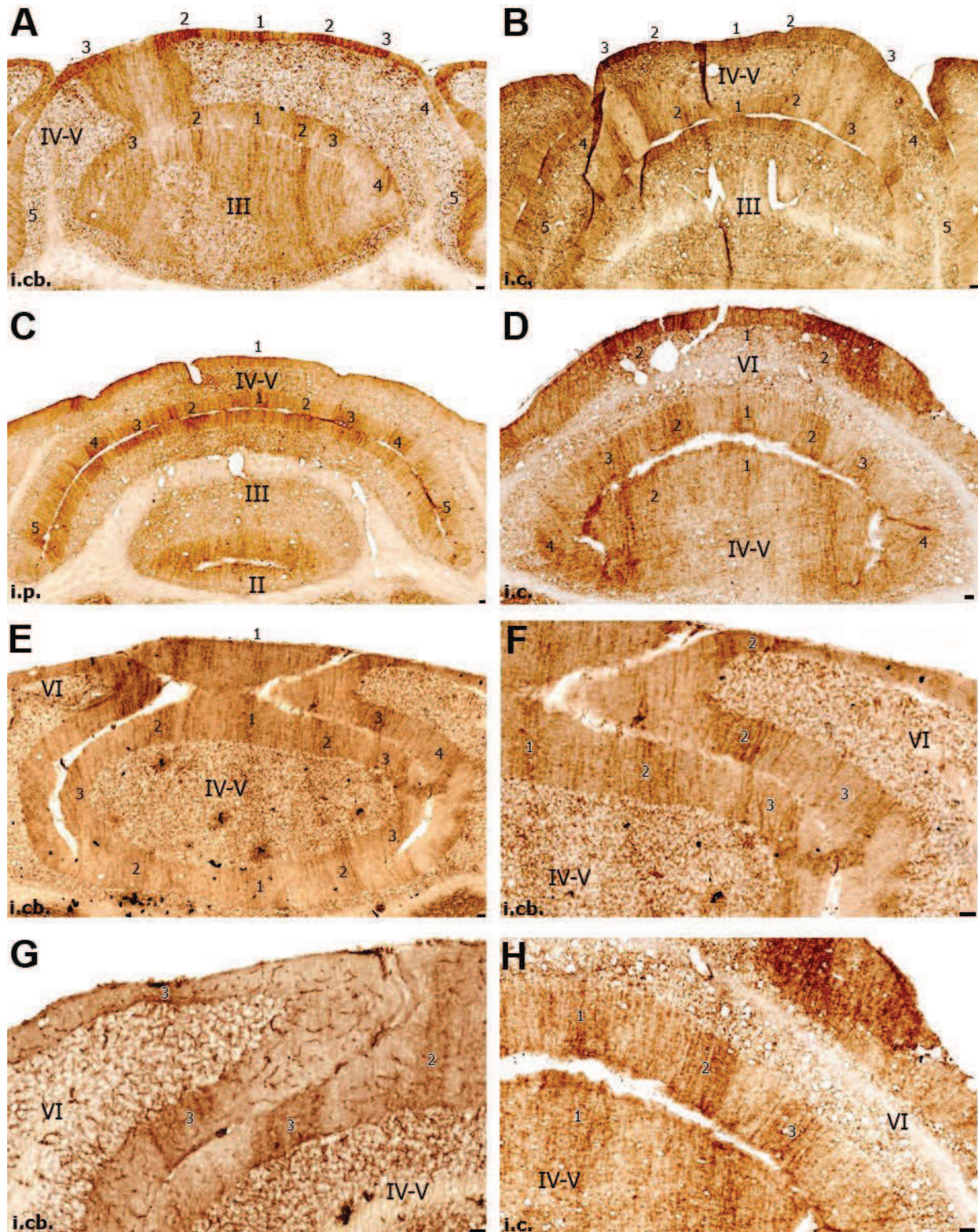
Une bande PrP<sup>22L</sup> médiane traverse les lobules III, IV-V, VI, VII, VIII, IX et X du vermis. (**Figures 37, 38, 39**). Trois à quatre bandes latérales traversent les lobules III, IV-V et VI du vermis (**Figure 40**) et les bandes les plus médianes se prolongent dans les lobules VII, VIII, IX et X (**Figure 41**). La troisième bande latérale traverse le lobule simple des hémisphères et les lobules III, IV-V et VI du vermis de part et d'autre de la fissure préculminale (**Figure 40A-C**) puis de la fissure primaire (**Figure 40D-H**). La quatrième bande latérale traverse le lobule simple et les lobules IV-V de part et d'autre de la fissure primaire, ainsi que crus 1, crus 2 (**Figure 42A, B**), le lobule paramédian et la copula pyramidis (**Figure 42C, D**), à travers les fissures inter-cruciale, la fissure ansoparamédiane et la fissure prépyramidale. Ces fissures sont aussi traversées par la cinquième bande latérale dans crus1, le lobule simple, crus 2, le lobule paramédian ((**Figure 42A, B ; Figure 43**) et la copula pyramidis (**Figures 42C, D**). La sixième bande latérale traverse crus1, crus2, le lobule paramédian et la copula pyramidis (**Figures 42, 43**). Une septième bande latérale occupe l'apex de crus2 et du lobule paramédian (**Figure 43**).

### 3. Topographie des dépôts de PrP<sup>6PB1</sup> aux stades cliniques

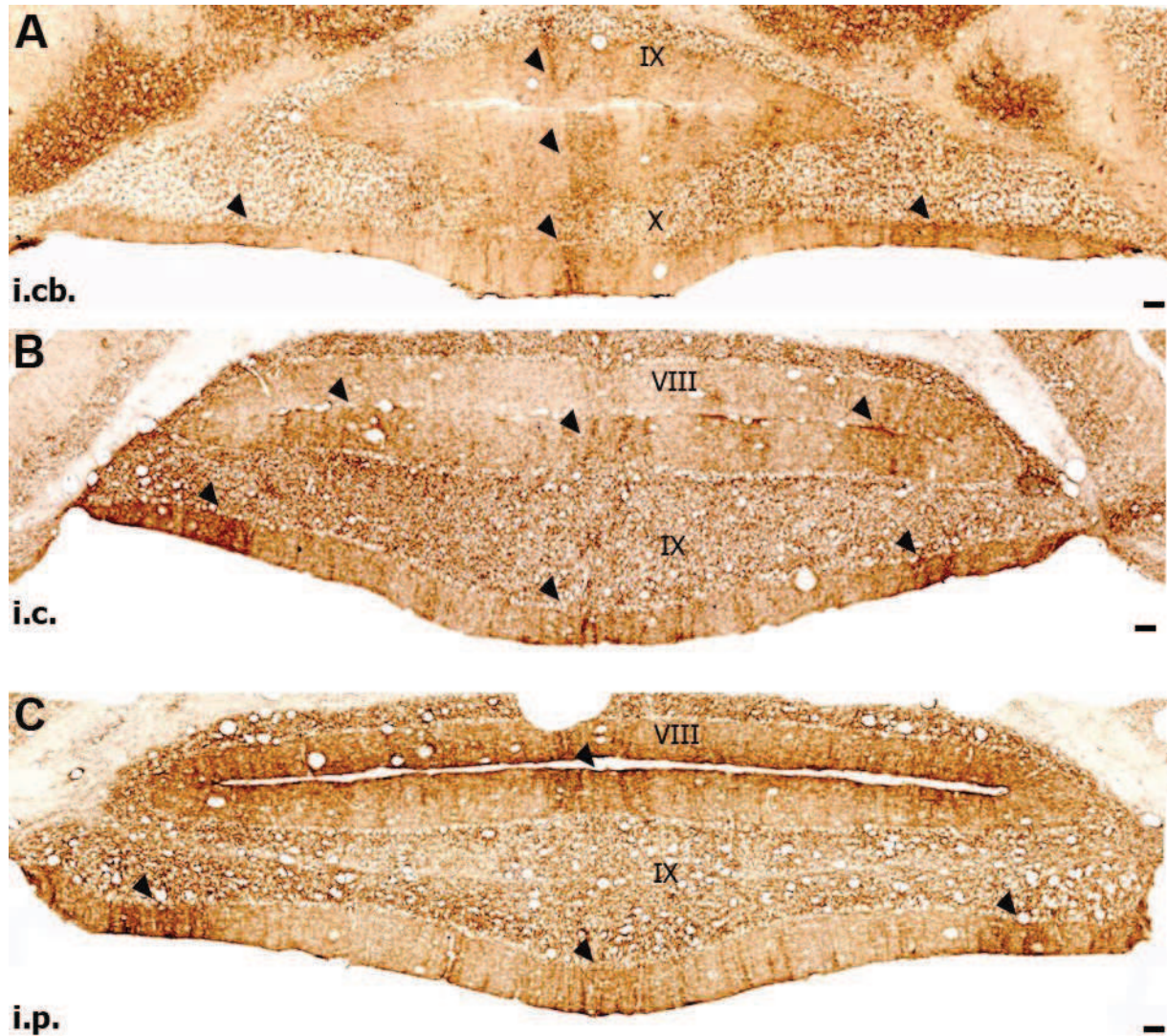
Dans le cervelet de souris infectées par 6PB1 i.c., les noyaux profonds du cervelet sont envahis par PrP<sup>6PB1</sup> qui forme des dépôts granuleux autour des neurones aux stades cliniques 155-188 jpi, (**Figure 44A,B**). Dans le cortex cérébelleux au même stade de l'ESB murine, la couche granulaire contient des dépôts protéiformes et des petites plaques de PrP<sup>6PB1</sup> (**Figure 44C, D, E**). Des plaques de PrP<sup>22L</sup> sont également présentes dans la couche des cellules de Purkinje (**Fig. 44C, D**) et dans la couche moléculaire (**Figure 44C, D, F**).

### 4. Comparaison des patrons d'accumulation de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4

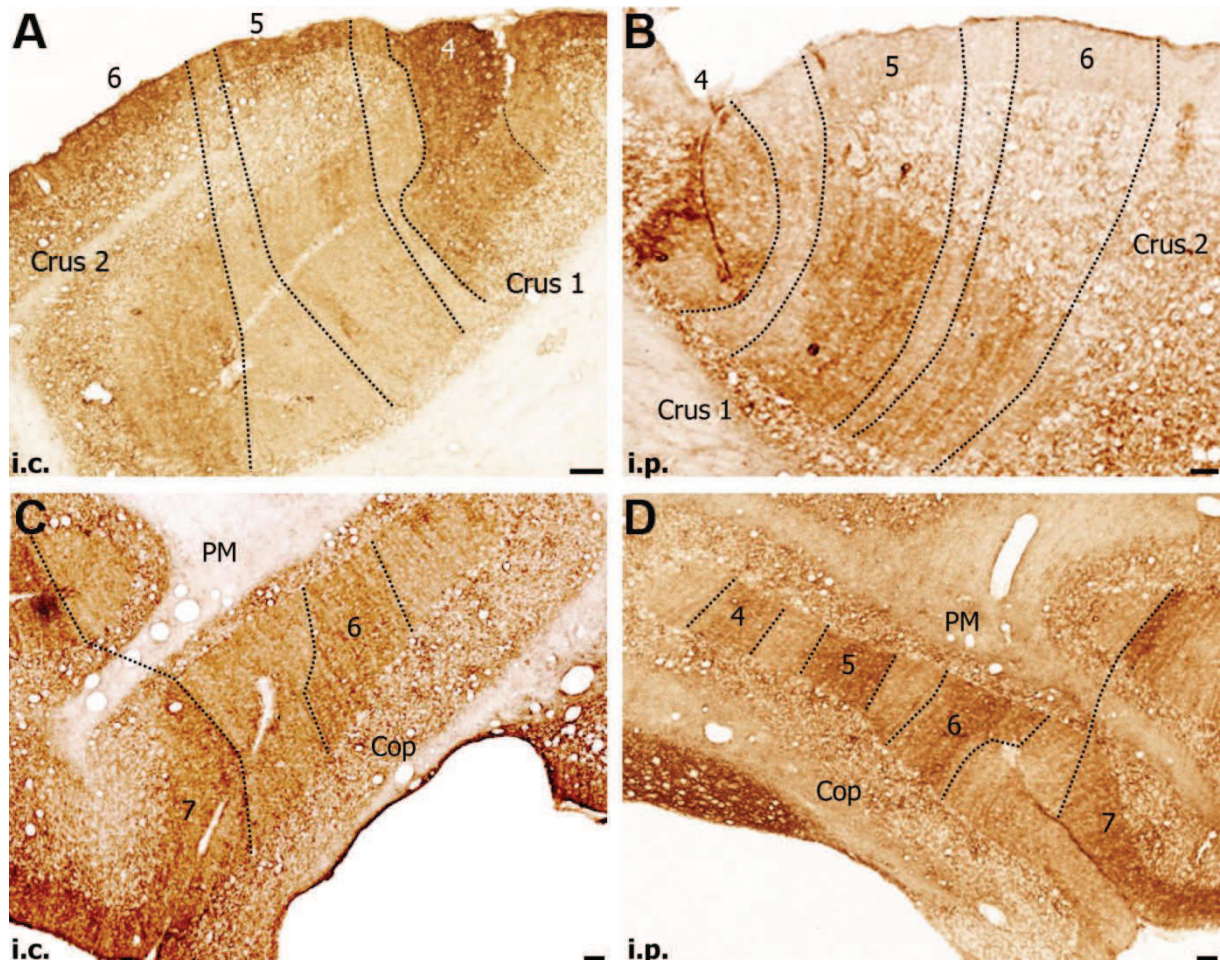
Le patron d'accumulation de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux rappelle le patron d'expression des zébrines ZII (aldolase C) et EAAT4 dans les cellules de Purkinje ([Ahn et al, 1994](#) ; [Sugihara & Quy, 2007](#)). J'ai comparé le patron de PrP<sup>22L</sup> au patron d'expression d'EAAT4 et recherché l'éventuelle correspondance des deux patrons dans le cervelet des souris EAAT4-eGFP infectées par 22L i.c. (**Figures 45, 46, 47**) et i.p. (**Figure 48**) et dont les cellules de Purkinje exprimant EAAT4 (EAAT4(+)) sont visualisées par la fluorescence d'eGFP et les cellules de Purkinje EAAT4(-) par l'immunofluorescence de CaBP.



**Figure 40.** Immunoperoxidase de PrP<sup>221</sup> aux niveaux antérieur (A-C) et médian (D-H) au stade clinique 134-203 jpi après inoculation intracérébelleuse (i.cb., A, E-G), intracérébrale (i.c., B, D, H) et intrapéritonéale (i.p., C). A-E. Une bande médiane (1) flanquée de 2 à 3 bandes latérales (2, 3, 4) reproduisent un patron similaire à travers le cortex des lobules VI, V-IV et III du vermis cérébelleux. F-H. Détail des bandes latérales 2 et 3. Echelle = 50 µm.

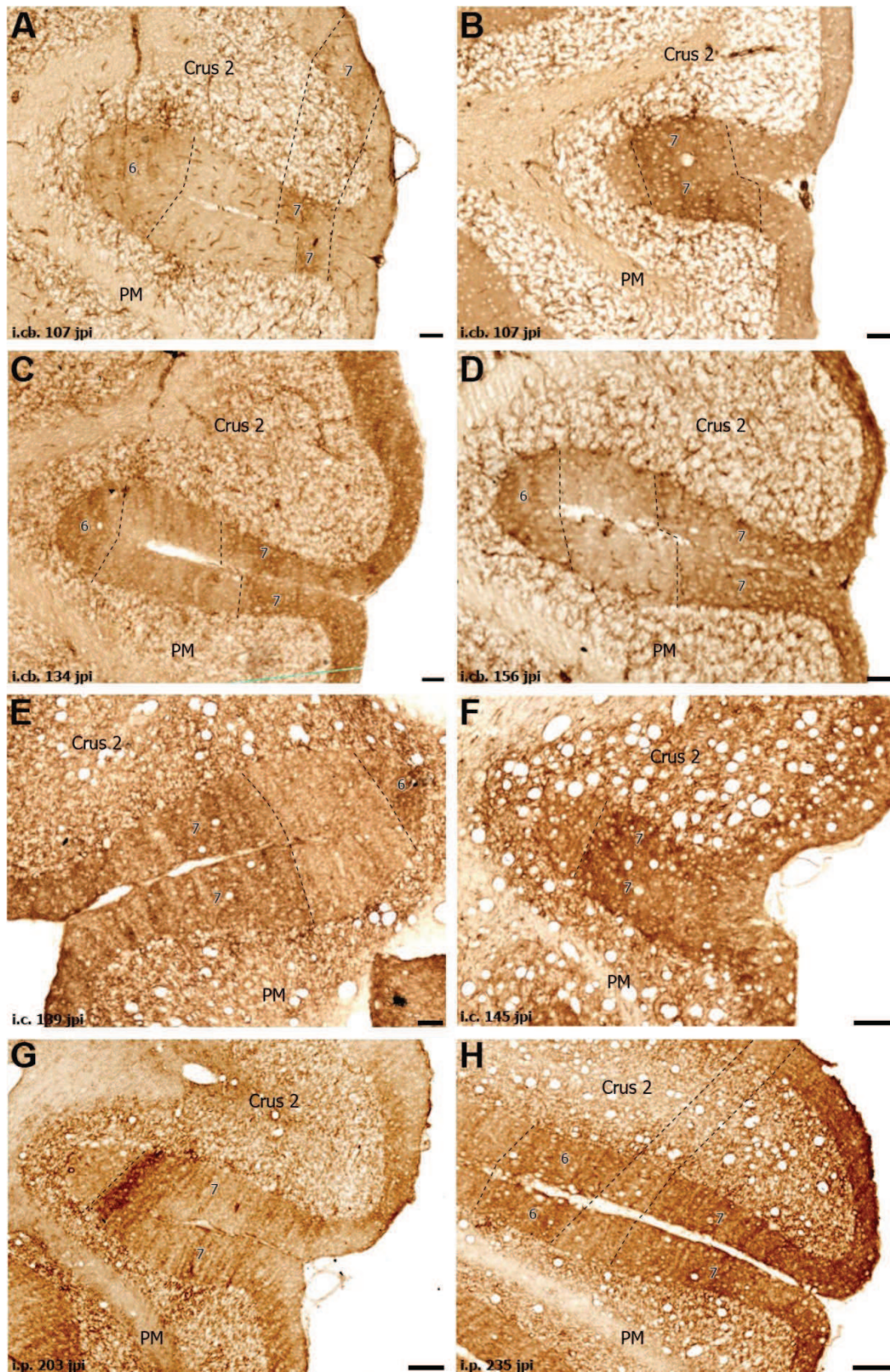


**Figure 41. Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex des lobules VIII à X au stade clinique après inoculation i.cb. (134 jpi, A), i.c. (139 jpi, B) et i.p. (235 jpi, C). Une bande médiane et deux latérales d'immunoréactivité de PrP<sup>22L</sup> (têtes de flèches) forment un patron reproductible dans les trois lobules. Echelle = 50  $\mu$ m.**

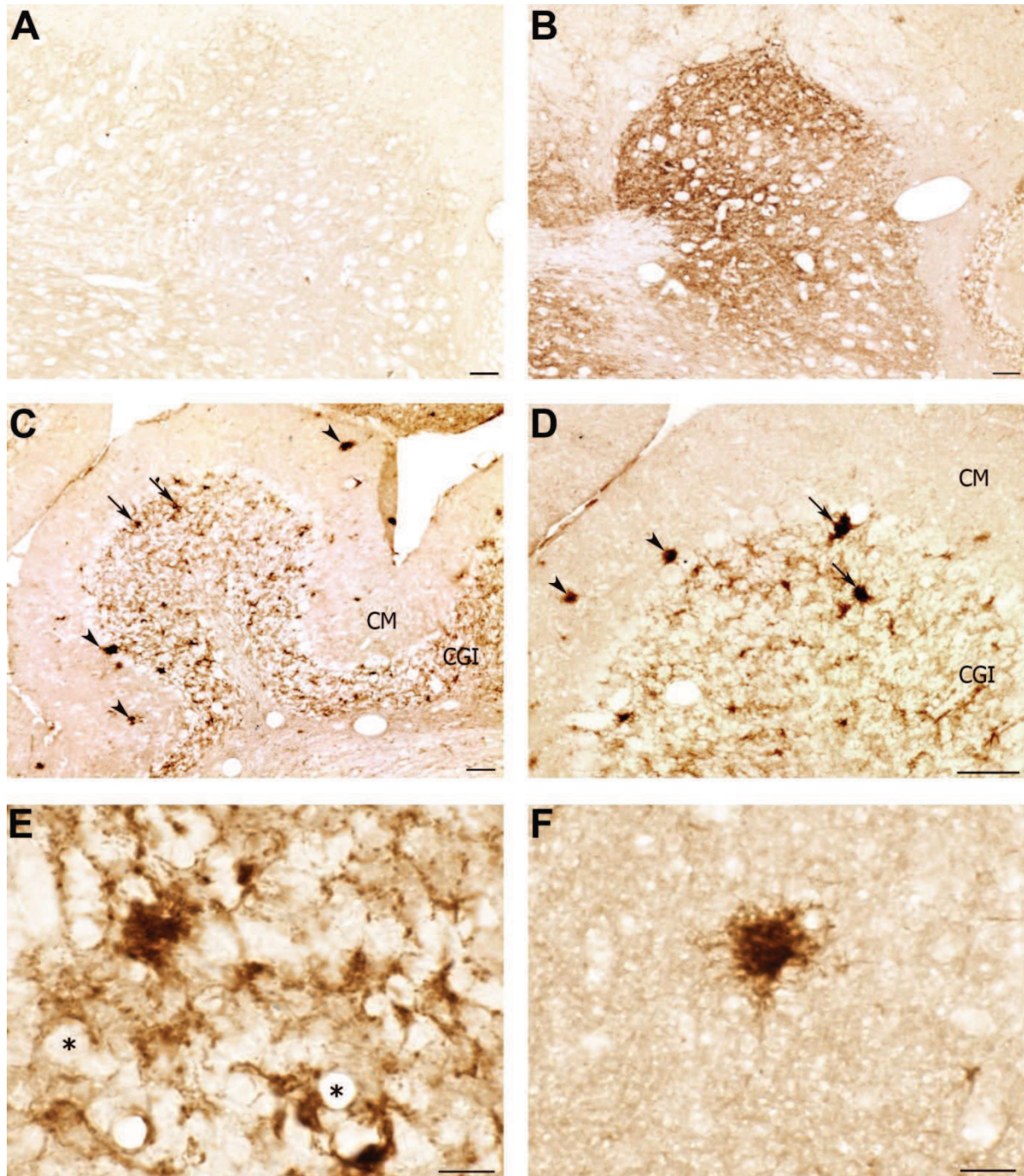


**Figure 42.** Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex de crus 1, crus 2 (A-B), du lobule paramédian (PM) et copula pyramidis (Cop) (C-D) au niveau médian du cervelet au stade clinique après inoculation intracérébrale (i.c., A, C) et intrapéritonéale (i.p., B, D). A-B. Trois bandes (4, 5, 6) traversent crus 1 et crus 2. C-D. Deux à quatre bandes (4 à 7) traversent PM et Cop. Echelle = 50 μm.





**Figure 43. Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex des lobules crus 2 et paramédian (PM) aux stades préclinique 107 jpi (A, B) et cliniques 134-235 jpi (C-H) après inoculation intracérébelleuse (i.cb.), intracérébrale (i.c.) et intrapéritonéale (i.p.).** Les dépôts de PrP<sup>22L</sup> présentent le même patron dans cette région aux stades préclinique (A-B) et clinique après inoculation i.cb. (C-D), au stade clinique après inoculation i.c. (E-F) et au stade clinique après inoculation i.p. (G-H). Les pointillés délimitent les bandes 6 et 7 de PrP<sup>22L</sup>. Echelle = 50 µm.

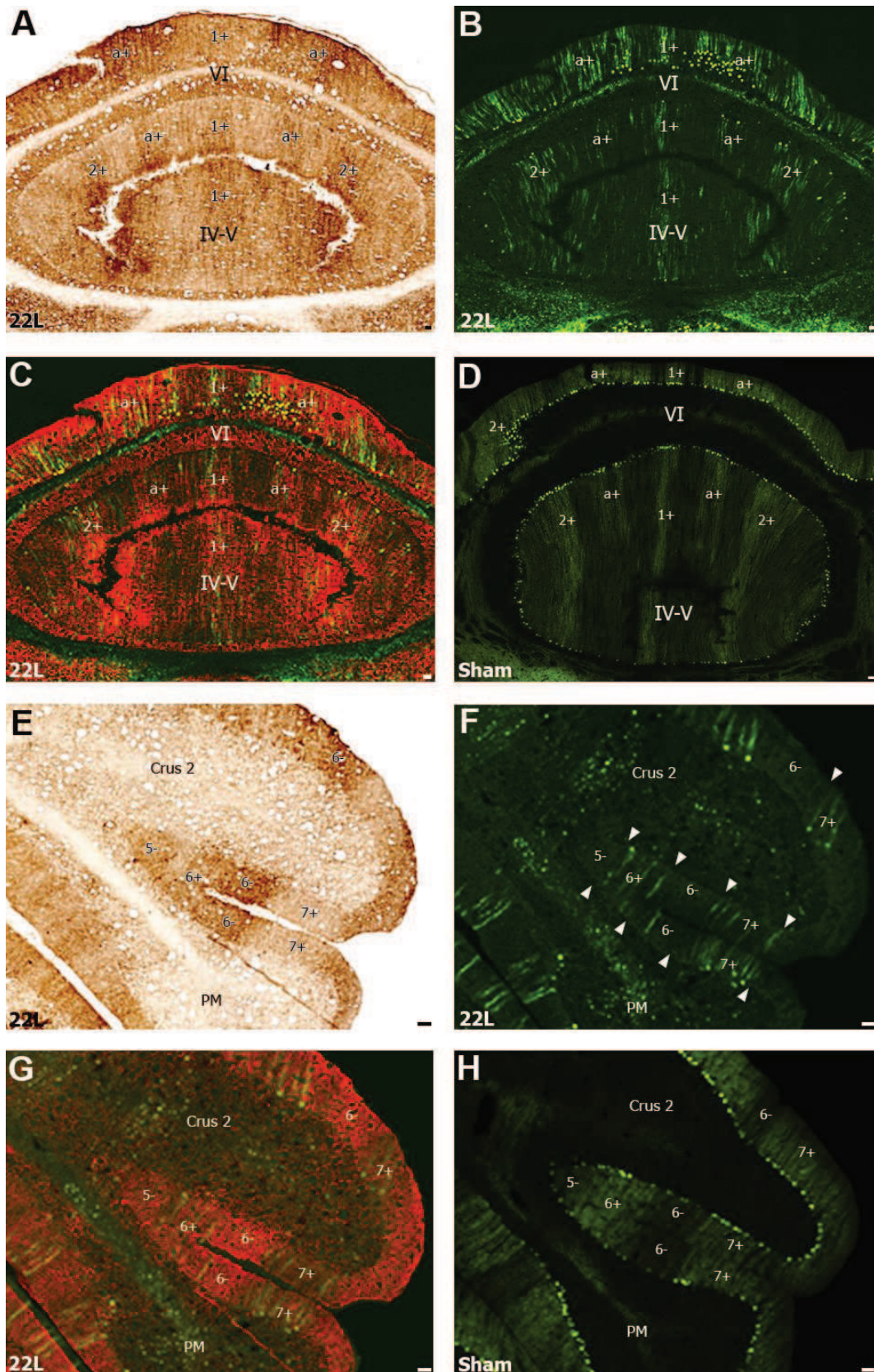


**Figure 44. Immunoperoxidase de PrP<sup>6PB1</sup> dans les noyaux profonds et le cortex du cervelet non-infecté (A) et infecté par 6PB1 i.c. au stade clinique (B-F).** B. PrP<sup>6PB1</sup> forme des dépôts granuleux entre les neurones dans le noyau denté. C-F. PrP<sup>6PB1</sup> forme des dépôts protéiformes entre les cellules granulaires et de petites plaques dans la couche granulaire (CGI, flèches, C, D, E) qui présente des vacuoles de spongieuse (\*). Des plaques de PrP<sup>6PB1</sup> sont visibles dans la couche des cellules de Purkinje et dans la couche moléculaire (CM, têtes de flèche, C, D, F) du cervelet. L'immunoréactivité de PrP<sup>6PB1</sup> est plus intense dans la CGI. Echelle = 50 µm (A-D) et 10 µm (E, F).

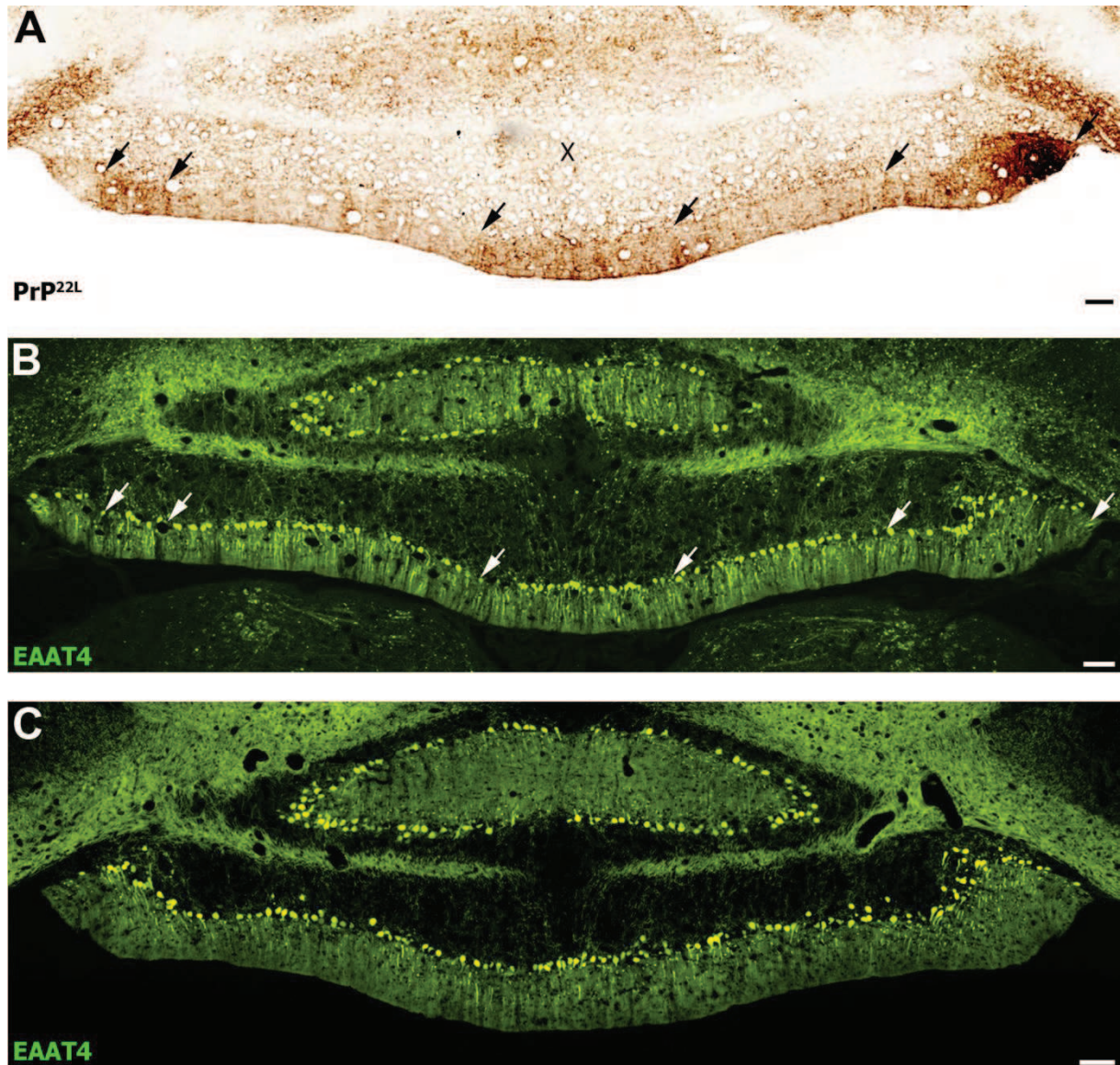
Dans le cervelet inoculé par voie i.c. au stade clinique 139-145 jpi, la bande médiane et les 4 à 5 bandes latérales de déposition de PrP<sup>22L</sup> de part et d'autre de la ligne médiane recouvrent parfaitement les bandes d'expression d'EAAT4 1(+), a(+), 2(+), 3(+) et 4(+) des lobules III, IV, V, VI, VII et VIII du vermis, alors que l'immunoréactivité de PrP<sup>22L</sup> est faible dans les bandes EAAT4 1(-), a(-), 2(-) et 3(-) dans ces lobules (**Figure 45A-D**). Cependant, trois bandes de PrP<sup>22L</sup> sont visibles dans les lobules IX et X (**Figure 46**) suggérant que PrP<sup>22L</sup> peut se former dans des régions comme les lobules IX et X occupées presque exclusivement de cellules de Purkinje EAAT4(+). Dans les hémisphères, la correspondance des patrons de déposition de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 est moins évidente au niveau médian du fait de la perte de nombreuses cellules de Purkinje EAAT4(-) et EAAT4(+) dans les bandes 4, 5 et 6 (**Figure 47A-C**). Dans le cervelet postérieur à l'inverse de la correspondance observée dans le vermis (**Figure 45A-D**), les 4 à 5 bandes de PrP<sup>22L</sup> qui traversent crus 2, le lobule paramédian et la copula pyramidis dans les hémisphères correspondent aux bandes EAAT4(-) 4(-), 5(-) et 6(-), les bandes sans PrP<sup>22L</sup> coïncidant avec les bandes EAAT4 5(+) et 6(+) dans ces lobules (**Fig. 45 E-H**). La correspondance des deux patrons est moins nette dans le cervelet médian qui a subi une perte importante de cellules de Purkinje dans crus 2, le lobule paramédian et la copula pyramidis (**non-montrées**).

Dans le cervelet inoculé par voie i.p. au stade clinique 203-235 jpi, PrP<sup>22L</sup> forme des bandes coïncidant avec les bandes EAAT4 1(-), a(-) et 2(-) dans les lobules IV, V et VI du vermis antérieur (**Figure 48A-D**) à l'inverse de la correspondance observée avec les bandes EAAT4(+) dans le vermis des souris inoculées i.c. (**Figure 45A-D**). Comme dans le cervelet des souris inoculées i.c. (**Figure 46**), trois bandes de PrP<sup>22L</sup> se sont formées dans les lobules IX et X qui sont composés en majorité de cellules de Purkinje EAAT4(+) (**non montrées**). A l'inverse de la correspondance observée dans le vermis des mêmes souris (**Figure 48A-D**) et de la correspondance observée dans les hémisphères des souris inoculées i.c. (**Figure 45E-H**), dans les hémisphères des souris inoculées i.p., les bandes de PrP<sup>22L</sup> coïncident avec les bandes 5(+), 5a(+) et 6(+) dans crus 2, le lobule paramédian et la copula pyramidis (**Fig. 48E-H**). Comme dans le cervelet médian des souris inoculées i.p., la correspondance des patrons de PrP<sup>22L</sup> et d'EAAT4 est moins précise dans crus 2, le lobule paramédian et la copula pyramidis (**Figure 47D-F**).

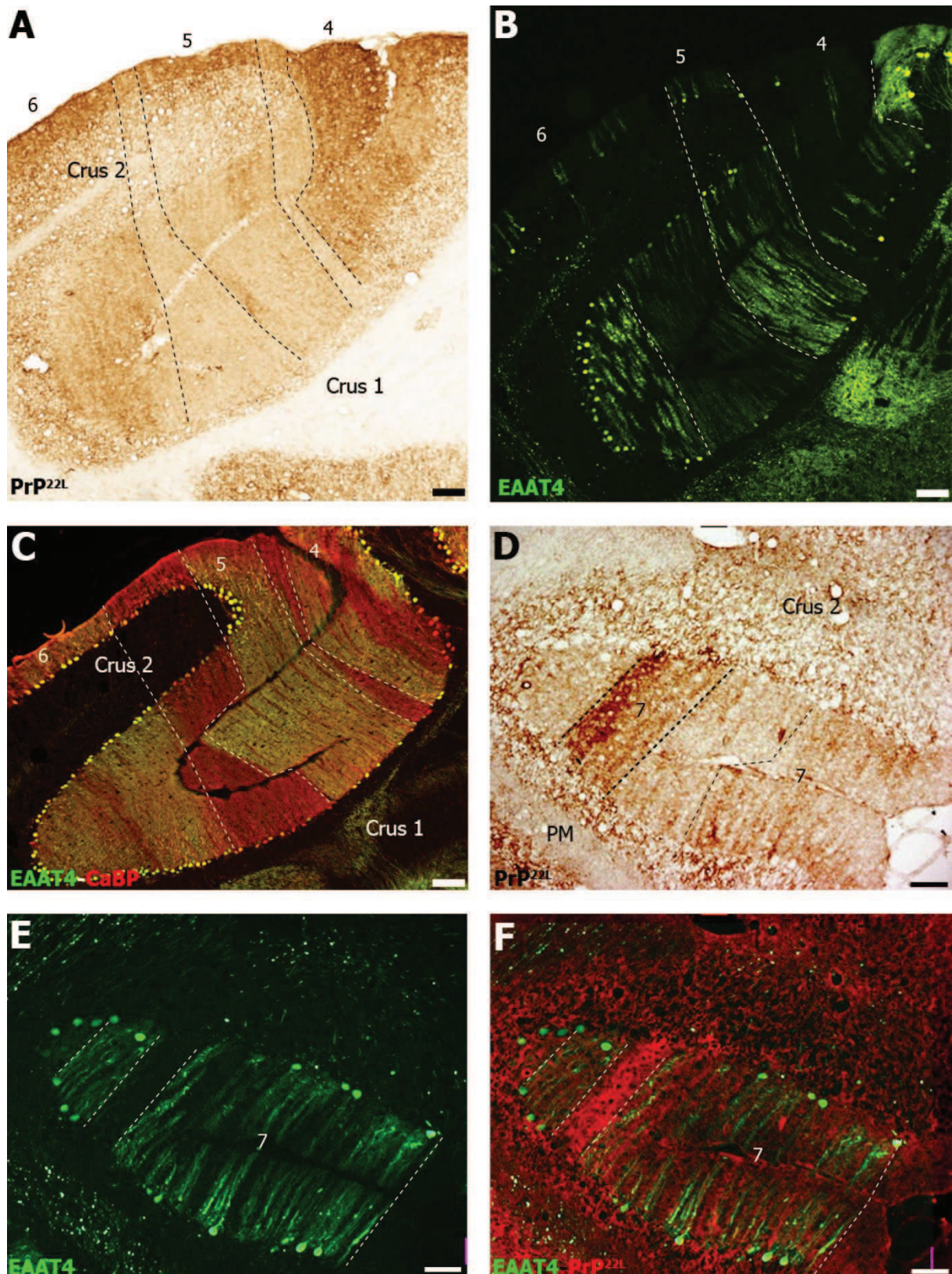
En résumé, l'accumulation de PrP<sup>22L</sup> forme des bandes parasagittales dont la distribution suit un patron identique ou inverse de celui de l'expression de la zébrine EAAT4 dans le vermis et les hémisphères du cervelet des souris infectées par 22L inoculée i.c. et i.p. En effet, les bandes de PrP<sup>22L</sup> coïncident avec les bandes EAAT4(+) dans le vermis et avec les bandes EAAT4(-) dans les hémisphères des souris inoculées i.c. et cette correspondance est inversée dans le vermis et les hémisphères des souris inoculées i.p. Dans certains lobules du vermis, des bandes de PrP<sup>22L</sup> sont formées dans des régions qui ne présentent pas de compartimentation définie par l'expression d'EAAT4.



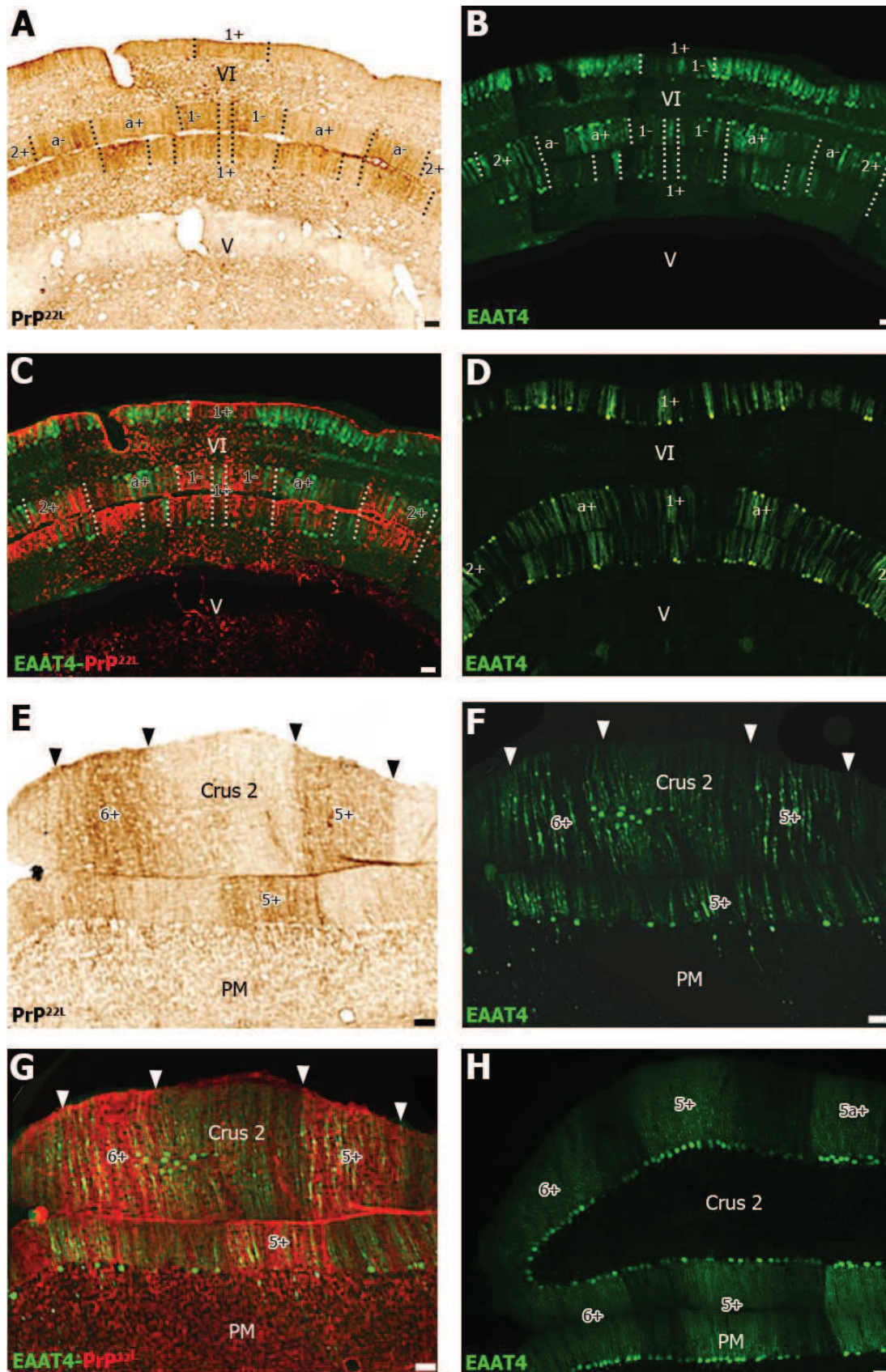
**Figure 45.** Patterns des dépôts de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 aux niveaux médian (bregma -6,64 mm, Paxinos & Franklin, 2001 ; A-D) et postérieur (bregma -7,20 mm ; E-H) dans le cervelet infecté par 22L i.c. au stade clinique 145 jpi. **A, E.** Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup>. PM, lobule paramédian. **B, F.** Fluorescence d'EAAT4-eGFP dans le cervelet infecté par 22L. **C, G.** Superposition de **A, B** et **E, F** respectivement. **D, H.** EAAT4-eGFP dans le cervelet de souris non-infectées au niveau des régions (**A-C**) et (**C-G**) montrées dans le cervelet infecté. Echelle = 50 μm.



**Figure 46. Patron des dépôts de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 dans le lobule X du cervelet infecté par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi. A.** Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup>. **B.** Fluorescence d'EAAT4-eGFP dans le lobule X du cervelet infecté par 22L. Trois bandes de PrP<sup>22L</sup> se forment dans le lobule X dont les cellules de Purkinje sont EAAT4-positives. **C.** EAAT4-eGFP dans le cervelet non-infecté au niveau des régions **A**, **B** montrées dans le cervelet infecté. Echelle = 50  $\mu$ m.



**Figure 47. Patron des dépôts de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 au niveau médian (bregma -6,64 mm, Paxinos & Franklin, 2001) du cervelet infecté par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi (A, B), non infecté (C) et infecté par 22L i.p. au stade clinique 203 jpi (D-F). A, D. Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup>. B, E. Fluorescence d'EAAT4-eGFP dans le cervelet infecté par 22L. PM, lobule paramédian. C. Fluorescence d'EAAT4 (vert) et immunofluorescence de CaBP (rouge) dans le cervelet non-infecté dans les régions A et B montrées dans le cervelet infecté. F. Superposition de D (rouge artificiel) et E (vert). Echelle = 50  $\mu$ m.**



**Figure 48. Patron des dépôts de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 aux niveaux antérieur (bregma -5,68 mm, Paxinos & Franklin, 2001) et postérieur (bregma -7,32 mm) du cervelet infecté par 22L i.p. au stade clinique 203 jpi. A, E. Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup>. PM, lobule paramédian. B, F. Fluorescence d'EAAT4-eGFP dans le cervelet infecté par 22L. C, G. Superposition de A, B et E, F respectivement. D, H. EAAT4-eGFP dans le cervelet non-infecté au niveau des régions (A-C) et (E-G) montrées dans le cervelet infecté. Echelle = 50 µm.**

## 5. La tremblante 22L provoque la mort des cellules de Purkinje dans le cervelet de souris

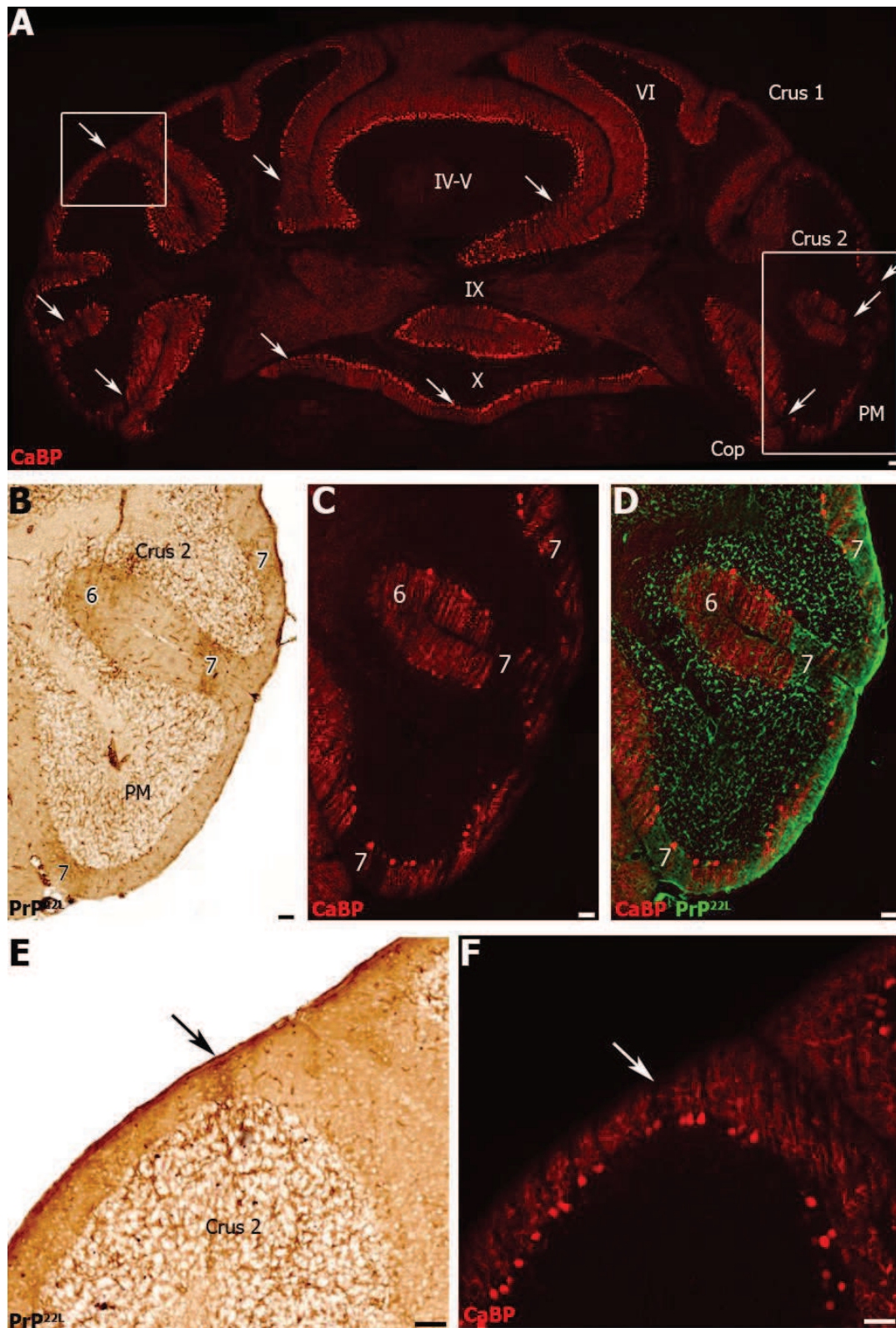
Le simple marquage des cellules de Purkinje par immunofluorescence de CaBP montre que la neurotoxicité de 22L i.cb. dans le cervelet de souris a des effets visibles dès le stade préclinique 107 jpi. A ce stade, le cervelet présente des pertes visibles dans crus 1, crus 2 et le lobule paramédian des hémisphères et le lobule X vermal (**Figure 49A**). Le double immunomarquage de CaBP et de PrP<sup>22L</sup> montre que les zones dépourvues de cellules de Purkinje correspondent aux bandes d'accumulation importante de PrP<sup>22L</sup> (**Figures 49B-D, 49E-F**).

La perte en cellules de Purkinje s'aggrave dans le cervelet des souris inoculées par 22L aux stades cliniques 134-139 jpi (i.c.b. : **Figures 49, 52** ; i.c. : **Figures 50A-D**) et 153 jpi (i.c. **Figure 50E-H**). La perte neuronale est totale dans les bandes à forte immunoréactivité PrP<sup>22L</sup> et partielle dans les régions à immunoréactivité PrP<sup>22L</sup> modérée où l'on distingue des travées immunoréactives plus espacées que dans les bandes à forte immunoréactivité. Les cellules de Purkinje ont quasiment toutes survécu dans les régions à faible immunoréactivité PrP<sup>22L</sup> (**Figure 50**). A ce stade dans les mêmes conditions d'infection, le degré de perte en cellules de Purkinje est très différent d'un animal à l'autre témoignant d'une grande variabilité inter-individuelle des effets neurotoxiques de 22L dans le cervelet murin (**Figure 51**).

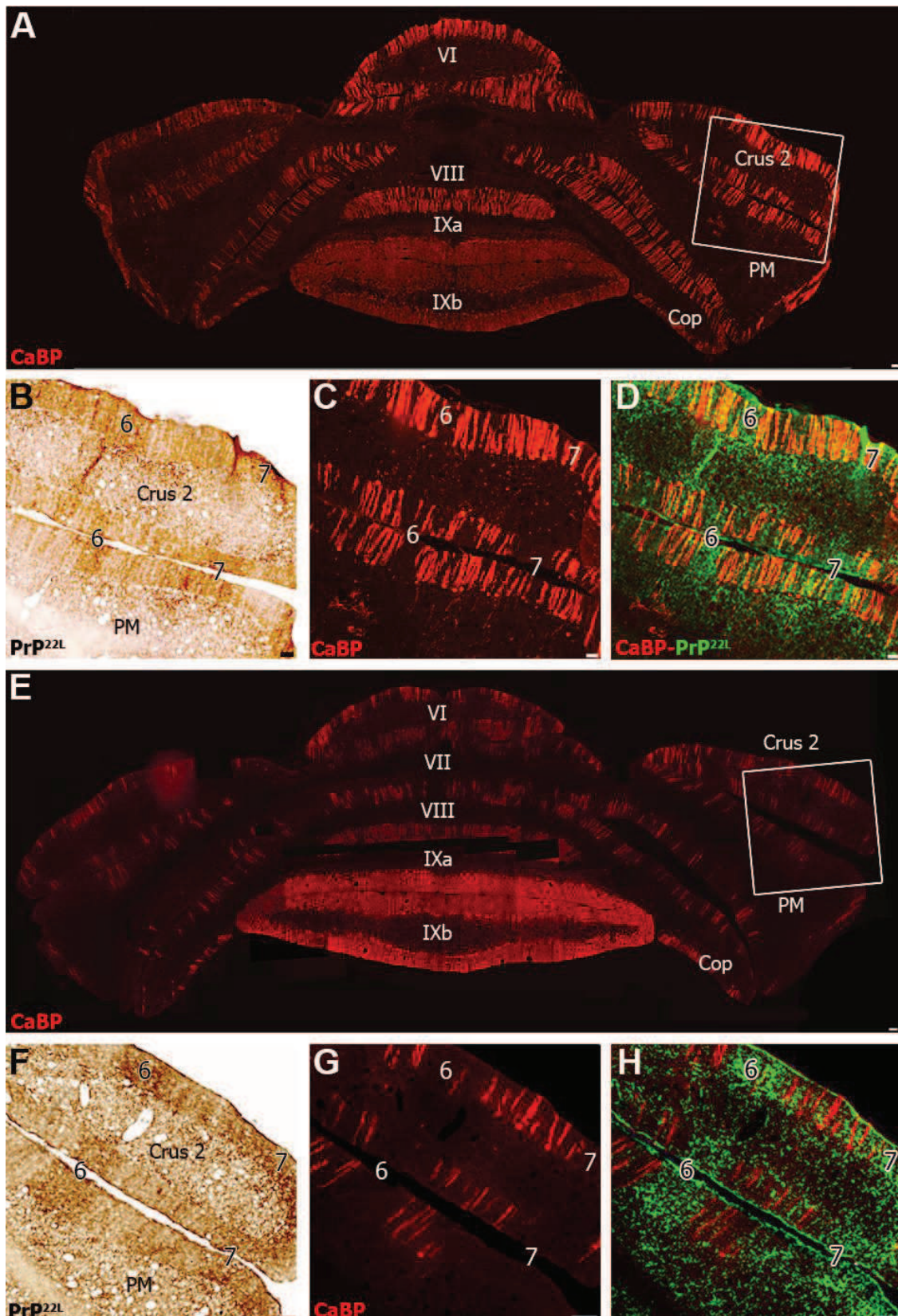
Afin de caractériser les effets neurotoxiques de PrP<sup>22L</sup> sur la survie des cellules de Purkinje, j'ai estimé avec V. Demais, le nombre de cellules de Purkinje immunofluorescentes pour CaBP dans des coupes transversales aux niveaux antérieur, médian et postérieur du cervelet de souris infectées par 22L aux stades cliniques de la tremblante i.cb. (105-124 jp, **Figure 53A**), i.c. (139-153 jpi, **Figure 53B**), et i.p. (189-223 jpi, **Figure 53C**). A ces stades, la perte des cellules de Purkinje est significative dans le cervelet des souris infectées par 22L i.cb. (44,3%,  $p = 0,001$ ), ic. (56,4%,  $p = 0,01$ ) et i.p. (46,1%,  $p = 0,002$ ) par rapport au cervelet non-infecté (sham) (**Figure 53D**). Les hémisphères présentent une perte significativement plus importante (70%) que le vermis (37%,  $p = 0,013$ ) dans le cervelet des souris inoculées par voie i.c., alors que la perte est plus importante dans le vermis (72%) que dans les hémisphères (26%,  $p = 0,001$ ) chez les souris inoculées par voie i.p. (**Figure 53E**).

Dans le cervelet inoculé par voie i.c., la perte des cellules de Purkinje est significative dans les lobules I (61% de perte,  $p = 0,002$ ), IV-V (45%,  $p = 0,018$ ) et VI (43%,  $p = 0,035$ ) du vermis et dans les lobules simple (61%,  $p = 0,003$ ), crus 2 (82%,  $p < 0,001$ ), paramédian (87%,  $p < 0,001$ ) et copula pyramidis (83%,  $p < 0,001$ ) des hémisphères. En revanche, la perte de cellules de Purkinje n'est pas significative dans les lobules II (36%,  $p = 0,159$ ), III (52%,  $p = 0,07$ ), IX (4%,  $p = 0,653$ ) et X (0%,  $p = 0,243$ ) du vermis, ni dans crus 1 (32%,  $p = 0,187$ ) des hémisphères (**Figure 51F**). Ces résultats indiquent que des populations de cellules de Purkinje situées dans des lobules spécifiques résistent à la neurotoxicité de 22L.

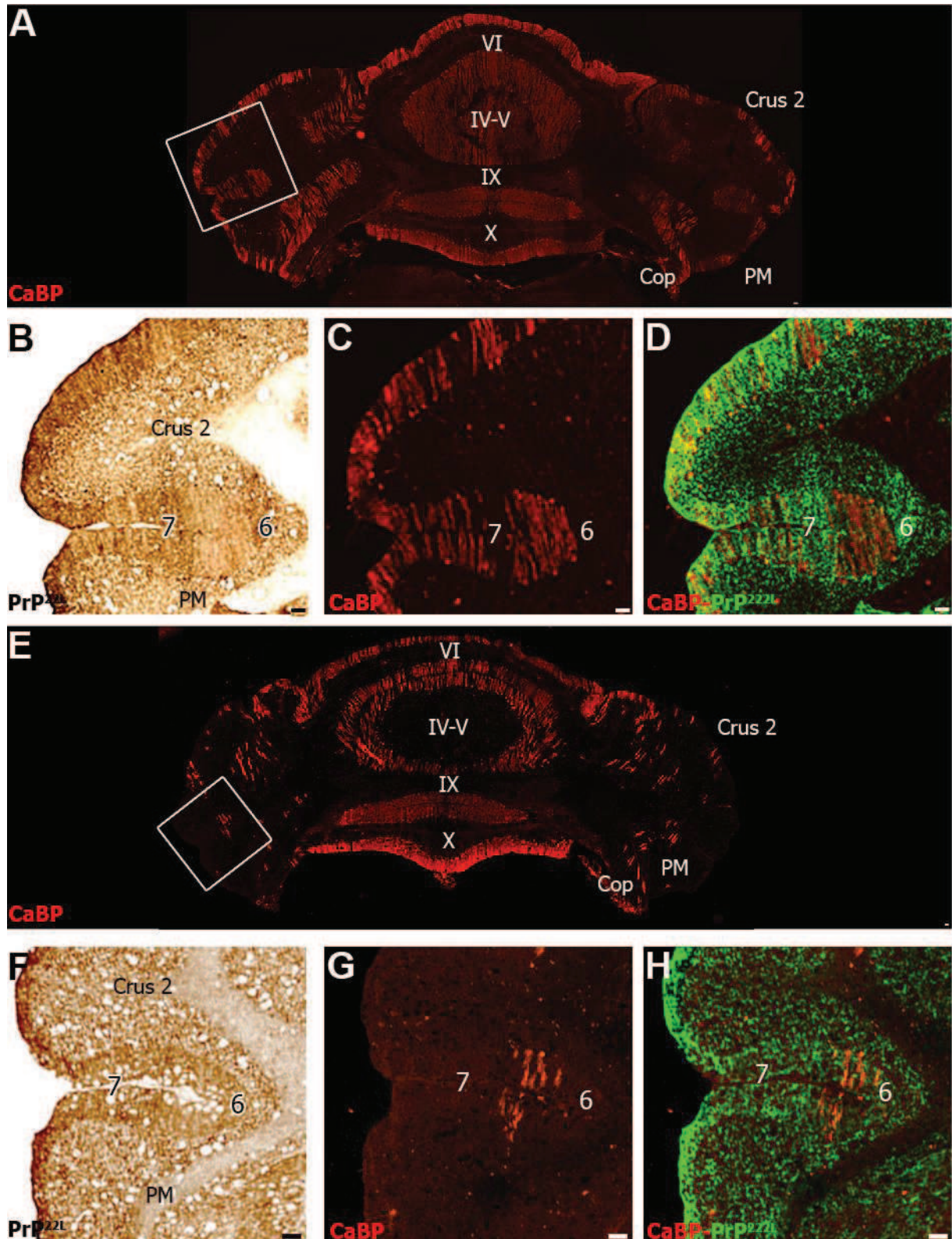




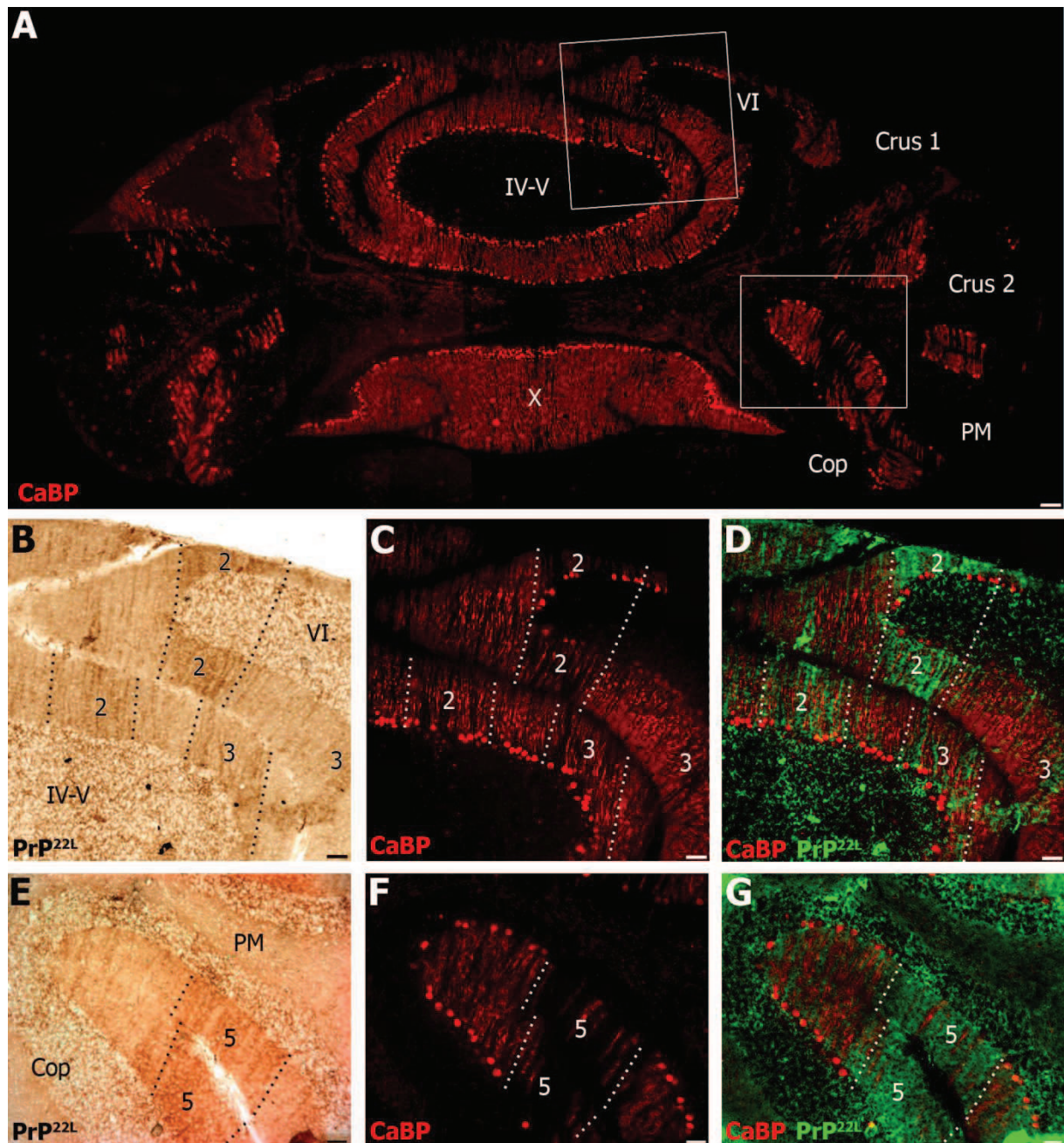
**Figure 49. Cervelet infecté par 22L i.cb. au stade préclinique 107 jpi. A.** Immunofluorescence de CaBP dans les cellules de Purkinje (CPs). Coupe transversale dans le cervelet médian (bregma -6,64 mm, Paxinos & Franklin, 2001). PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis. Les flèches montrent les zones de perte neuronale. **B, C, D.** Agrandissement de **A**. **B.** Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup>. Deux bandes de dépôt de PrP<sup>22L</sup> (6, 7) traversent crus 2-PM et correspondent à une perte marquée de CPs immunofluorescentes (**C, D**). **D.** Le marquage immunoperoxidase (**B**) est artificiellement visualisé en vert pour la superposition avec l'immunofluorescence rouge de CaBP. **E, F.** Agrandissements de **A**. Une fine bande de dépôt de PrP<sup>22L</sup> (flèche) correspond à une perte visible de CPs immunofluorescentes dans l'apex du crus 2a. Echelle = 50 µm.



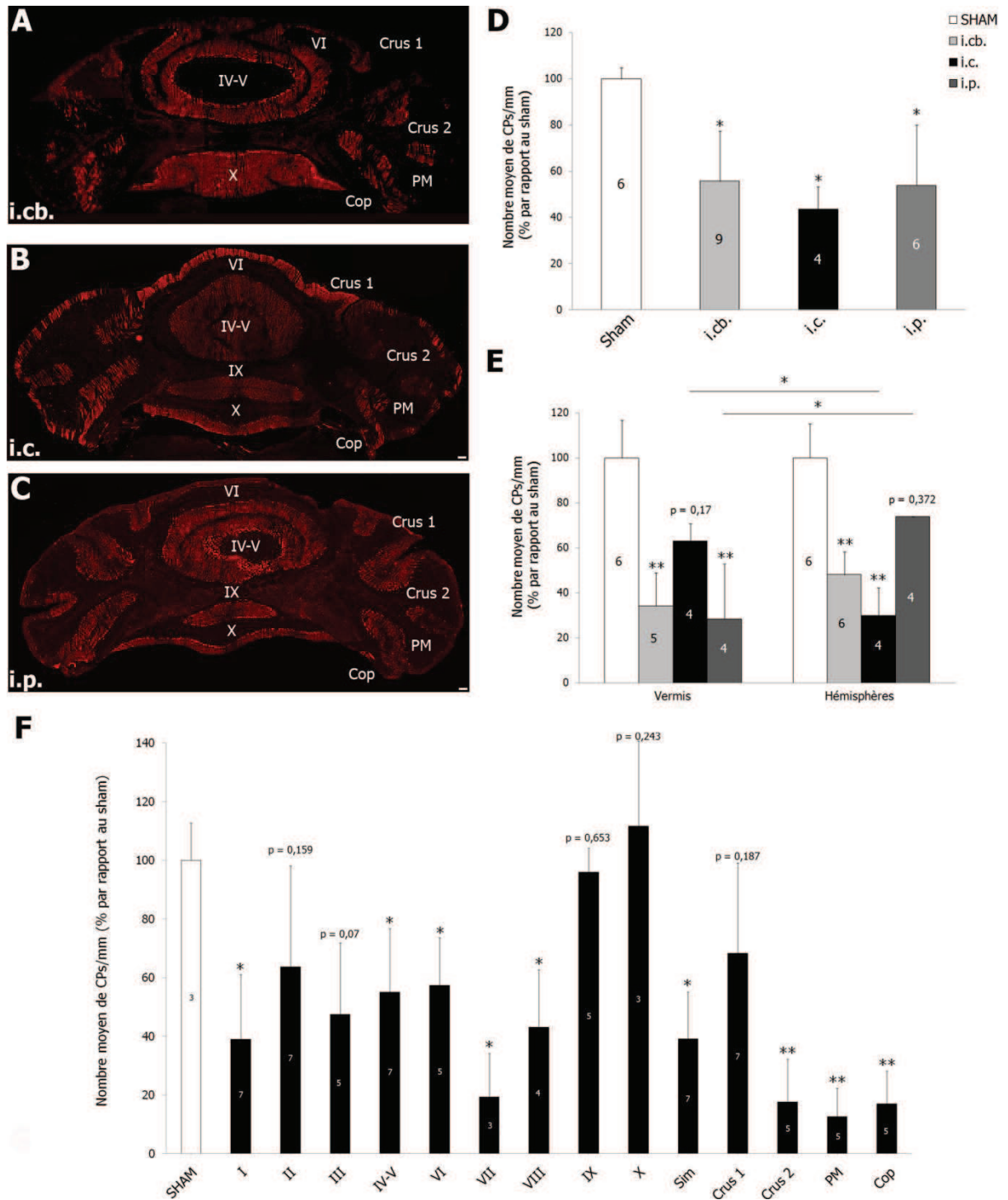
**Figure 50. Cervelet infecté par 22L i.c. aux stades cliniques 139 (A) et 153 jpi (E).** A, E. Coupes transversales dans le cervelet postérieur (bregma -7,20 mm, Paxinos & Franklin, 2001). PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis. B, C, D. et F, G, H. Agrandissements respectifs de A et E. B, F. Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup>. Les bandes de dépôt de PrP<sup>22L</sup> (6, 7) qui traversent crus 2-PM présentent les pertes neuronales les plus marquées révélées en immunofluorescence pour CaBP (C, G). Noter la perte neuronale plus importante dans le cervelet de l'animal au stade clinique le plus tardif (E-H). D, H. Superposition de B, C et G, H. Echelle = 50  $\mu$ m.



**Figure 51. Cervelet infecté par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi. A, E.** Coupes transversales dans le cervelet médian (bregma -6,72 mm, Paxinos & Franklin, 2001). **B, C, D** et **F, G, H.** Agrandissements respectifs de **A** et **E**. **B, F.** Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup>. Les bandes de PrP<sup>22L</sup> (6, 7) qui traversent crus 2-PM ne sont plus visibles dans la même région, complètement envahie par la déposition amyloïde chez un autre animal au même stade clinique de la maladie (**F**). Les dépôts de PrP<sup>22L</sup> correspondent aux zones de perte de cellules de Purkinje immunofluorescentes (CaBP, **C, D, G, H**). La perte neuronale plus importante dans le cervelet **E** au même stade que **A** montre la variabilité inter-individuelle dans la progression des effets neurotoxiques des prions. Echelle = 50  $\mu$ m.



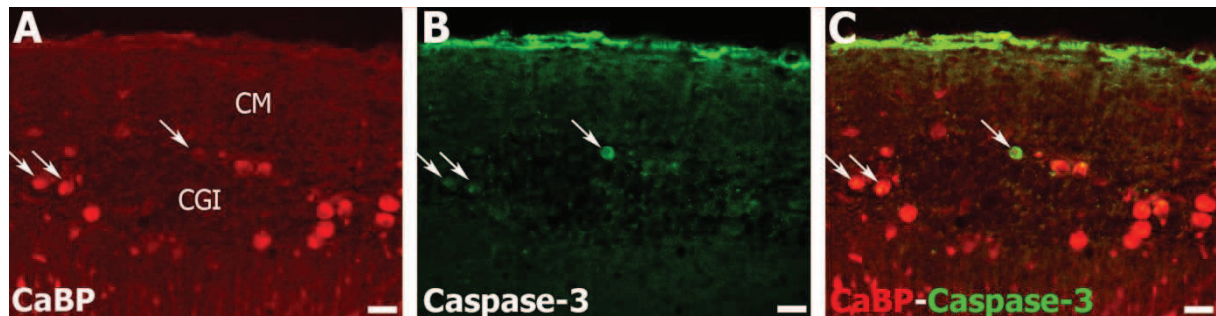
**Figure 52. Cervelet infecté par 22L i.cb. au stade clinique 134 jpi. A.** Coupe transversale dans le cervelet médian (-6,64 mm, Paxinos & Franklin, 2001). **B-G.** Agrandissements de **A** au niveau des lobules IV-V-VI (**B-D**) et Cop-PM (**E-G**). Les bandes de PrP<sup>22L</sup> (2, 3, pointillés) qui traversent les lobules IV-V-VI (**B**) et la bande de PrP<sup>22L</sup> (5, pointillés) qui traverse Cop-PM (**E**) correspondent à des pertes de cellules de Purkinje immunofluorescentes (CaBP, **C-D, F-G**). Echelle = 50 µm.



**Figure 53. Survie des cellules de Purkinje (CPs) dans le cervelet infecté par 22L au stade clinique 105-223 jpi. A-C.** Immunofluorescence de CaBP dans les CPs du cervelet médian (bregma -6,64 à -6,72 mm, Paxinos & Franklin, 2001) de souris infectées par 22L i.cb. (A), i.c. (B) et i.p. (C) au stade clinique 134 (A), 139 (B) et 193 jpi (C). Echelle = 50 µm. **D.** Densités linéaires des CPs dans le cervelet infecté par 22L. **E.** Comparaison des densités linéaires des CPs dans le vermis et les hémisphères cérébelleux des souris infectées par 22L. **F.** Densité linéaire des CPs dans les lobules cérébelleux de souris infectées i.c. aux stades cliniques 127-153 jpi. **D-F.** \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,001. Les nombres d'animaux sont indiqués dans les barres. PM, lobule paramédian ; Cop, copula pyramidis ; Sim, lobule simple.

## 6. La tremblante 22L provoque l'apoptose des cellules de Purkinje du cervelet de souris

Dans le cervelet des souris infecté par 22L, le marqueur apoptotique caspase-3 active est détecté par double immunofluorescence avec CaBP dans le soma des cellules de Purkinje (**Figure 54**).



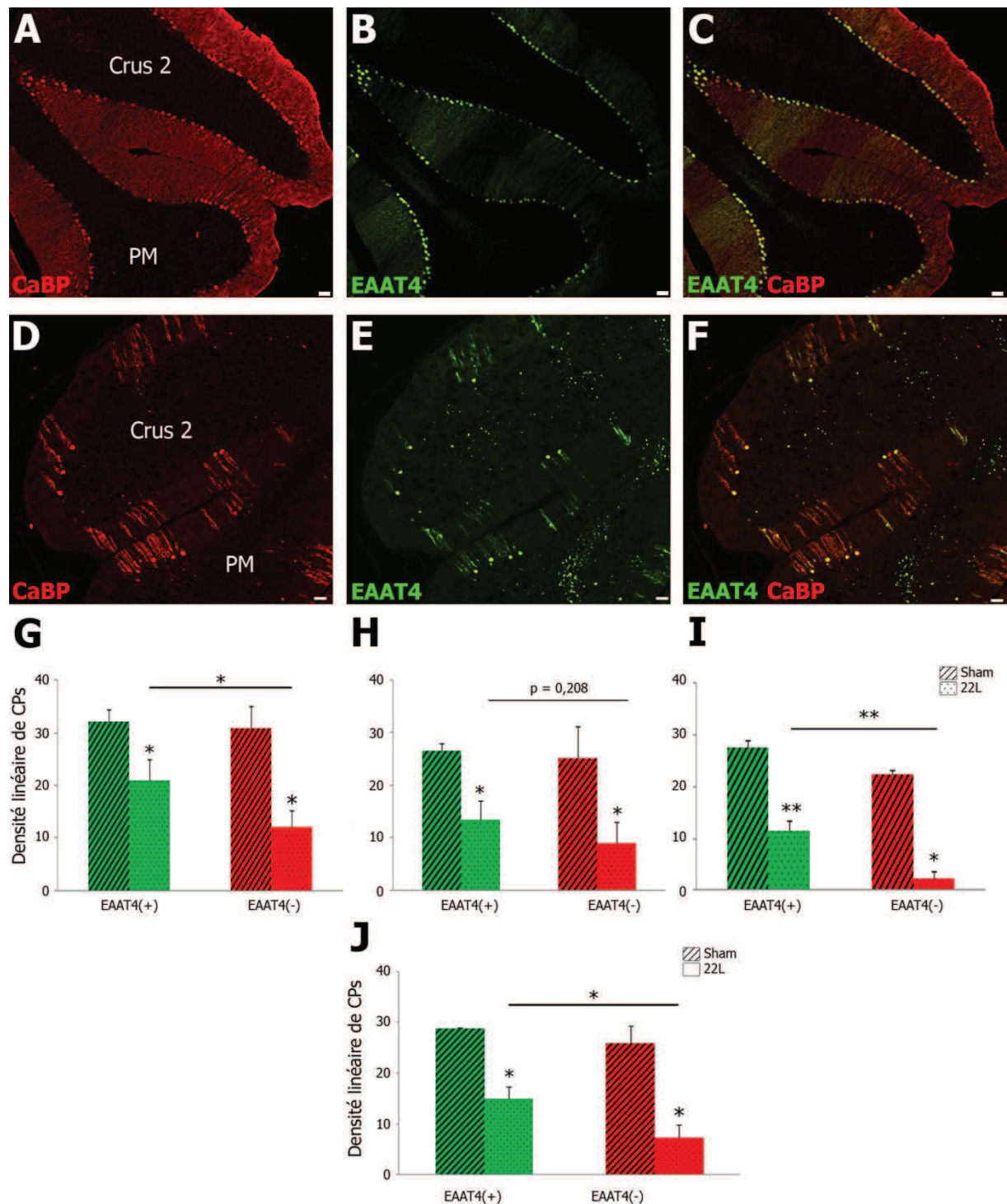
**Figure 54. Double marquage en immunofluorescence pour CaBP et caspase-3 active des cellules de Purkinje (CPs) dans le cortex cérébelleux de souris infectée par 22L i.cb. au stade clinique 134 jpi.** **A.** Immunofluorescence de CaBP dans les CPs (flèches). CM, couche moléculaire ; CGI, couche granulaire interne. **B.** Immunofluorescence de caspase-3 active dans les CPs (flèches). **C.** Superposition de **A** et **B**. Les flèches montrent les somas des CPs immunofluorescentes pour CaBP et caspase-3 active. Echelle = 50  $\mu$ m.

## 7. Les cellules de Purkinje EAAT4(+) sont plus sensibles à la neurotoxicité de 22L

L'analyse quantitative des sous-populations de cellules de Purkinje EAAT4(+) et EAAT4(-) a été effectuée aux niveaux antérieur, médian et postérieur du cervelet de souris EAAT4-eGFP infectées par 22L i.c. aux stades cliniques 139-145 jpi après marquage des cellules de Purkinje en immunohistofluorescence pour CaBP. Les cellules de Purkinje EAAT4(+) apparaissent ainsi doublement marquées alors que les cellules de Purkinje EAAT4(-) ne sont visibles que par l'immunofluorescence de CaBP (**Figure 55A-F**).

Le cervelet des souris infectées présente une perte significative de cellules de Purkinje EAAT4(+) et EAAT4(-) aux niveaux antérieur (EAAT4(+) :  $20,9 \pm 4,1$  CPs/mm,  $p = 0,036$  ; EAAT4(-) :  $12,0 \pm 3,4$  CPs/mm,  $p = 0,001$ ), médian (EAAT4(+) :  $13,3 \pm 3,6$  CPs/mm,  $p = 0,001$  ; EAAT4(-) :  $8,9 \pm 4,0$  CPs/mm,  $p = 0,009$ ) et postérieur (EAAT4(+) :  $11,6 \pm 1,8$  CPs/mm ; EAAT4(-) :  $2,3 \pm 1,5$  CPs/mm,  $p < 0,001$ , **Figure 55G-I**).

La densité de cellules de Purkinje EAAT4(+) est significativement supérieure (52%) à la densité des cellules de Purkinje EAAT4(-) (25%,  $p = 0,008$ , **Figure 55J**), au niveau antérieur (EAAT4(+) : 65% et EAAT4(-) : 39%,  $p = 0,01$ ) et postérieur (EAAT4(+) : 42% et EAAT4(-) : 10%,  $p < 0,001$ ), mais les densités de cellules de Purkinje EAAT4(+) et EAAT4(-) ne diffèrent pas significativement au niveau médian (EAAT4(+) : 50% et EAAT4(-) : 36%,  $p = 0,208$  ; **Figure 55G-I**).



**Figure 55. Analyse quantitative des cellules de Purkinje dans le cervelet de souris infectées par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi.** **A-F.** Immunofluorescence de CaBP et fluorescence d'eGFP (CPs EAAT4(+)) dans le cervelet d'une souris non-infectée (**A-C**) et d'une souris infectée (**D-F**). **C, F.** Superpositions de **A, B** et **D, E** respectivement. Noter la perte importante des CPs EAAT4(-) dans les lobules crus 2 et paramédian du cervelet infecté où seules des CPs doublement marquées (jaunes) ont survécu. Echelle = 50  $\mu$ m. **G-I.** Densité linéaire des CPs EAAT4(+) et EAAT4(-) aux niveaux antérieur (**G**), médian (**H**) et postérieur (**I**) du cervelet infecté par 22L i.c. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$ . **J.** Densité linéaire des CPs EAAT4(+) et EAAT4(-) dans le cervelet infecté par 22L.

### 8. Les cellules granulaires sont sensibles à la neurotoxicité de la tremblante 22L

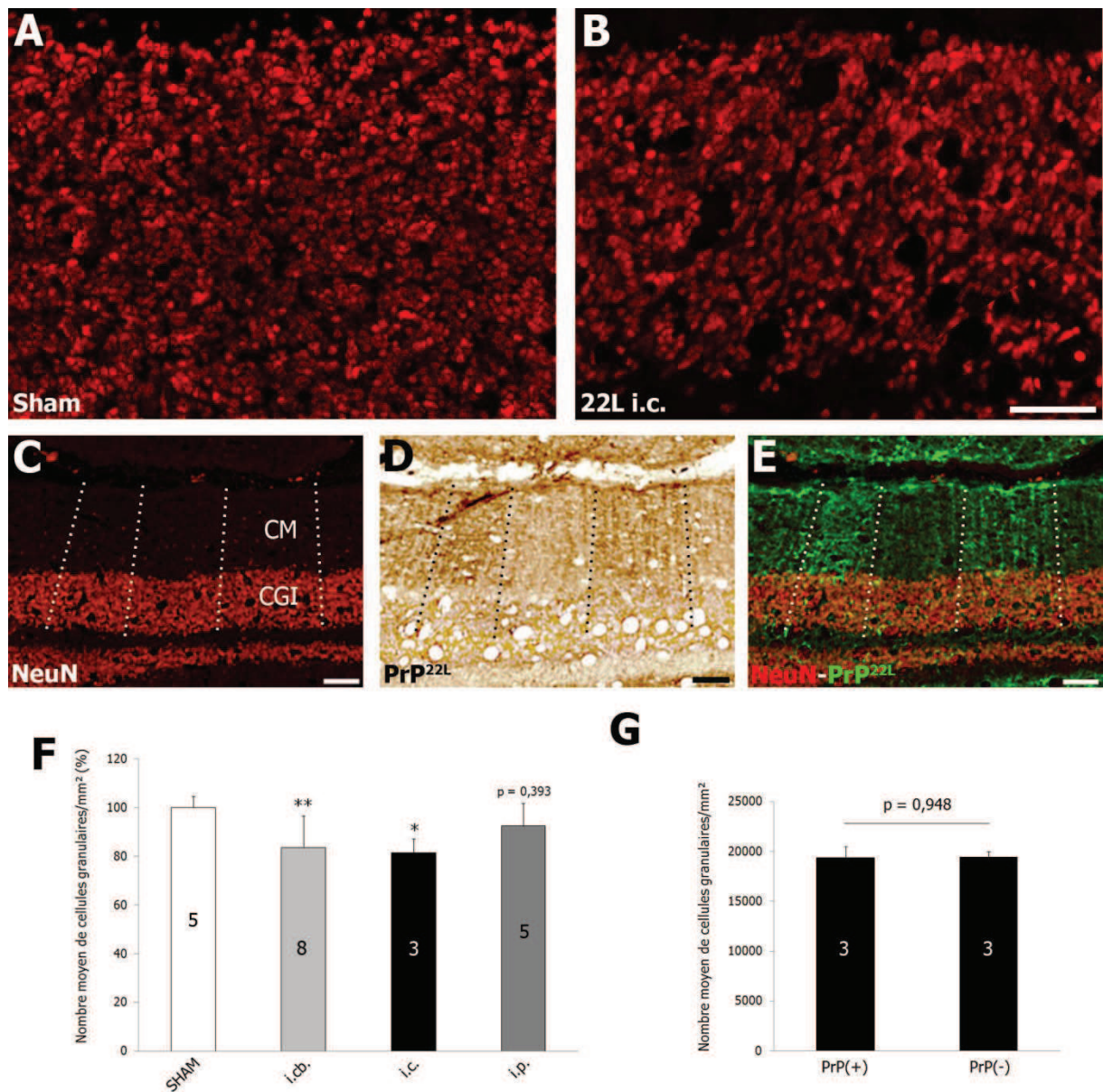
L'analyse des effets neurotoxiques de PrP<sup>22L</sup> sur les cellules granulaires a été réalisée par la quantification de ces neurones avec V. Demais dans le cervelet des souris infectées aux stades cliniques de la tremblante 22L i.c. (139-145 jpi) et i.cb. (105-124 jpi). Les cellules granulaires sont visualisées par marquage immunohistochimique de NeuN. La couche granulaire interne du cervelet des souris infectées par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi est atrophiée et présente un degré important de spongiose (**Figure 56A, B**). L'analyse quantitative montre une diminution significative de la densité des cellules granulaires dans le cervelet de souris infectées par 22L i.cb. ( $83,6\% \pm 13,1$ ,  $p < 0,001$ ) et i.c. (i.c.  $81,5\% \pm 5,7$ ,  $p = 0,042$ ), comparé à celle des souris non infectées (**Figure 56F**). Aucune différence significative n'est mesurée dans le cervelet des souris inoculées i.p. ( $92,4\% \pm 9,3$ ,  $p = 0,393$ ).

La topographie en bandes des dépôts de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux des souris infectées m'a conduit à rechercher une éventuelle variation de la densité des cellules granulaires en fonction de la topographie des bandes de PrP<sup>22L</sup> au stade clinique de la tremblante 22L i.c. (139-145 jpi) (**Figure 56C-E**). La densité des cellules granulaires au niveau des bandes de PrP<sup>22L</sup> ( $19\,337 \pm 1181$  cellules granulaires/mm<sup>2</sup>) ne diffère pas significativement de la densité des cellules granulaires situées dans les régions adjacentes à faible immunoréactivité de PrP<sup>22L</sup> ( $19\,403 \pm 594$  cellules granulaires/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,948$ ), (**Figure 56G**).

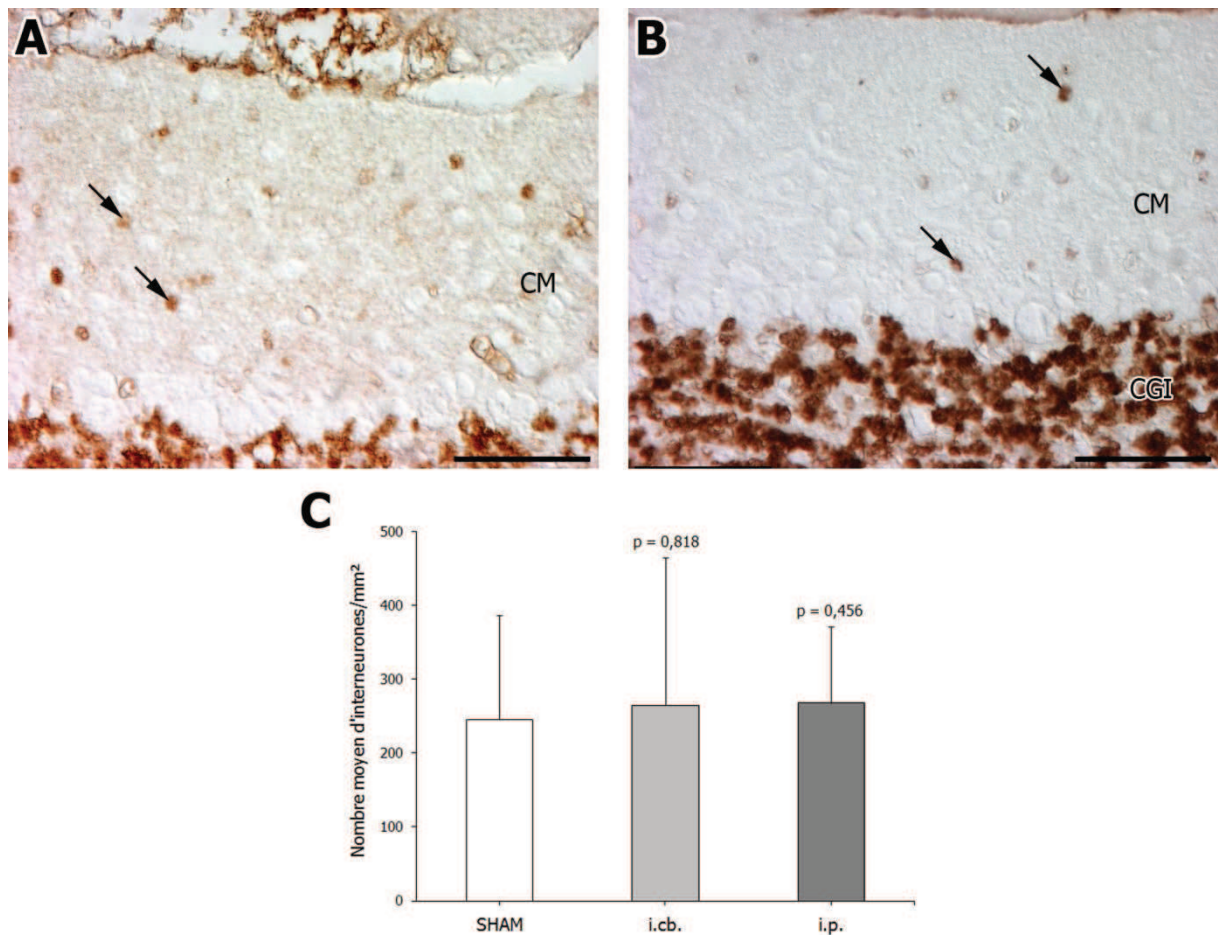
### 9. Les interneurones de la couche moléculaire du cortex cérébelleux résistent à la neurotoxicité de la tremblante 22L

Les effets neurotoxiques de PrP<sup>22L</sup> sur les interneurones de la couche moléculaire ont été analysés quantitativement avec V. Demais, dans le cervelet des souris aux stades cliniques de la tremblante 22L i.cb. (105-124 jpi) et i.p. (189-223 jpi). La densité des interneurones visualisés par immunoperoxydase de NeuN dans la couche moléculaire du cervelet de souris infectées par 22L i.cb. (**Figure 57B**) et i.p. ne diffère pas significativement de la densité des interneurones de la couche moléculaire du cervelet des souris non-infectées (**Figure 57A**, non-infectés :  $279,0 \pm 93,7$  interneurones/mm<sup>2</sup> ; i.cb. :  $300,5 \pm 98,7$  interneurones/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,818$  ; i.p. :  $368,5 \pm 61,4$  interneurones/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,456$ , **Figure 57C**).





**Figure 56. Analyse quantitative des cellules granulaires dans la couche granulaire interne (CGI) du cervelet infecté par 22L i.cb., i.c. et i.p. aux stades cliniques 105-223 jpi. A-C.** Immunohistofluorescence de NeuN dans les noyaux des CGs de la CGI du cortex cérébelleux d'une souris non-infectée (sham, **A**) et d'une souris infectée par 22L i.c. (**B, C**). Noter la moindre densité des CGs et l'atrophie de la CGI chez l'animal infecté. **D, E.** Une bande de dépôt de PrP<sup>22L</sup> (**D**) dans la couche moléculaire (CM) permet de délimiter la zone de comptage des CGs dans la CGI sous-jacente. **E.** Superposition de **C** et **D**. Echelle = 50  $\mu$ m. **F.** Analyse quantitative de la densité des CGs (en nombre de CGs/mm<sup>2</sup>) dans le cervelet sham et infecté par 22L. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$ . **G.** Analyse quantitative de la densité des CGs dans les bandes de PrP<sup>22L</sup> (PrP(+)) et dans des bandes voisines de faible immunoréactivité (PrP(-)).



**Figure 57. Analyse quantitative des interneurons dans la couche moléculaire (CM) du cervelet infecté par 22L i.cb. et i.p. aux stades cliniques 105-223 jpi. A, B.** Immunoperoxidase de NeuN dans la couche moléculaire du cervelet non-infecté (**A**) et infecté par 22L i.cb. au stade clinique 107 jpi (**B**). Seuls les noyaux des interneurons sont immunoréactifs pour NeuN (flèches). Echelle = 50 μm. **C.** Densité des interneurons dans la CM du cervelet de souris infectées par 22L i.c. et i.p. aux stades cliniques 105-223 jpi.

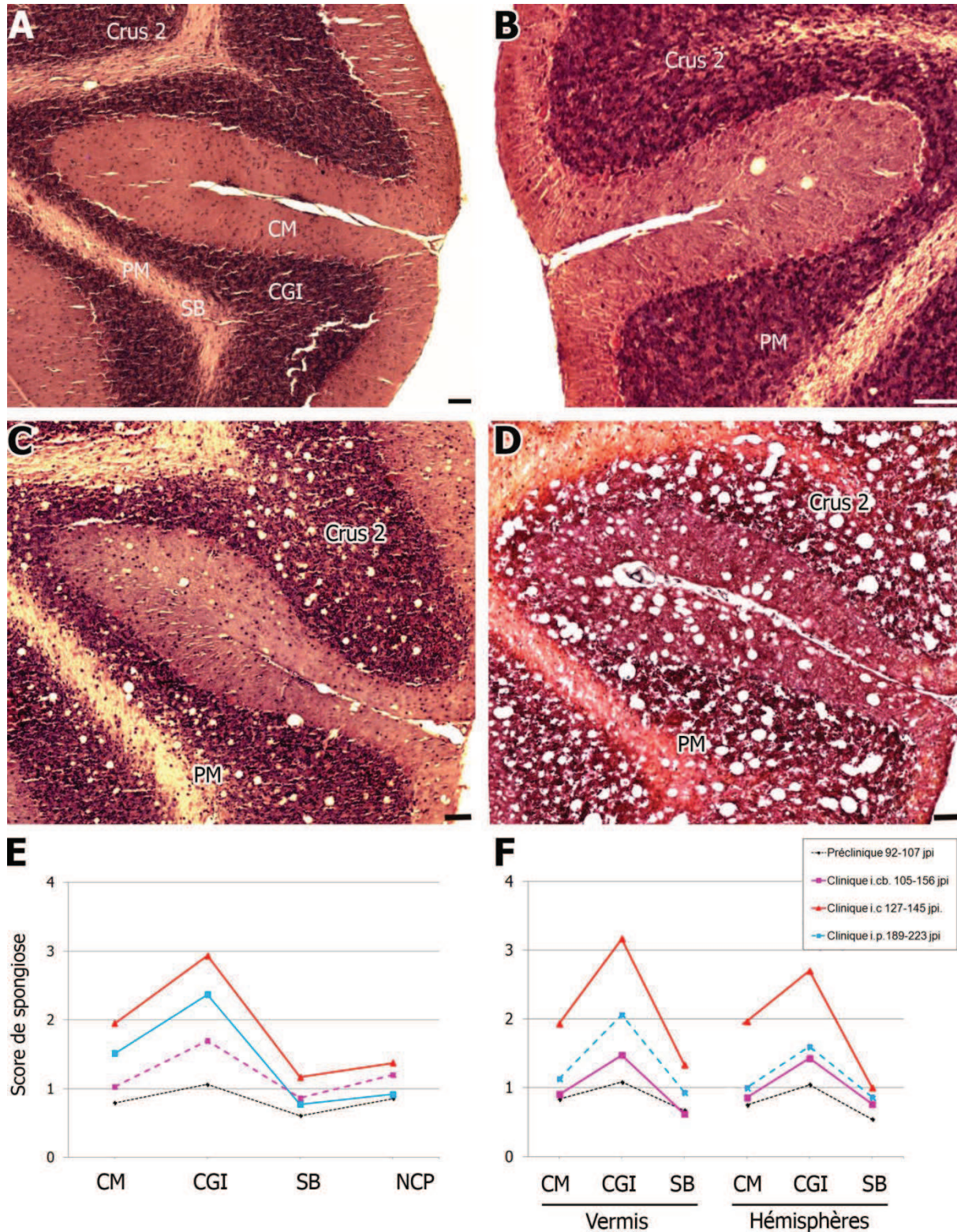
## 10. Signature lésionnelle de la tremblante 22L dans le cervelet de souris

La distribution et la densité de la spongiose induite par 22L a été évaluée dans des coupes transversales aux niveaux antérieur, médian et postérieur du cervelet infecté à l'aide de l'échelle de cinq scores définis par Fraser & Dickinson (1968) allant de 0 (aucune vacuole) à 5 (vacuolation dense et confluyente). Les scores de spongiose sont estimés dans les couches moléculaire et granulaire interne, les noyaux profonds et la substance blanche (**Figures 58A-D**). La vacuolation augmente avec la progression de la maladie avec un score global de 1 au stade préclinique i.cb., 1,5 et 2 respectivement aux stades cliniques i.cb. et i.c. mais n'a pas évolué significativement au stade clinique i.p. (**Figure 58E**).

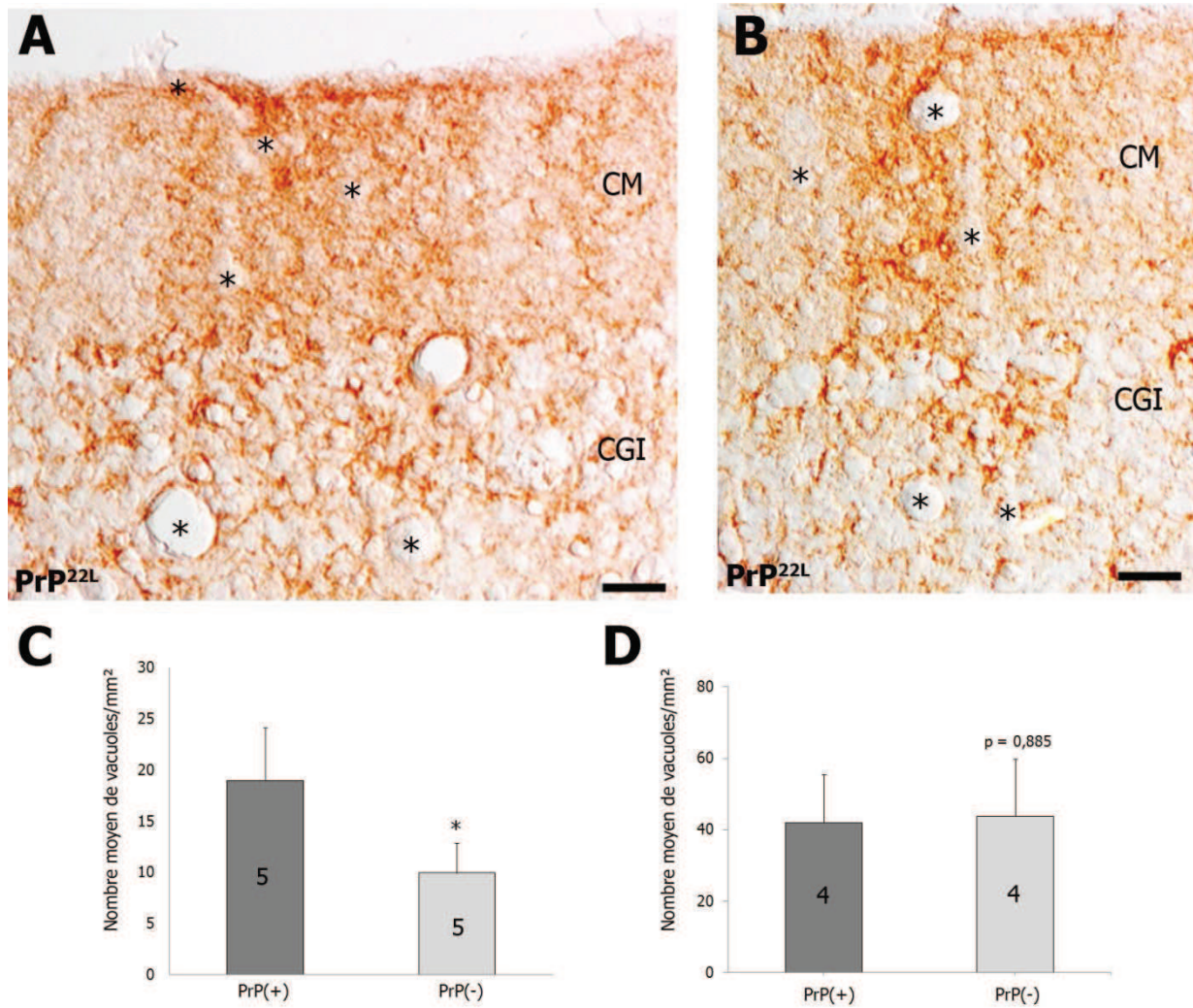
Dans le cortex cérébelleux infecté aux stades préclinique et cliniques étudiés, la densité des vacuoles est toujours plus importante dans la couche granulaire (préclinique i.cb. = 1, clinique i.cb. = 2,5, i.c. = 3, i.p. = 2) que dans la couche moléculaire (préclinique i.cb. = 1, clinique i.cb. = 1,5, i.c. = 2, i.p. = 1), la substance blanche (préclinique i.cb. = 0,5, clinique i.cb. = 1, i.c. = 1, i.p. = 1) et les noyaux profonds (préclinique i.cb. = 1, clinique i.cb. = 1, i.c. = 1,5, i.p. = 1), (**Figure 58E**). Cette différence est particulièrement importante au stade clinique dans le cervelet des souris infectées i.c. et i.p.

La densité des vacuoles est plus importante dans le vermis (préclinique i.cb. = 1, clinique i.cb. = 1, i.c. = 2, i.p. = 1,5) que dans les hémisphères (préclinique i.cb. = 1, clinique i.cb. = 1, i.c. = 2, i.p. = 1,5). Cette différence est principalement marquée au stade clinique dans la CGI des souris infectées i.p. (vermis = 2, hémisphères = 1,5) et i.c. (vermis = 3, hémisphères = 2,5), (**Figure 58F**).

La mesure de la densité des vacuoles dans la CM et la CGI de bandes de PrP<sup>22L</sup> représentatives (**Figure 57A-B**) révèle une augmentation significative de cette densité dans la couche moléculaire des bandes de PrP<sup>22L</sup> comparés aux bandes voisines à faible immunoréactivité PrP<sup>22L</sup> ( $p = 0,016 < 0,05$  ; **Figure 57C**) au contraire de la couche granulaire interne où mon analyse ne montre aucune différence significative de densité des vacuoles entre les bandes à forte et faible immunoréactivité de PrP<sup>22L</sup> ( $p = 0,885$ ) (**Figure 59D**).



**Figure 58. A-D.** Coloration au trichrome de Masson dans crus 2 et le lobule paramédian (PM) du cervelet d'une souris non-infectée (A) et de souris infectées par 22L i.cb. (B, C) aux stades préclinique 107 jpi (B) et clinique 134 jpi (C) et par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi (D). La spongiose du tissu nerveux augmente avec la progression de la maladie. Elle est la plus intense dans la couche granulaire (CGI). Echelle = 50 µm. **E, F.** Signatures lésionnelles (spongiose) de 22L i.cb., i.c. et i.p. dans le cortex (CGI et CM, couche moléculaire), la substance blanche (SB) et les noyaux profonds (NCP) du cervelet entier (E) et du vermis et des hémisphères (F).



**Figure 59.** **A, B.** Immunoperoxidase de PrP<sup>22L</sup> en microscopie à contraste d'interférence différentielle dans le cervelet d'une souris infectée i.cb. au stade clinique 134 jpi. De nombreuses vacuoles (\*) sont visibles dans des bandes de PrP<sup>22L</sup> (pointillés). CM, couche moléculaire ; CGI, couche granulaire interne. Echelle = 50 μm. **C, D.** Densité des vacuoles dans les bandes PrP(+)/PrP(-) de la CM (**C**) et de la CGI (**D**) du cervelet de souris infectées par 22L. \* p < 0,05.

## Etude II

### Résumé et conclusions

Dans le cervelet de souris, les prions 22L provoquent la spongiose et la mort apoptotique des cellules de Purkinje. Au contraire des interneurons, les cellules granulaires sont également sensibles à la neurotoxicité de 22L.

#### **L'organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet influence la pathogenèse des prions 22L.**

- Les dépôts de PrP<sup>22L</sup> s'accumulent dans le cortex cérébelleux suivant un patron de bandes parasagittales reproductible d'un individu à l'autre, indépendant de la voie de neuroinvasion et correspondant au patron d'expression différentielle de la zébrine EAAT4 par les cellules de Purkinje.
- La perte en cellules de Purkinje est la plus marquée dans les bandes de dépôt de PrP<sup>22L</sup>. Les cellules de Purkinje n'exprimant pas la zébrine EAAT4 sont les plus sensibles à la neurotoxicité de 22L.

#### **La pathogenèse des prions 22L est influencée par la voie de neuroinvasion.**

- La correspondance topographique des bandes de PrP<sup>22L</sup> et d'expression d'EAAT4 du cervelet 22L i.c. est inverse de celle du cervelet 22 i.p., suggérant une influence de la voie de neuroinvasion.

#### **Des paramètres locaux (propriétés biochimiques, connexions, environnement) modulent la résistance/vulnérabilité des cellules de Purkinje aux prions.**

## ETUDE III

# Effets pro-inflammatoires des prions dans le cervelet de souris

---

### Contexte scientifique

Dans les neurones, PrP<sup>C</sup> exerce une fonction cytoprotectrice naturelle vis-à-vis des cytokines pro-inflammatoires. Ce rôle dépend de la fonction de signalisation de PrP<sup>C</sup>. Dans les neurones infectés par les prions, PrP<sup>Sc</sup> pourrait annuler la fonction protectrice de PrP<sup>C</sup> rendant les neurones infectés très vulnérables aux cytokines inflammatoires libérées par les cellules microgliales et les astrocytes. En combinant des approches *in vitro* et *in vivo*, l'équipe de B. Schneider et O. Kellerman avec laquelle nous avons collaboré a montré que PrP<sup>Sc</sup> suractive une kinase, la protéine 3-phosphoinositide-dépendent kinase 1 (PDK1), dans les neurones infectés par les prions. PDK1 entraîne alors le déplacement d'une autre enzyme, l' $\alpha$ -sécrétase TACE depuis la membrane plasmique vers des vésicules intracellulaires, ce qui a pour effet d'annuler la fonction neuroprotectrice de TACE à la surface des neurones. L'internalisation de TACE induite par PrP<sup>Sc</sup> découple TACE de deux substrats majeurs : (i) la protéine prion cellulaire non pathologique, PrP<sup>C</sup>, ce qui amplifie la réplication de la PrP<sup>Sc</sup> dans les maladies à prions et (iii) les récepteurs au TNF- $\alpha$  (TNFR), qui s'accumulent à la membrane plasmique et augmentent la vulnérabilité des neurones malades à la toxicité du TNF- $\alpha$  dans les maladies à prions. L'inhibition pharmacologique de PDK1 est suffisante pour rediriger TACE à la surface des neurones malades, où elle récupère son activité protectrice en catalysant le clivage de PrP<sup>C</sup> et TNFR1, ce qui réduit la quantité des protéines amyloïdes toxiques et désensibilise les neurones des effets délétères du TNF- $\alpha$ . L'inhibition de PDK1 contrecarre les déficits moteurs induits par les prions et augmente la durée de vie des souris infectées (Pietri et al., 2013).

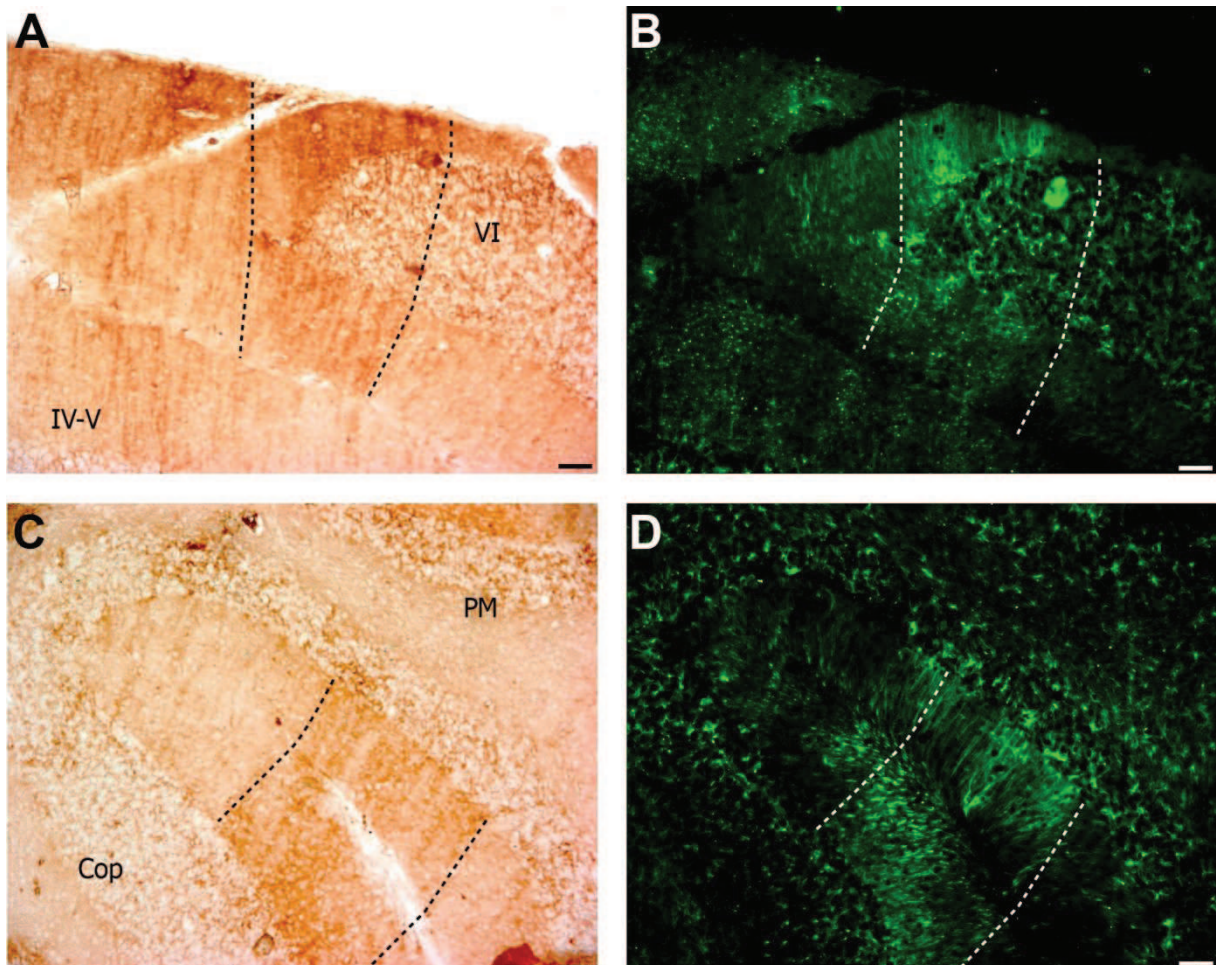
### Objectif de l'étude

En supprimant le contrôle effectué par PrP<sup>C</sup> sur le « *shedding* » ectomembranaire des récepteurs TNFR1, les prions provoquent leur augmentation à la membrane plasmique des neurones en culture primaire. Cette troisième étude en collaboration avec le groupe de B. Schneider et O. Kellermann vise à savoir si l'augmentation de l'expression de TNFR1 montrée dans les neurones primaires infectés *in vitro* est reproduite chez l'animal infecté en prenant avantage de la compartimentation anatomique des effets neuropathologiques des prions dans le cortex cérébelleux (Etude II). En d'autres termes, si les effets des prions suivent la compartimentation définie par l'organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet et en particulier par les sous-populations de cellules de Purkinje, en est-il de même des effets des prions sur le système TNFR1 ? Un corollaire à cette question vise à déterminer l'identité du ou des types cellulaires qui expriment TNFR1 dans le cervelet infecté.

## 1. Astroglie réactive et activation microgiale dans le cervelet de souris infecté par 22L

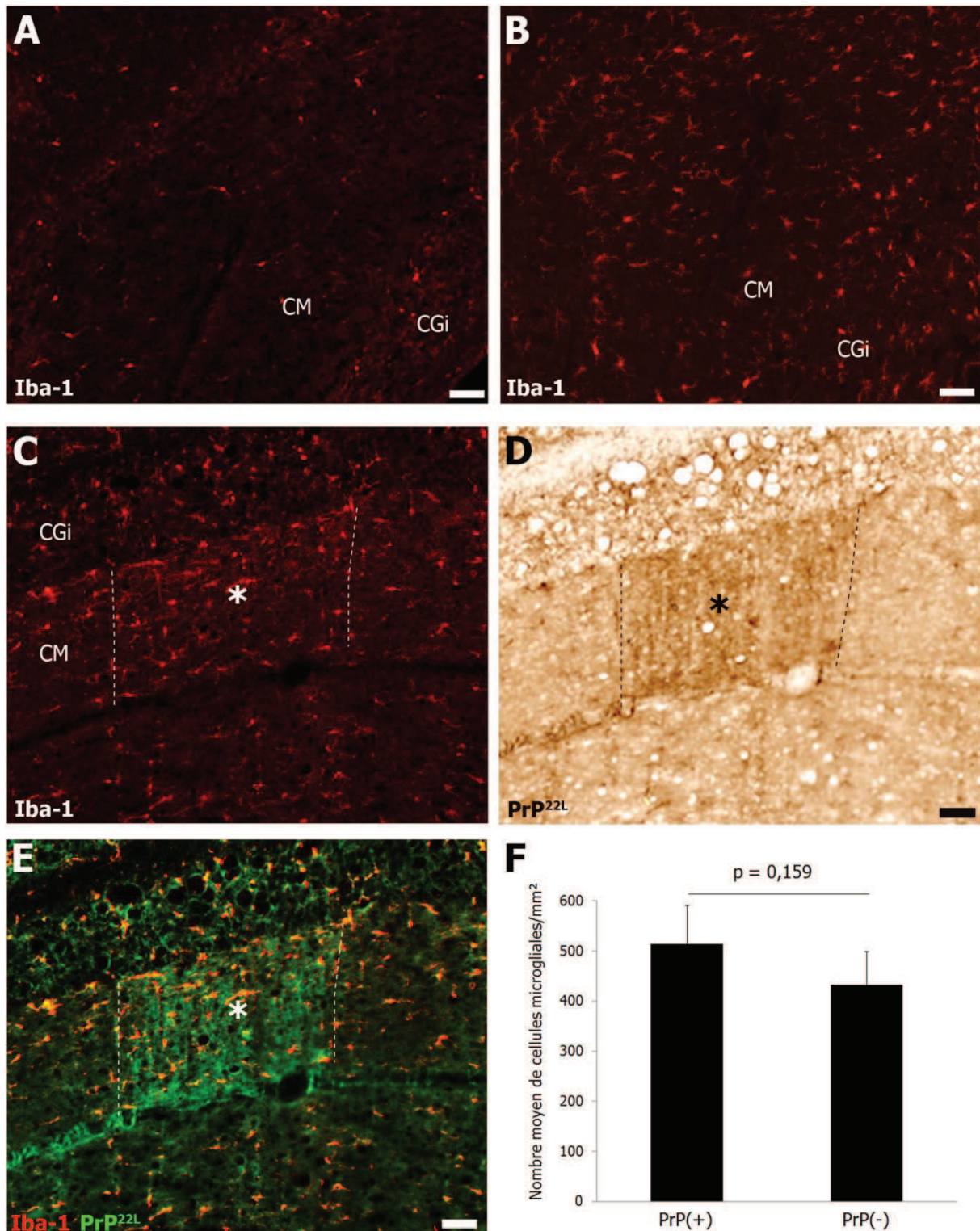
Dans le cortex cérébelleux infecté par 22L, l'immunofluorescence de GFAP révèle le développement des cellules glias astrocytaires dans les bandes PrP<sup>22L</sup> où les cellules de Purkinje ont majoritairement disparu et où les palissades verticales de la glie de Bergman intensément immunofluorescentes traversent la couche moléculaire (**Figure 60**). Dans les bandes à faible immunoréactivité de PrP<sup>22L</sup>, le développement et l'immunoréactivité pour GFAP des astrocytes restent similaires à ceux observés dans le cortex cérébelleux des souris non infectées.

Les cellules microgiales ont intensément proliféré dans l'ensemble du tissu cérébelleux infecté par 22L (**Figure 61A-B**). L'analyse quantitative réalisée avec S. Demuth montre que le nombre de cellules microgiales activées immunohistofluorescentes pour Iba-1 ne varie pas des bandes de PrP<sup>22L</sup> ( $514 \pm 77$  cellules microgiales) aux bandes adjacentes à faible immunoréactivité de PrP<sup>22L</sup> ( $432 \pm 67$  cellules microgiales,  $p = 0,159$ ), (**Figure 61C-F**) suggérant que les cellules microgiales n'ont pas migré préférentiellement dans les régions d'accumulation de PrP<sup>22L</sup> (i.e. dans les régions de mort neuronale).





**Figure 60.** Immunoperoxydase de PrP<sup>22L</sup> (**A, C**) et immunofluorescence de GFAP (**B, D**) dans le cervelet de souris infectée par 22L i.cb. au stade clinique 134 jpi. L'astroglie réactive marque les bandes PrP<sup>22L</sup> (pointillés). Cop, copula pyramidis ; PM, lobule paramédian. Echelle = 50  $\mu$ m.

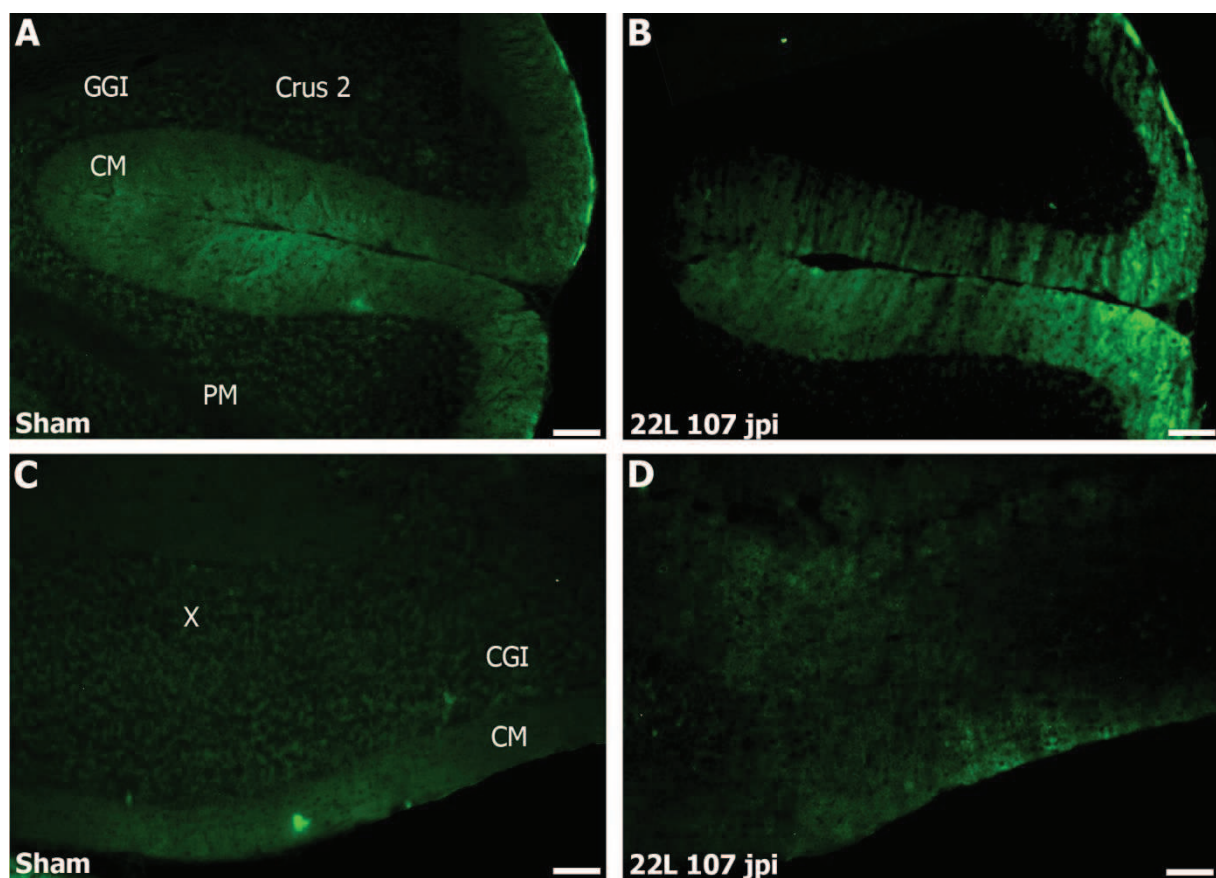


**Figure 61. Analyse quantitative des cellules microgliales dans le cortex cérébelleux de souris infectées par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi. A-C.** Immunofluorescence de Iba-1 dans le cortex cérébelleux d'une souris non-infectée (sham, **A**) et d'une souris infectée par 22L i.c. (**B, C**) montre la prolifération des cellules microgliales dans le cervelet infecté. CM, couche moléculaire ; CGI, couche granulaire interne. **D, E.** Une bande de PrP<sup>22L</sup> (pointillés) dans la CM délimite la zone de comptage des cellules microgliales en fonction du dépôt de PrP<sup>22L</sup>. **E.** Superposition de **C** et **D**. **F.** Densité des cellules microgliales dans les bandes de PrP<sup>22L</sup> (PrP(+)) et dans les bandes à faible immunoréactivité (PrP(-)). Echelle = 50  $\mu$ m.

## 2. L'immunoréactivité de TNFR1 augmente dans le cortex cérébelleux des souris infectées par 22L

Dans le cervelet non-infecté, l'immunoréactivité de TNFR1 est faible et homogène dans la couche moléculaire (**Figures 62A, C & 65F**) et dans les noyaux profonds (non montré).

Au stade préclinique 107 jpi, l'immunoréactivité de TNFR1 augmente dans certaines régions des hémisphères du cervelet infecté (crus 2, lobule paramédian, **Figure 62B**). Des travées non fluorescentes apparaissent dans la couche moléculaire de ces régions. Au stade clinique 134-235 jpi, des travées et des bandes d'immunoréactivité de TNFR1 sont visibles dans l'ensemble du cortex cérébelleux infecté (**Figures 63A,D, 64A & 65A, C**).



**Figure 62. Immunofluorescence de TNFR1 dans le cortex cérébelleux des lobules crus 2 et paramédian et du lobule X vermal d'une souris sham (A, C) et d'une souris infectée par 22L i.cb. au stade préclinique 107 jpi (B, D).** Noter dans le cervelet infecté l'immunoréactivité de TNFR1 plus intense dans la couche moléculaire (CM) de crus 2-PM que dans le lobule X (D) dont l'immunoréactivité de TNFR1 reste au niveau de celle observée dans le cervelet sham (C). CGI, couche granulaire interne. Echelle = 50 µm.

L'analyse immunohistochimique simultanée de PrP<sup>22L</sup> et de TNFR1 montre que les bandes et travées d'intense immunoréactivité de TNFR1 correspondent aux bandes et travées de PrP<sup>22L</sup> (**Figures 63 & 64**).

### 3. Localisation cellulaire de TNFR1 dans le cervelet de souris infectées par 22L

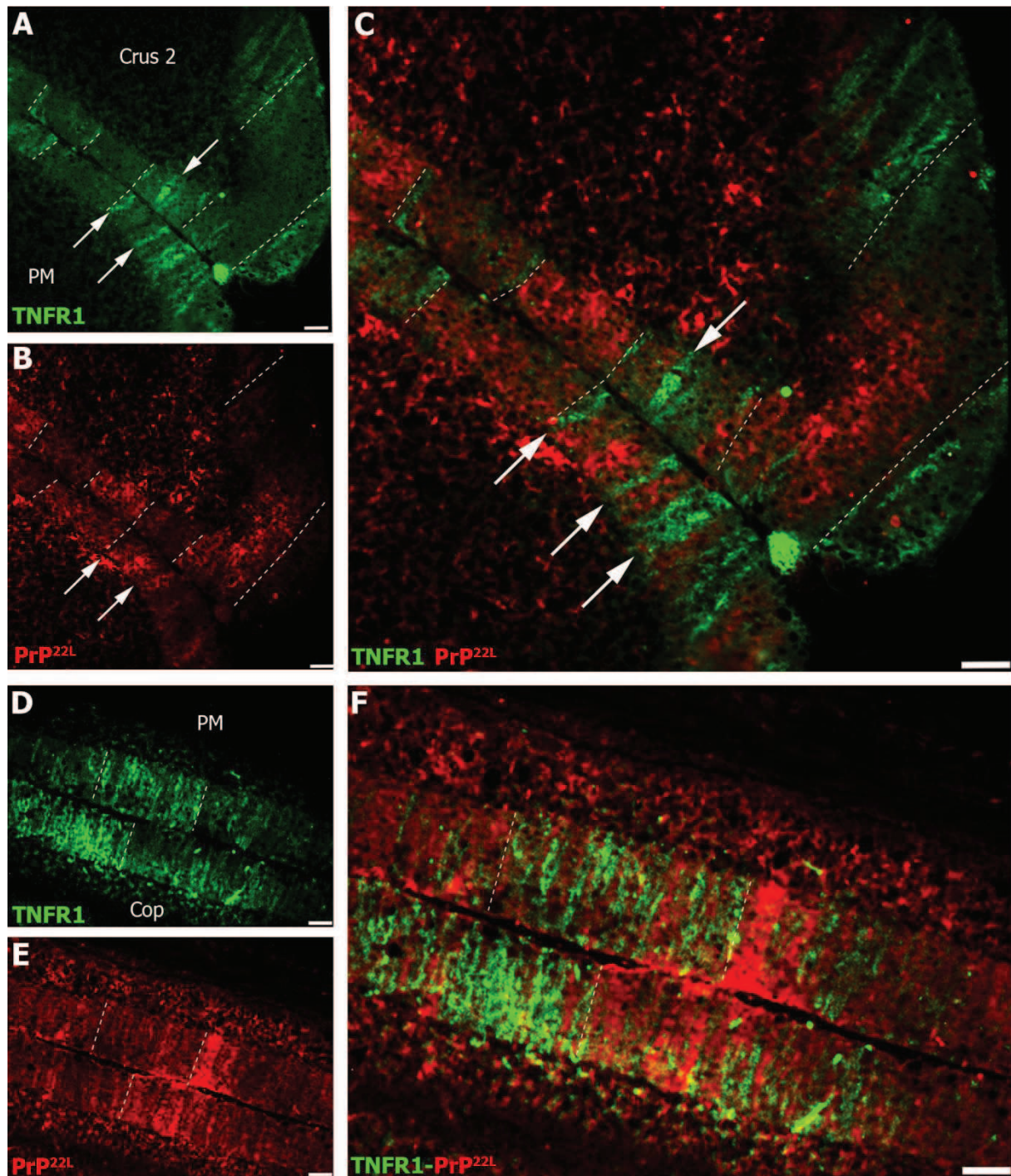
Le double marquage immunohistochimique de TNFR1 et de CaBP dans le cortex cérébelleux infecté par 22L montre une totale superposition des travées et bandes d'immunoréactivité pour TNFR1 et des groupes de cellules de Purkinje survivantes immunofluorescentes pour CaBP (**Figure 65**). Cependant, l'observation des préparations au microscope confocal montre la proximité de TNFR1 et des épines et dendrites tertiaires des cellules de Purkinje sans toutefois mettre en évidence leur co-localisation, la fluorescence rouge de TNFR1 restant toujours distincte de la fluorescence verte de CaBP dans la couche moléculaire du cervelet de souris non-infectées (**Figure 66**) et infectées (**Figure 67**).

Dans le cervelet des souris EAAT4-eGFP infectées par 22L, l'immunofluorescence de TNFR1 se superpose à celle des arbres dendritiques des cellules de Purkinje EAAT4(+) marqués par la fluorescence d'eGFP dans la couche moléculaire (**Figure 68**). Cette observation n'exclut pas la possibilité que l'augmentation de TNFR1 induite par l'infection ait aussi lieu au niveau de cellules de Purkinje EAAT4(-), les préparations que j'ai observées jusque là provenant de souris à un stade clinique avancé de la tremblante et ayant perdu la majorité des cellules de Purkinje EAAT4(-).

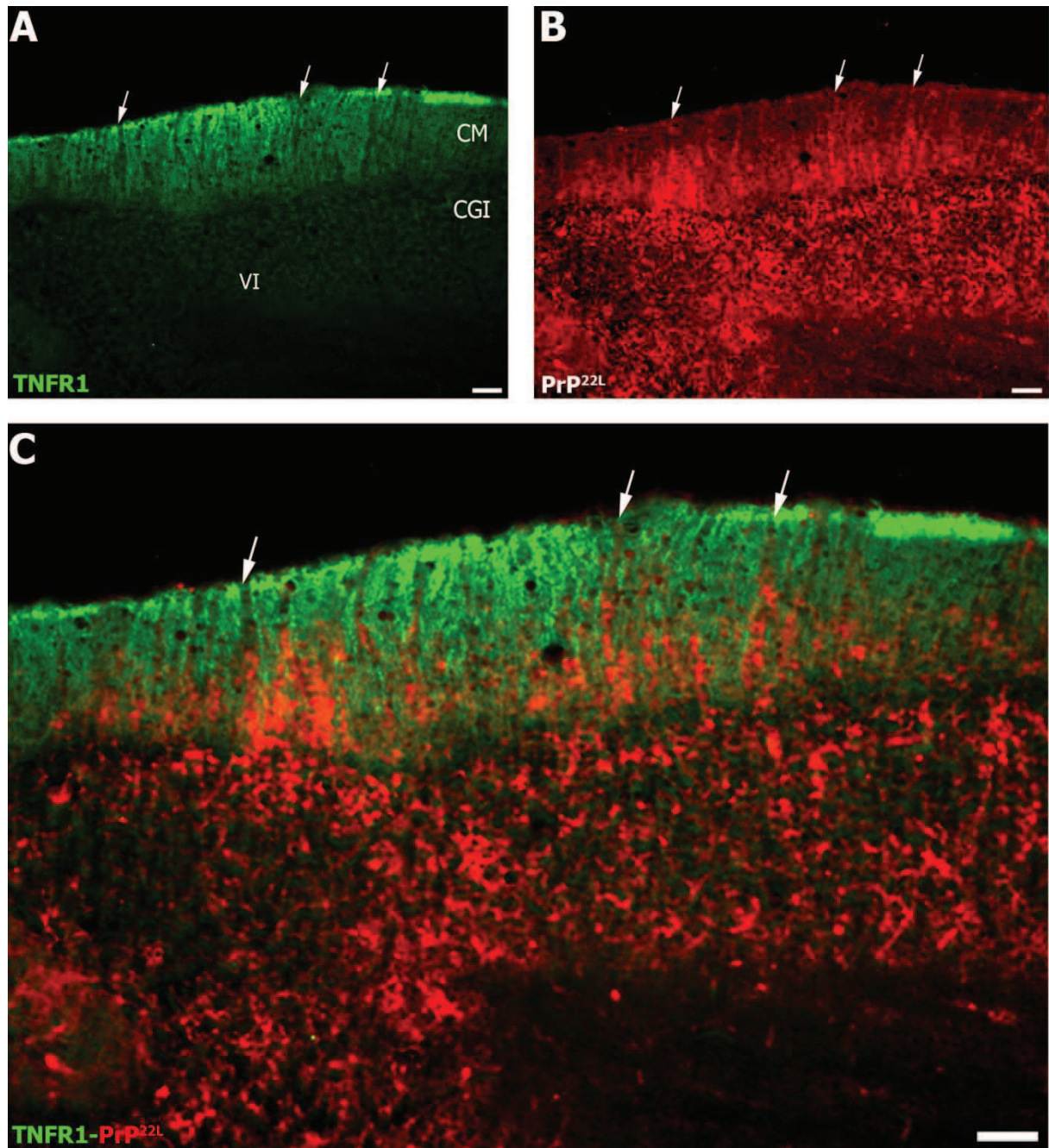
Dans la couche moléculaire du cervelet de souris infectées par 22L, l'immunofluorescence de vGLUT1 révèle une distribution des terminaisons de fibres parallèles homogène et peu différente de celle observée chez l'animal non infecté (**Figure 69B, E**). L'observation au microscope confocal à haute résolution montre que les marquages vGLUT1 et TNFR1 ne sont pas co-localisés (**Figure 69**) excluant les terminaisons présynaptiques des fibres parallèles comme site d'expression de TNFR1.

Le double marquage de TNFR1 et GFAP en immunofluorescence dans la couche moléculaire du cervelet de souris infectées par 22L montre l'immunoréactivité de GFAP dans les prolongements verticaux de la glie de Bergmann dans les régions sans immunofluorescence de TNFR1 (**Figure 68**).

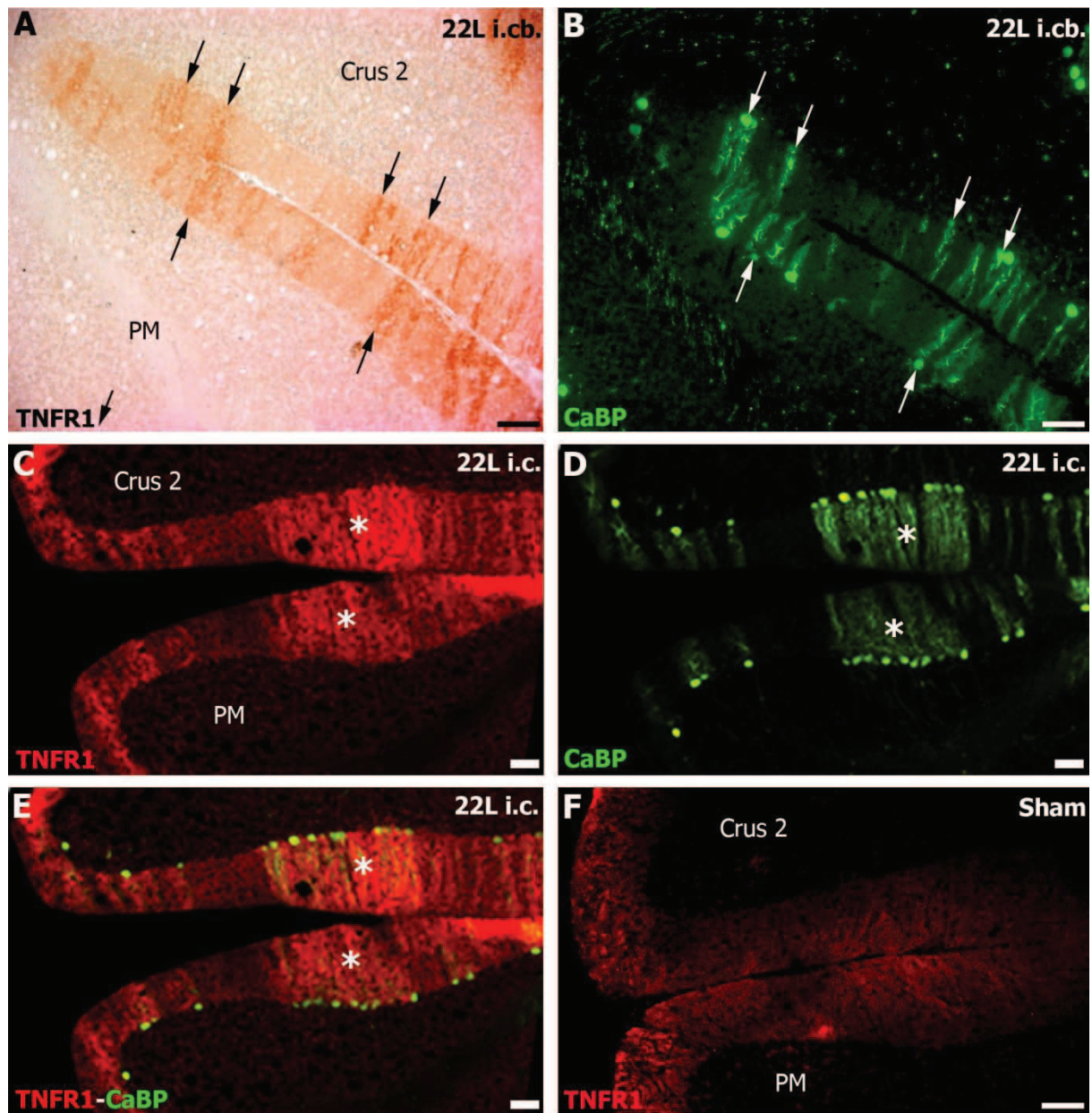
La double immunofluorescence révèle la co-localisation de TNFR1 et du transporteur astrocytaire de glutamate EAAT1 dans la couche moléculaire du cervelet de souris infectées par 22L (**Figures 69, 70 & 71**).



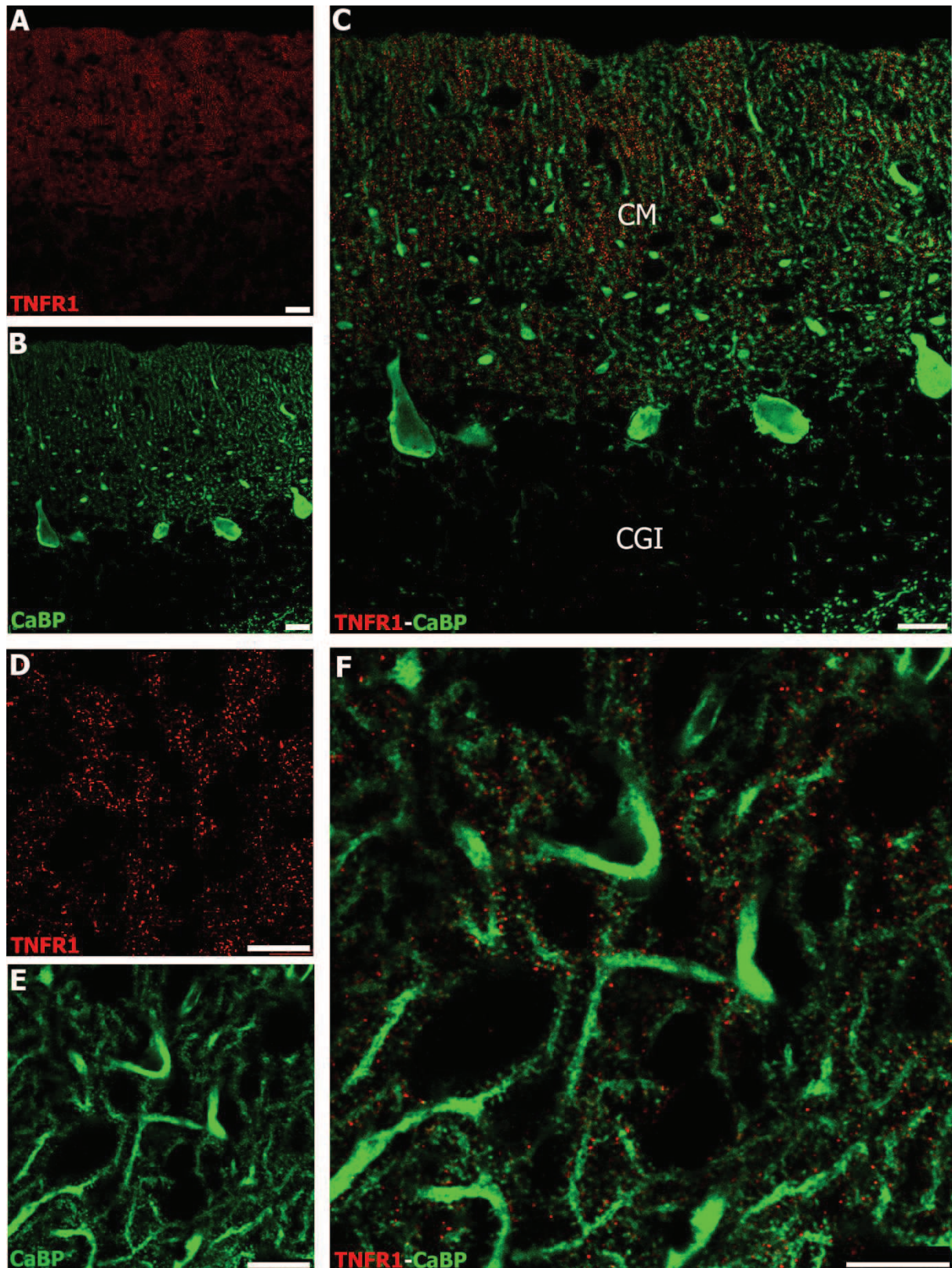
**Figure 63.** Immunofluorescence de TNFR1 (**A, D**) et de PrP<sup>22L</sup> (**B, E**) dans le cortex cérébelleux de souris infectée par 22L i.cb. au stade clinique 134 jpi. **A, D.** Travées (flèches) et bandes (pointillés) d'expression de TNFR1 dans crus 2, le lobule paramédian (PM) et copula pyramidis (Cop). **B.** L'immunofluorescence de TNFR1 est la plus intense dans les bandes et travées (flèches) où PrP<sup>22L</sup> est absente. **C, F.** Superposition de **A-B** et **D-E** respectivement. Echelle = 50  $\mu$ m.



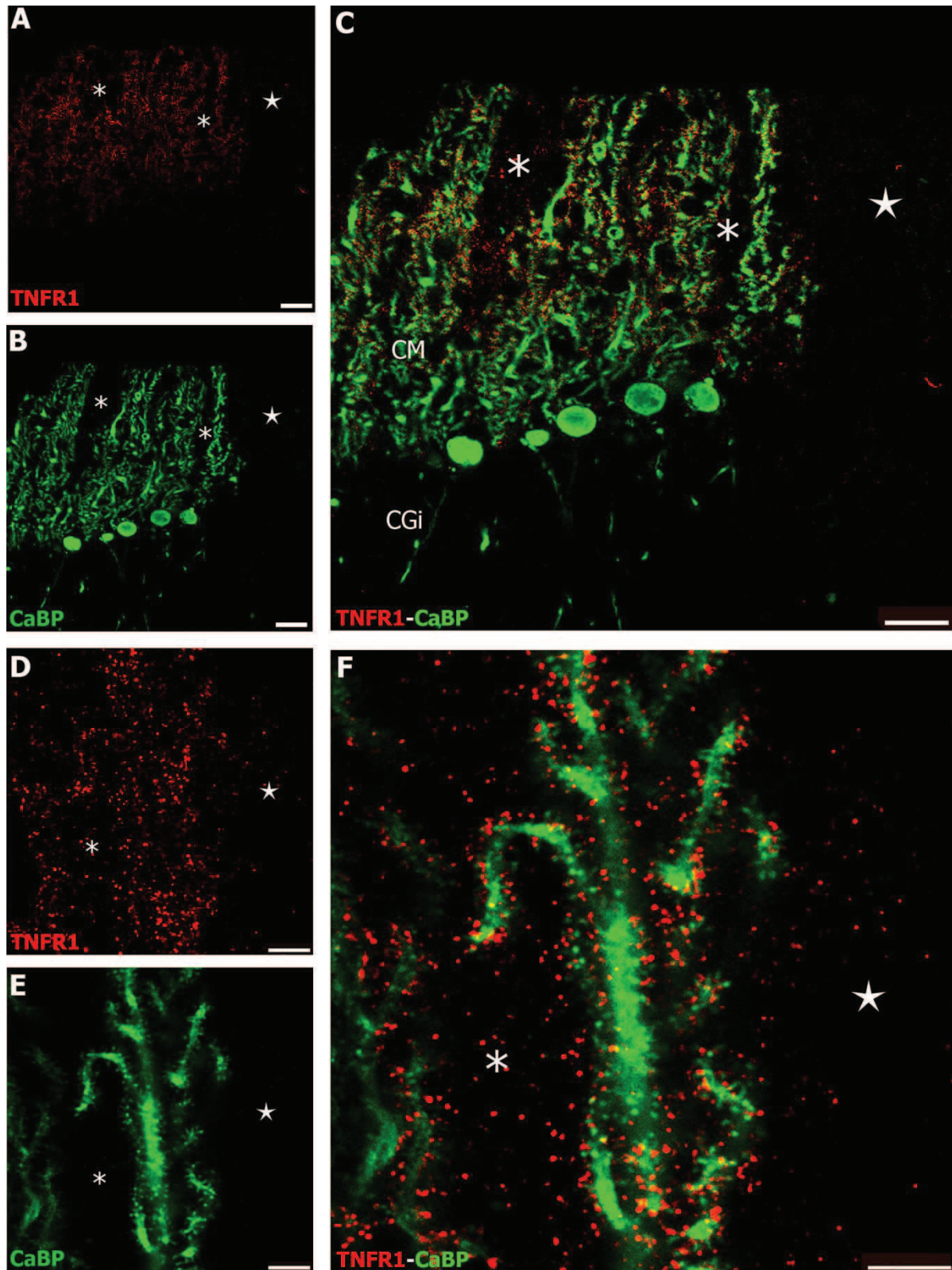
**Figure 64.** Immunofluorescence de TNFR1 (A) et de PrP<sup>22L</sup> (B) dans le cortex cérébelleux de souris infectée par 22L i.cb. au stade clinique 134 jpi. A, D. Des travées sans TNFR1 (flèches) correspondent aux travées de PrP<sup>22L</sup> (B). C. Superposition de A, B et D, E respectivement. Echelle = 50 μm.



**Figure 65. Immunohistochimie pour TNFR1 et CaBP dans cervelet d'une souris infectée par 22L i.cb. au stade clinique 134 jpi (A-E) et non-infectée (F).** A, B. Immunoperoxydase de TNFR1 (A) et immunofluorescence de CaBP (B) dans des coupes sériées de cervelet infecté. Les flèches montrent la correspondance topographique des travées de TNFR1 et des cellules de Purkinje (CPs) immunofluorescentes pour CaBP dans crus 2 ventral et le lobule paramédian (PM) dorsal. C, D. Immunofluorescence de TNFR1 (C) et CaBP (D) dans le cortex cérébelleux d'une souris infectée par 22L i.cb. au stade clinique 139 jpi (C-E) et sham (F). E. Superposition de C et D. L'immunoréactivité de TNFR1 forme des travées et des bandes (\*) correspondant à la présence des dendrites de cellules de Purkinje immunofluorescentes pour CaBP dans la couche moléculaire. Echelle = 50  $\mu$ m.

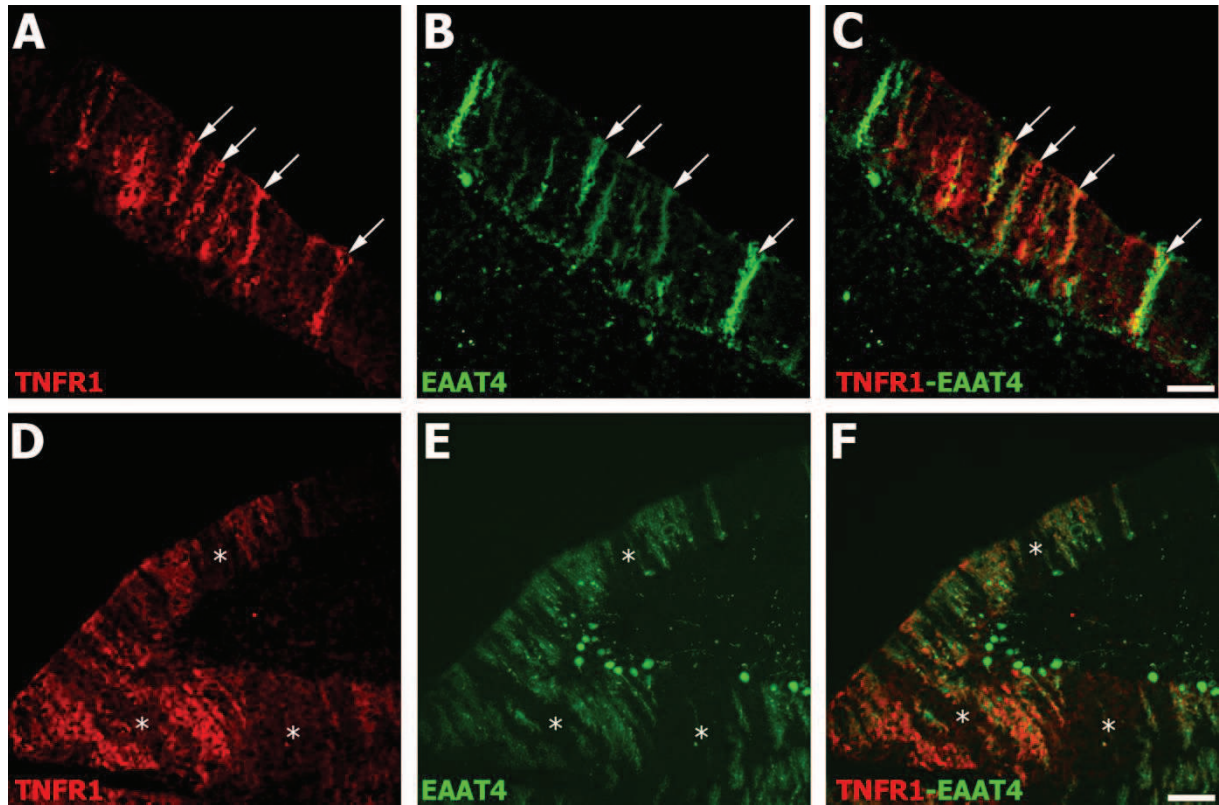


**Figure 66.** Immunofluorescence de TNFR1 (A, D) et CaBP (B, E) en microscopie confocale dans le cortex cérébelleux d'une souris non-infectée. Les images C et F sont les superpositions respectivement de A, B et D, E. L'immunofluorescence de TNFR1 marque essentiellement la couche moléculaire (CM) à proximité des épines émanant des dendrites de CPs (vert). CGI, couche granulaire interne. Echelle = 25  $\mu$ m (A-C) et 10  $\mu$ m (D-F).

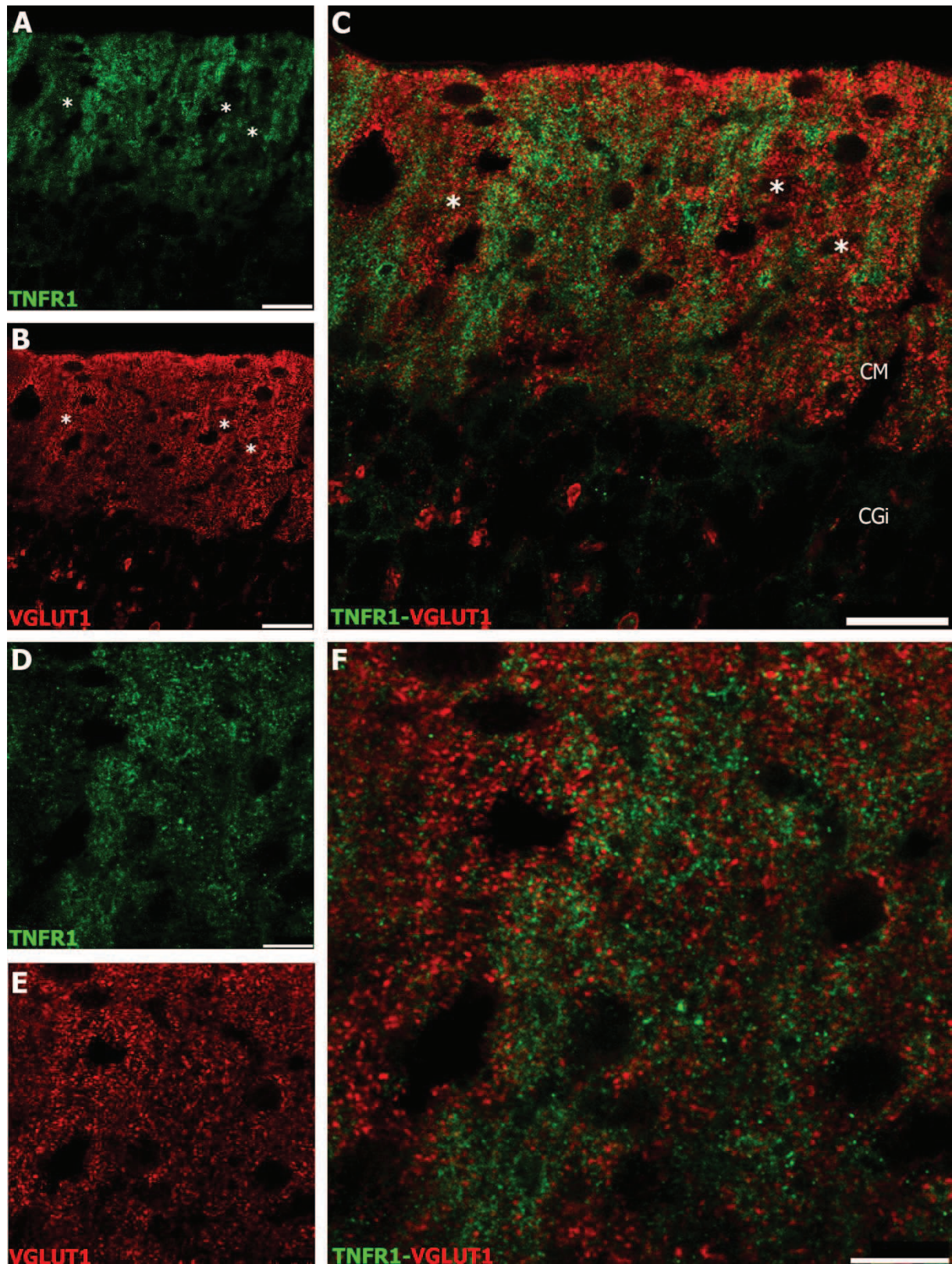


**Figure 67. Immunofluorescence de TNFR1 (A, D) et CaBP (B, E) en microscopie confocale dans le cortex cérébelleux d'une souris infectée par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi.** Les images C et F résultent de la superposition de A, B et D, E respectivement. L'immunofluorescence de TNFR1 (rouge) marque essentiellement la couche moléculaire (CM) le long des dendrites des CPs (vert) à la limite d'une région d'où les CPs ont disparu (\*). L'immunofluorescence de TNFR1 est quasi absente de ces régions ainsi que des travées non-occupées par les CPs (\*). CGi, couche granulaire interne. **D-E.** Fort grossissement d'un dendrite de CP dans la CM du cervelet infecté par 22L. L'immunofluorescence de TNFR1 jouxte les troncs dendritiques des CPs. Le taux de co-localisation des deux marqueurs avec les épines dendritiques (jaune) est faible. Echelle = 25  $\mu$ m (A-C) et 5  $\mu$ m (D-F).

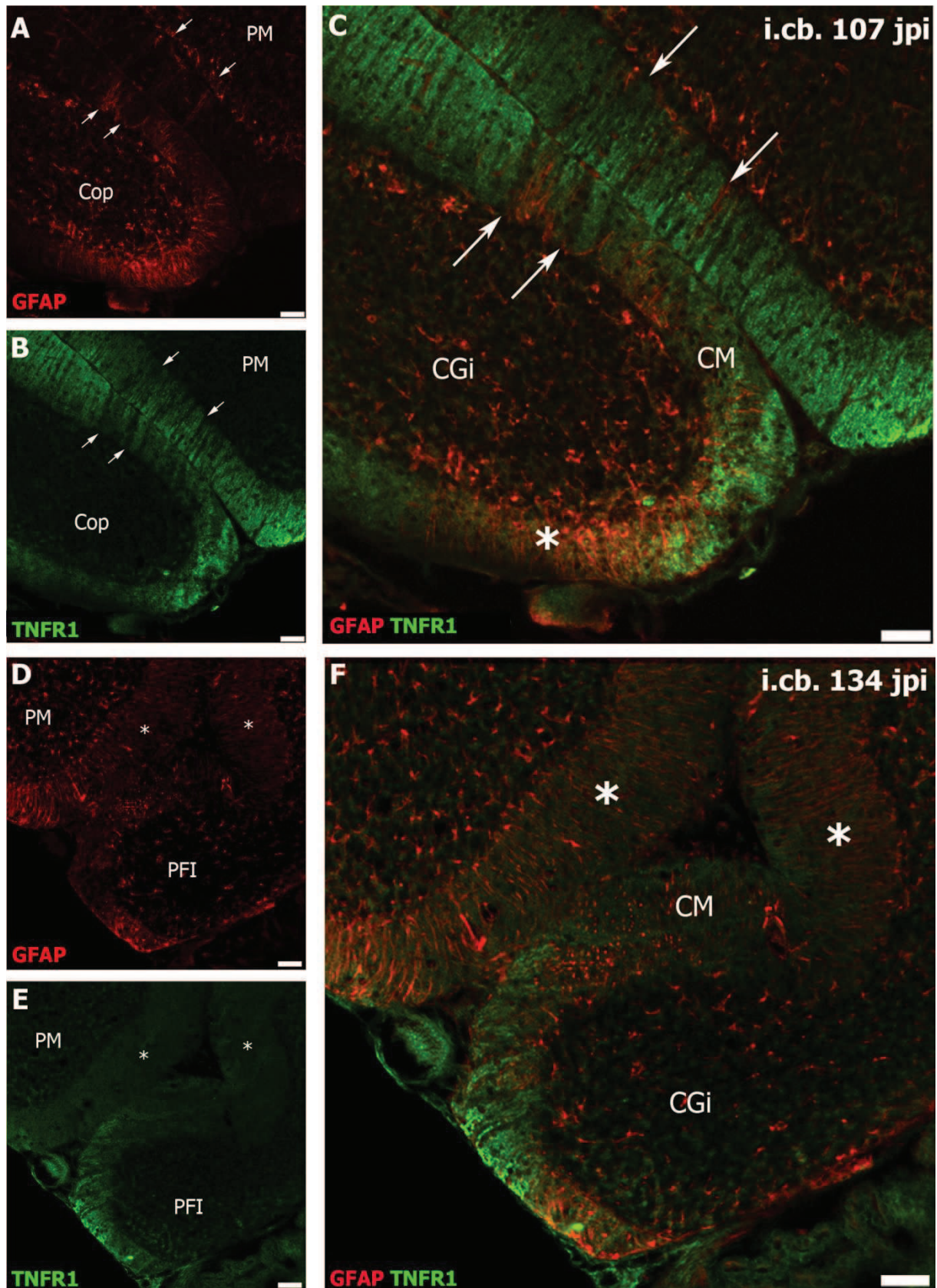




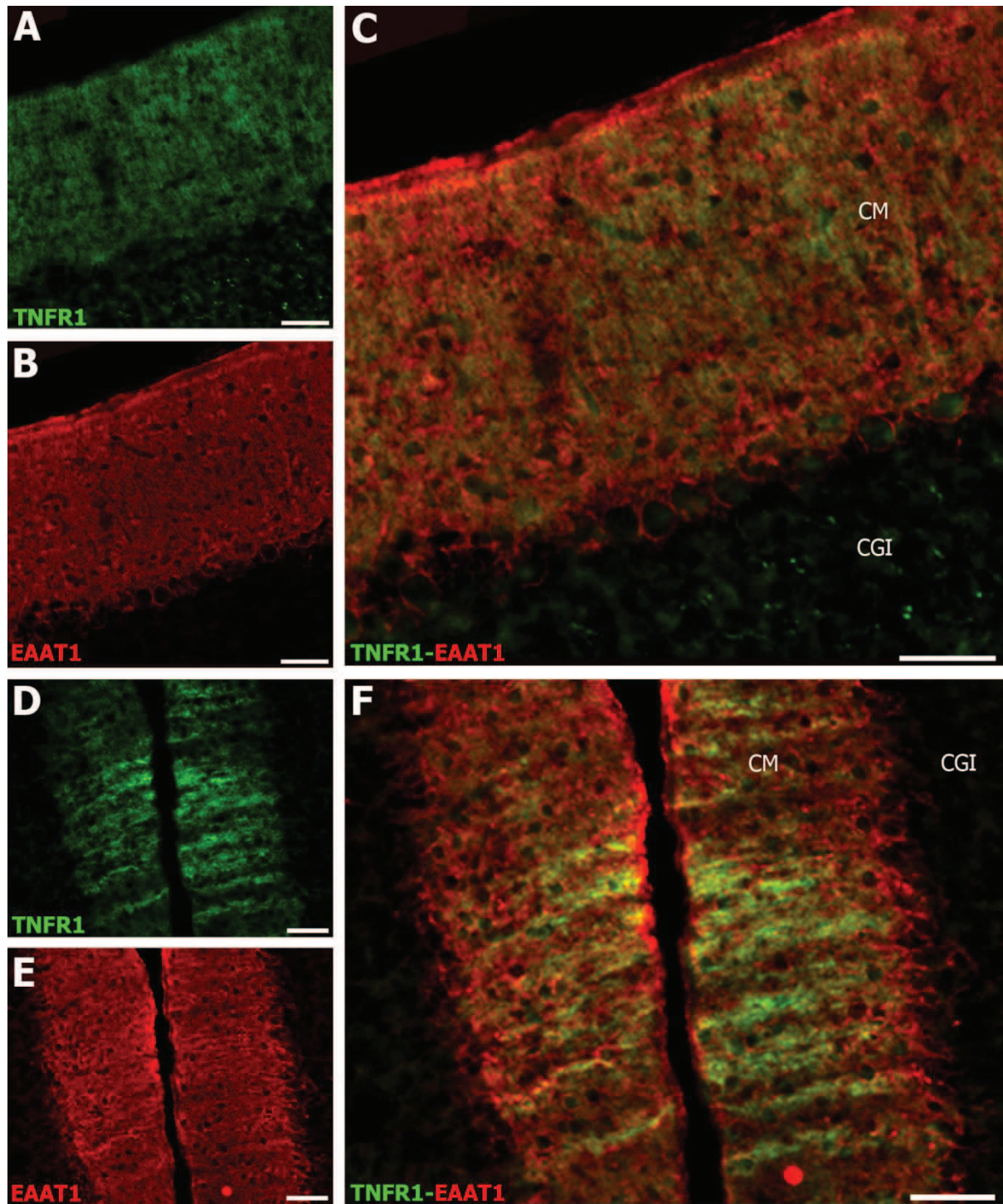
**Figure 68. Immunofluorescence de TNFR1 (rouge, A, D) et EAAT4 (vert, B, E) dans le cortex cérébelleux de souris infectée par 22L i.c. au stade clinique 153 jpi. A-C.** Une bande de travées immunofluorescentes pour TNFR1 correspond aux dendrites de CPs EAAT4(+) (flèches). **D-E.** Le patron d'immunofluorescence de TNFR1 correspond exactement à celui de la fluorescence de CaBP dans les dendrites des CPs. \*, travées sans CPs EAAT4(+) et sans immunoréactivité pour TNFR1. Echelle = 50  $\mu$ m.



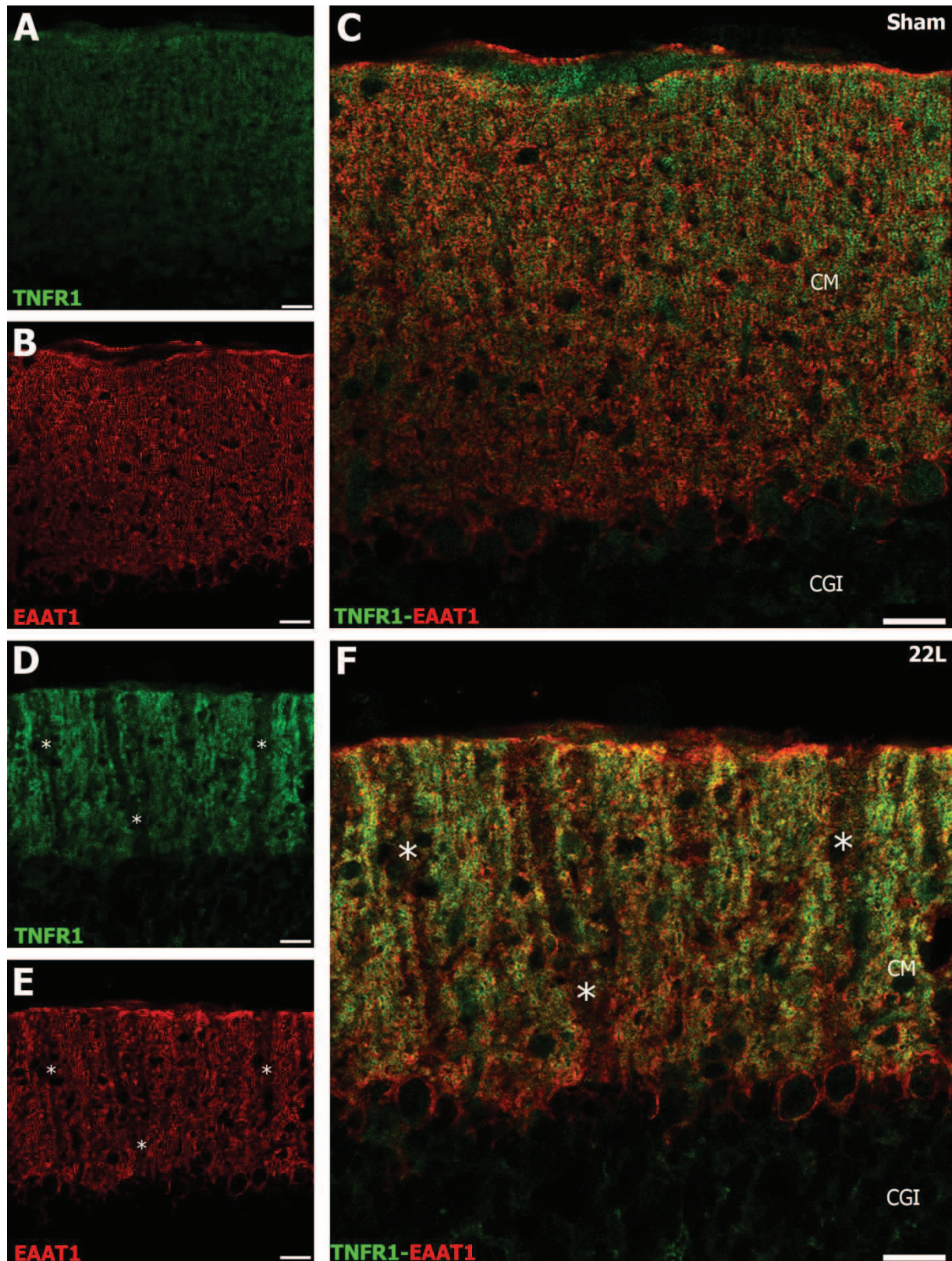
**Figure 69.** Immunofluorescence de TNFR1 (A, D) et VGLUT1 (B, E) dans le cortex cérébelleux d'une souris infectée par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi. C, F. Superposition respective de A,B et D, E. L'immunofluorescence de TNFR1 et de VGLUT1 ne sont pas superposées. Echelle = 25  $\mu$ m (A-C) et 10  $\mu$ m (D-E).



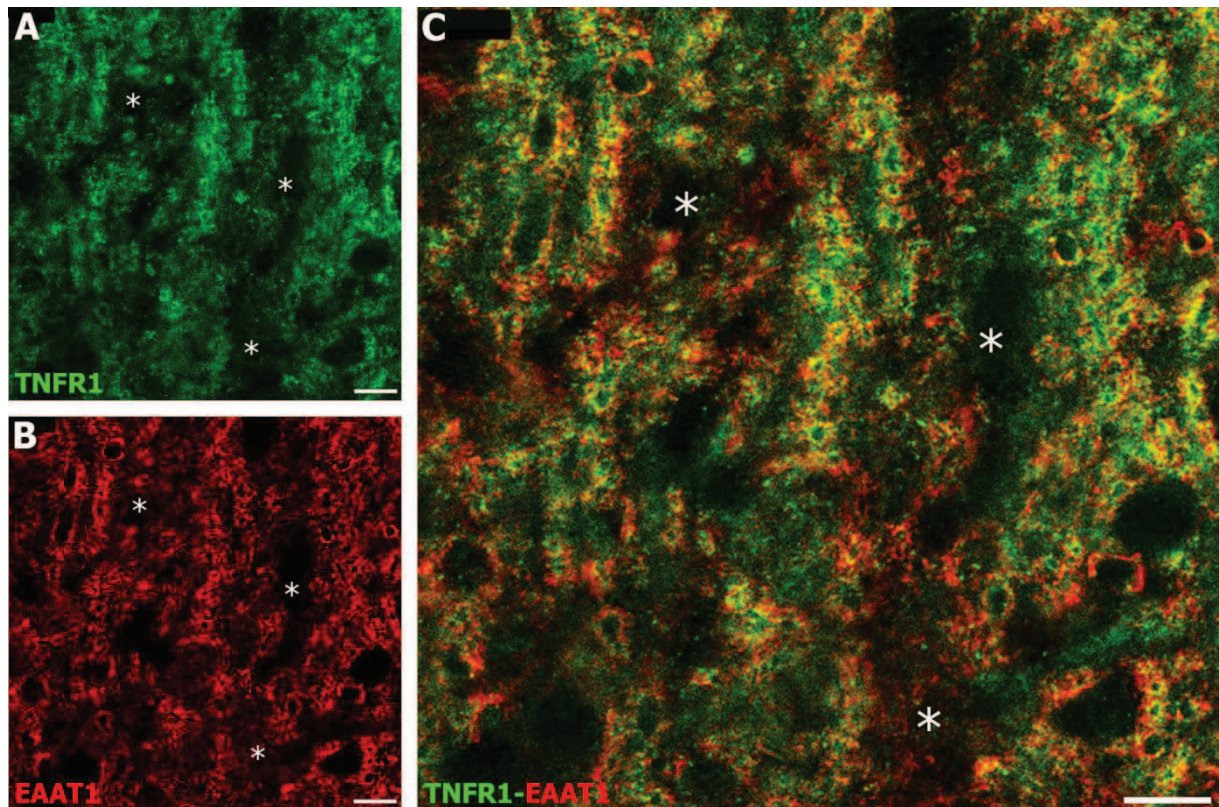
**Figure 70. Immunofluorescence de GFAP (A, D) et TNFR1 (B, E) dans le cortex cérébelleux de souris infectées par 22L i.cb. aux stades précliniqu 107 jpi (A-C) et clinique 134 jpi (D-F).** Les images **C** et **F** sont des superpositions respectivement de **A, B** et **D, E**. **A-C.** Au stade précliniqu, la couche moléculaire présente des travées (flèches) et des bandes (\*) à faible immunoréactivité de TNFR1 (**A**) et occupées par les palissades verticales de la glie de Bergmann réactive marquée par GFAP (**B**). **D-F.** Au stade clinique, de larges zones dépourvues de TNFR1 (\*) sont occupées par la glie de Bergman très immunoréactive pour GFAP. CM, couche moléculaire ; CGI, couche granulaire interne. Echelle = 50 µm.



**Figure 71.** Immunofluorescence de TNFR1 (A, D) et EAAT1 (B, E) dans le cortex cérébelleux d'une souris sham (A-C) et d'une souris infectée par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi (D-F). Les images C et F sont des superpositions respectivement de A, B et D, E. L'immunofluorescence de TNFR1 et l'immunofluorescence d'EAAT1 apparaissent colocalisées (jaune) dans la couche moléculaire (CM). CGI, couche granulaire interne. Echelle = 50  $\mu$ m.

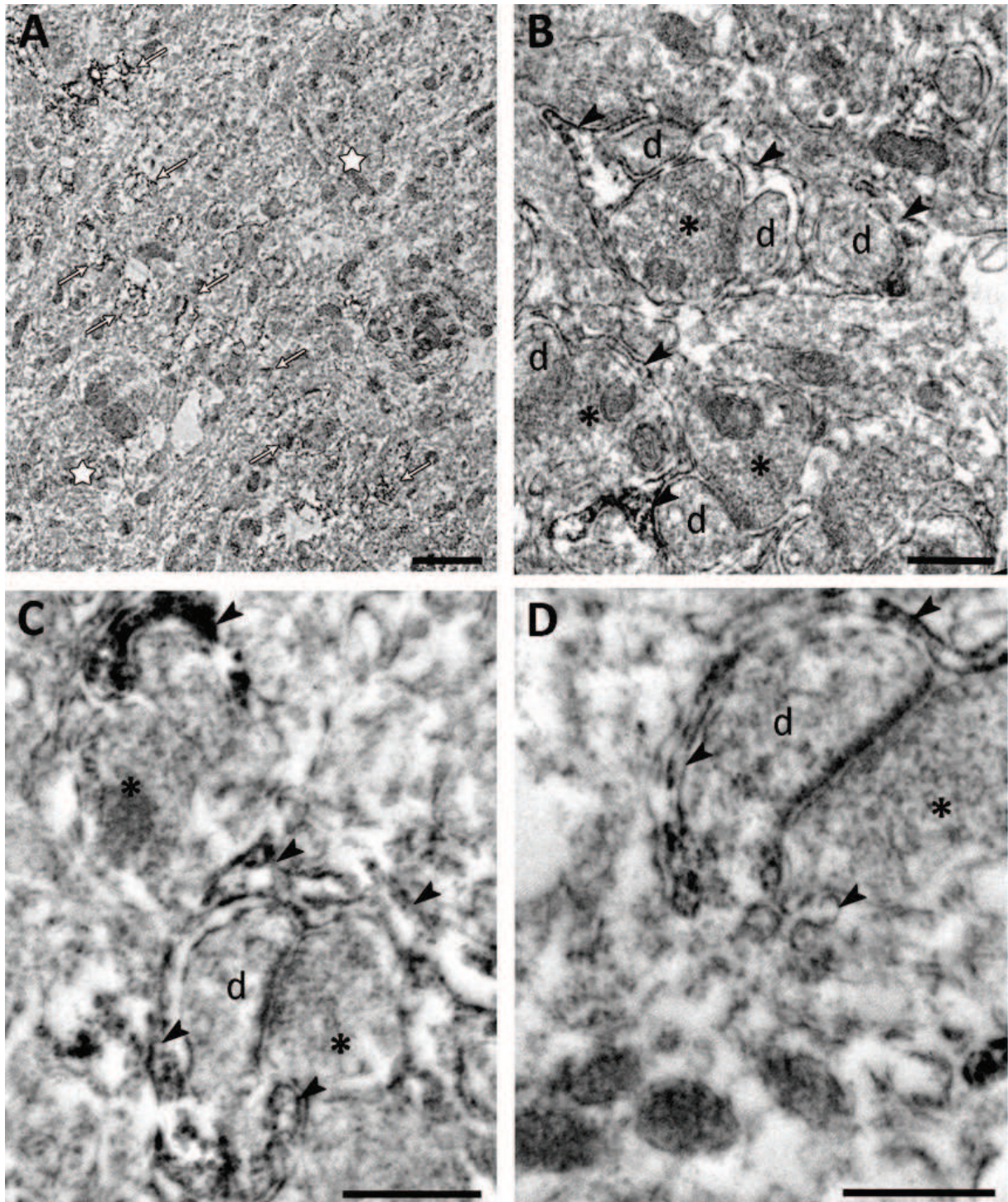


**Figure 72.** Immunofluorescence de TNFR1 (A, D) et EAAT1 (B, E) en microscopie confocale dans le cortex cérébelleux d'une souris sham (A-C) et d'une souris infectée par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi (D-F). Les images C et F sont des superpositions respectives de A, B et D, E. L'immunofluorescence jaune signale la colocalisation de TNFR1 avec EAAT1 dans la couche moléculaire (CM). CGI, couche granulaire interne. Noter les travées de faible immunoréactivité pour TNFR1 et EAAT1 dans la CM infectée. (\*) Echelle = 25  $\mu$ m.



**Figure 73. Immunofluorescence de TNFR1 (A) et EAAT1 (B) en microscopie confocale dans le cortex cérébelleux d'une souris infectée par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi. C. Superposition de A et B. L'immunofluorescence jaune signale la colocalisation de TNFR1 avec EAAT1. Des travées qui ne sont pas immunoréactives pour TNFR1 et EAAT1 traversent la couche moléculaire (\*). Echelle = 10  $\mu$ m.**

L'observation au microscope électronique par transmission de coupes de cervelet de souris infectées par 22L montre que le marquage de TNFR1 en immunoperoxydase est essentiellement localisé au niveau des extrémités distales des prolongements astrocytaires qui enveloppent les synapses asymétriques des cellules de Purkinje. Les filaments gliaux qui présentent l'immunoréactivité la plus intense enveloppent le plus souvent les éléments post-synaptiques des synapses établies par les terminaisons de fibres parallèles sur les épines dendritiques des cellules de Purkinje (**Figure 72**).



**Figure 74. Immunoperoxydase de TNFR1 en pré-enrobage dans le cortex cérébelleux de souris infectées par 22L i.c. au stade clinique 139 jpi.** **A.** Travée d'immunoréactivité de TNFR1 (flèches) entre deux zones immunonégatives (étoiles). Echelle = 2  $\mu$ m. **B.** TNFR1 est détecté à la membrane des filaments gliaux (têtes de flèche) enveloppant les synapses établies par les terminaisons présynaptiques de fibres parallèles (\*) sur les épines dendritiques postsynaptiques de cellule de Purkinje (d). **C, D.** Même légende que **B.** Noter l'intensité de l'immunomarquage TNFR1 au niveau des prolongements gliaux au contact des épines dendritiques de cellule de Purkinje. **B-D.** Echelle = 500 nm.

### Etude III

#### Résumé et conclusions

Les prions 22L provoquent la prolifération des cellules microgliales dans l'ensemble du tissu cérébelleux et une gliose astrocytaire dans les régions d'accumulation de PrP<sup>22L</sup> et de perte des cellules de Purkinje.

Le récepteur TNFR1 à la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  augmente à proximité des cellules de Purkinje survivantes en dehors des dépôts de PrP<sup>22L</sup>.

TNFR1 est localisé à la membrane des prolongements astrocytaires pérисynaptiques en particulier au contact des épines dendritiques post-synaptiques des cellules de Purkinje.

**L'augmentation de TNFR1 dans le cervelet infecté *in vivo* n'est pas localisée aux membranes neuronales comme *in vitro* dans les cultures de neurones infectés. Des mécanismes différents pourraient sous-tendre cette augmentation *in vivo* et *in vitro*.**



# DISCUSSION

Ma thèse porte sur des questions majeures de neurobiologie ayant trait aux fonctions de la protéine prion dans la neuroprotection et le contrôle de la survie neuronale et qui dépassent le contexte des maladies à prions de par la place critique de cette protéine dans la maladie d'Alzheimer par exemple (Pietri et al. 2013 ; Kudo et al., 2013 ; Forloni et al., 2013 ; Rial et al., 2012). La protéine prion cellulaire interagit en effet avec le peptide A $\beta$ , suggérant l'existence d'un mécanisme neurotoxique commun à ces deux maladies (Laurén et al., 2009 ; Benilova & De Stropper, 2010 ; Chen et al., 2013). Dans le cervelet, une structure cérébrale simple, bien connue et très sensible aux dérèglements de la protéine prion, les déficits d'origine transgénique ou infectieuse de cette protéine constituent des modèles intéressants dans lesquels mes études ont tenté d'approfondir notre connaissance des mécanismes neurodégénératifs qu'elle contrôle dans le système nerveux central. Ainsi, le contrôle de l'apoptose et de l'autophagie par la protéine prion a été étudié dans les cellules de Purkinje du cervelet de souris mutantes déficientes en PrP<sup>C</sup>. Aussi, des paramètres endogènes et des mécanismes moléculaires de la neurotoxicité des prions infectieux et de l'abolition des fonctions de la protéine prion cellulaire ont été analysés dans le cervelet de souris infectées expérimentalement.

Dans les trois études expérimentales présentées, je me suis intéressée à la mort des neurones cérébelleux et en particulier des cellules de Purkinje, provoquée par la neurotoxicité de la protéine Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup> dans le cervelet des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* d'une part et par la protéine prion infectieuse PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet de souris d'autre part. J'ai pu mettre en évidence l'activation par Dpl d'une voie autophagique indépendante de la voie apoptotique dépendante de BAX activée dans les cellules de Purkinje *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*. Aussi, j'ai caractérisé des populations neuronales plus sensibles à la neurotoxicité de PrP<sup>22L</sup> et impliqué l'organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet comme un paramètre déterminant de la neurodégénérescence induite par les prions dans le cervelet. Enfin, j'ai recherché des corrélats anatomopathologiques entre l'inflammation et la mort neuronale dans le cervelet infecté par les prions et j'ai caractérisé l'expression du récepteur TNFR1 à la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  dans le cervelet au cours de la neurodégénérescence induite par les prions.

## **Etude I. Apoptose et autophagie neuronales dans le cervelet des souris *Prnp<sup>0/0</sup>* déficientes en protéine prion**

En l'absence de PrP<sup>C</sup>, l'expression ectopique de Dpl provoque la mort prématurée des cellules de Purkinje dans le cervelet des souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* par apoptose dépendante de BAX et par une autre voie dont l'existence est suggérée par un certain degré de perte des cellules de Purkinje chez les doubles mutants *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> ; Bax<sup>-/-</sup>* et par la dérégulation du flux autophagique dans ces neurones (Heitz et al., 2006, 2007). L'objectif de cette première étude est de déterminer la place de l'autophagie dans le mécanisme neurodégénératif induit par la condition *Ngsk*. En d'autres termes, le dérèglement autophagique observé dans les cellules de Purkinje *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* conduit-il à la mort neuronale par une voie indépendante de l'apoptose dépendante de BAX ?

## 1. Autophagie dans les cellules de Purkinje du double mutant Ngsk $Prnp^{0/0}$ : $Bax^{-/-}$

### 1.1. L'activation de l'autophagie et son dérèglement semblent indépendants de BAX dans les cellules de Purkinje Ngsk $Prnp^{0/0}$

L'observation des cellules de Purkinje du double mutant Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  en microscopie électronique par transmission révèle l'accumulation anormale d'autophagosomes et autolysosomes comme dans les cellules de Purkinje des mutants Ngsk  $Prnp^{0/0}$  (Heitz et al., 2009, 2010). Une autophagie anormale semble donc maintenue dans les cellules de Purkinje Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  en dépit de l'absence de BAX, suggérant l'implication d'une voie indépendante de BAX dans la mort de ces neurones. L'accumulation d'autolysosomes dans les cellules de Purkinje Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  suggère aussi que le flux autophagique s'est enrayé et n'aboutit plus à l'élimination des autolysosomes, comme chez Ngsk  $Prnp^{0/0}$  (Heitz et al., 2010).

L'analyse quantitative des cellules de Purkinje autophagiques chez les mutants Ngsk  $Prnp^{0/0}$  et Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  montre une diminution de la proportion des cellules de Purkinje autophagiques dans le cervelet double mutant Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  par rapport à la proportion mesurée chez Ngsk  $Prnp^{0/0}$ , suggérant que l'autophagie n'est pas activée dans les cellules de Purkinje sauvées par la suppression de BAX. De ce fait, des cellules de Purkinje affectées par un dysfonctionnement de l'autophagie et des cellules de Purkinje non autophagiques pourraient co-exister dans le cervelet des mutants Ngsk  $Prnp^{0/0}$ . Il est possible que certaines cellules de Purkinje répondent à Dpl par l'apoptose BAX-dépendante et d'autres par un dysfonctionnement autophagique. Cette hypothèse est soutenue par la sensibilité plus grande à la condition Ngsk  $Prnp^{0/0}$  des cellules de Purkinje exprimant la zébrine II (Heitz et al., 2008). Cependant, les proportions de cellules de Purkinje autophagiques ne présentent pas de différence significative entre les niveaux antérieur et postérieur respectivement pauvre et riche en neurones exprimant la zébrine II (Apps & Hawkes, 2009). Par ailleurs, on ne peut exclure qu'alternativement, la suppression de BAX ait un effet neuroprotecteur dans toutes les cellules de Purkinje. Cet effet retarderait les conséquences neurotoxiques de la condition Ngsk  $Prnp^{0/0}$  et se traduirait par une diminution de l'intensité de la réponse autophagique et par le ralentissement de la perte neuronale dans cette population.

Aussi, le cervelet des souris Ngsk  $Prnp^{0/0}$  contient plus de cellules de Purkinje autophagiques de type 2 (autophagie modérée) et 3 (autophagie robuste) que le cervelet des souris Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$ , suggérant que les cellules autophagiques de type 2 sont probablement des cellules de Purkinje en passe de développer une forte autophagie (type 3). Le maintien d'une proportion équivalente de cellules de Purkinje autophagiques d'un âge à l'autre dans le cervelet des souris Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  indique que l'autophagie est activée dans les cellules de Purkinje Ngsk  $Prnp^{0/0}$  :  $Bax^{-/-}$  par un mécanisme indépendant du vieillissement. Cependant, la diminution apparente de la proportion de ces neurones autophagiques à 6,5 mois pourrait résulter de l'augmentation de certains facteurs neuroprotecteurs en réponse à la première vague de mort neuronale subie par les cellules de Purkinje Ngsk.

## 1.2. Dpl semble être responsable de l'activation de l'autophagie dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>

L'absence de cellules de Purkinje autophagiques dans le cervelet des souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> suggère que l'absence de PrP<sup>C</sup> n'est pas impliquée dans l'activation de l'autophagie dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, impliquant que Dpl en est seule responsable. Par contre, l'absence de PrP<sup>C</sup> pourrait contribuer à l'enrayement de l'autophagie activée par Dpl dans les cellules Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>. En effet, un dysfonctionnement autophagique en réponse au stress oxydatif a été récemment montré *in vitro* dans les neurones de l'hippocampe déficients en PrP<sup>C</sup> (Oh et al., 2012) et illustré *in situ* dans les neurones du cortex et de l'hippocampe des souris ZH-I (Shin et al., 2014). Les raisons de cette contradiction avec mes observations dans le cervelet de ce mutant pourraient tenir à la spécificité des cellules de Purkinje ou bien à la petite taille de l'échantillon de cervelet de souris ZH-I que j'ai analysé dans le cadre de mes travaux de Thèse.

Au-delà de la nécessité de compléter l'étude quantitative de l'autophagie dans les cellules de Purkinje des mutants *Prnp*<sup>0/0</sup> afin qu'elle satisfasse aux critères statistiques, plusieurs perspectives sont ouvertes par mes résultats. Une première approche visant à mettre en évidence l'expression de marqueurs de l'autophagie (LC3-II, p62, Bécline-1, GABARAP-II, GATE16-II, Kabeya et al., 2000, 2005) dans les cellules de Purkinje des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> permettrait de visualiser les cellules de Purkinje autophagiques à l'échelle histologique (immunohistochimie) afin de les quantifier plus aisément qu'en microscopie électronique. Le double marquage pour révéler simultanément l'autophagie et l'apoptose (annexine V, caspase-3 active), permettrait d'évaluer la contribution respective des deux processus à la neurotoxicité induite par la condition Ngsk dans les cellules de Purkinje.

Des travaux réalisés ces dernières années par mon équipe et d'autres groupes ont montré que l'autophagie était initiée dans les terminaisons axonales des cellules de Purkinje dans plusieurs modèles de pathologies affectant ces neurones (Heitz et al., 2010). L'analyse quantitative de l'autophagie dans les terminaisons axonales des cellules de Purkinje à l'échelle histologique et/ou ultrastructurale dans les noyaux profonds du cervelet (Heitz et al., 2008) devrait confirmer au niveau terminal, la différence observée au niveau somatique entre Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup>. Enfin, si l'autophagie dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> participe à la mort neuronale, son inhibition/blocage devrait protéger ces neurones. L'administration chronique d'un traitement pharmacologique inhibiteur de l'autophagie (3-méthyladénine) devrait permettre de confirmer cette hypothèse. A l'inverse, on s'attend à ce que la stimulation de l'autophagie par la rapamycine aggrave la mort neuronale dans le cervelet de ces mutants (Yue et al., 2014).

L'étude des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'intervention de PrP<sup>C</sup> et Dpl dans l'autophagie et l'apoptose des cellules de Purkinje n'est à priori pas réalisable sans difficultés *in situ* chez l'animal et j'ai pour cette raison mis en place un système de cultures organotypiques de tranches de cervelet afin d'étudier par une approche mécanistique, les voies de mort neuronale activées dans les cellules de Purkinje déficientes en protéine prion. J'ai ensuite évalué la faisabilité d'une telle approche dans le cervelet infecté par les prions.

## 2. Les cultures organotypiques de cervelet, un système pour l'étude des mécanismes neurodégénératifs induits par l'absence de PrP<sup>C</sup> et les prions

### 2.1. L'absence de PrP<sup>C</sup> empêche un développement normal des cellules de Purkinje *Prnp*<sup>0/0</sup> en culture organotypique.

La mesure du développement morphologique des cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques révèle que les cellules de Purkinje mutantes déficientes en PrP<sup>C</sup> ZH-I et Ngsk ne se développent pas comme les cellules de Purkinje sauvages qui augmentent significativement leur taille et leur extension dendritique au cours de la période de culture. Aussi, l'expression d'un seul allèle *Prnp* chez les souris Ngsk hétérozygotes ne rétablit pas le développement normal des cellules de Purkinje. La restriction de l'expression de Dpl aux seuls neurones chez une souris ZHI-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (souris NSE-Dpl *Prnp*<sup>0/0</sup>) indique que la délétion de *Prnp* spécifique de Ngsk n'est pas elle-même responsable du déficit de croissance neuronale. Ces constatations suggèrent que Dpl non plus n'est pas impliquée dans le déficit de croissance. Il est plus probable que l'absence de PrP<sup>C</sup> commune aux conditions exprimant et n'exprimant pas Dpl cause l'arrêt du développement des cellules de Purkinje à 7 jours de culture. En effet, cette hypothèse est en accord avec le rôle de PrP<sup>C</sup> dans le développement neuronal, notamment par la liaison de PrP<sup>C</sup> à la NCAM ou la laminine (Santuccione et al., 2005 ; Chen et al., 2003). Le déficit de croissance des cellules de Purkinje *Prnp*<sup>0/0</sup> très probablement annonce la mort neuronale proprement dite.

### 2.2. L'absence de PrP<sup>C</sup> semble être responsable de la mort des cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques de cervelet

La neurotoxicité propre de Dpl provoque la mort des cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> *in vivo* (Moore et al., 2001 ; Li et al., 2000 ; Heitz et al. 2007, 2008 ; Lemaire-Vieille et al., 2013). Le comptage des cellules de Purkinje dans les tranches de cervelet de souris sauvages et mutantes *Prnp*<sup>0/0</sup> en culture organotypique montre une perte significative des cellules de Purkinje dès 7 jours de culture dans le cervelet de toutes les souris déficientes en PrP<sup>C</sup>. La perte de cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques de cervelet sauvage entre 3 et 21 jours est vraisemblablement attribuable aux conditions de culture. La perte des cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> n'est pas significative après 3 et 5 jours de culture alors qu'elle est environ deux fois plus importante à 7 jours que la perte subie par la population des cellules de Purkinje sauvages de 3 à 7 jours. Ceci suggère qu'au cours d'une période critique entre 5 et 7 jours de culture, un mécanisme neurotoxique spécifique s'ajoute aux effets neurotoxiques des conditions de culture dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>. Un phénomène similaire a lieu dans les cultures de cervelet des souris NSE-Dpl *Prnp*<sup>0/0</sup> qui expriment un transgène codant Dpl dans les neurones indiquant que la seule expression neuronale de Dpl ne modifie pas la cinétique et l'amplitude de la perte des cellules de Purkinje. Ceci pourrait suggérer que l'expression neuronale de Dpl est suffisante pour provoquer la mort des cellules de Purkinje *Prnp*<sup>0/0</sup> en culture organotypique. Or la cinétique et l'amplitude de la perte des cellules de Purkinje ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> qui n'expriment pas Dpl sont similaires au cours de toute la période de culture (21 jours) et en particulier au cours de la période critique entre 5 et 7 jours de culture, suggérant que la mort des cellules de Purkinje Ngsk, NSE-Dpl et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> est plutôt causée par l'absence de PrP<sup>C</sup> commune aux trois conditions. De façon tout à fait surprenante, les taux de CaBP mesurés en Western blot ne changent pas entre 3 et 7 jour dans les cultures ZH-I voire même augmentent dans les cultures Ngsk ne reflétant pas la perte des cellules de Purkinje au cours de cette période critique. Une dérégulation des flux calciques déjà décrite dans les

neurones *Prnp*<sup>0/0</sup> de l'hippocampe (Fuhrmann et al., 2006), les cellules granulaires *Prnp*<sup>0/0</sup> (Lazzari et al., 2011) et les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> du cervelet (Lee et al., 2010) pourrait en être la cause.

Des études antérieures ont montré que PrP<sup>C</sup> a des fonctions neuroprotectrices (Brown & Sassoon, 2002 ; Kim et al., 2004 ; Laroche-Pierre et al., 2009) et son abolition dans les cellules de Purkinje Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> pourrait exacerber la sensibilité de ces neurones aux conditions de culture organotypique. PrP<sup>C</sup> peut agir comme une superoxyde dismutase (SOD) et moduler l'activité de SOD en liant les ions Cu<sup>2+</sup> via son domaine de répétition d'octapeptides situé en N-terminal (Brown et al., 1997a, 1997b). PrP<sup>C</sup> lutte contre le stress oxydatif induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des cultures de neurones hippocampiques *Prnp*<sup>+/+</sup> ou *Prnp*<sup>0/0</sup>, les neurones *Prnp*<sup>0/0</sup> étant moins résistants au stress oxydatif induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confirmant les propriétés neuroprotectrices de PrP<sup>C</sup> (Oh et al., 2012). Or, la perte prématurée des cellules de Purkinje *in vivo* chez l'animal Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> est causée directement par un mécanisme neurotoxique déclenché par Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup> (Sakaguchi et al., 1996 ; Moore et al., 2001 ; Heitz et al., 2008). La seule absence de PrP<sup>C</sup> ne suffit pas à causer la mort des cellules de Purkinje *in vivo* chez les mutants ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (Moore et al., 2001). Dans les cultures organotypiques de cervelet, l'absence de PrP<sup>C</sup> et même la seule diminution de son expression chez l'hétérozygote Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> semble aggraver la sensibilité des cellules de Purkinje aux déficits liés aux conditions de culture (avant 7 jours de culture). Ainsi, bien que Dpl soit exprimée dans le cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> en culture organotypique comme le montre mon analyse en Western blot, les effets neurotoxiques de Dpl qui sont significatifs dès 6 mois *in vivo* dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (Heitz et al., 2008) pourraient ne pas encore être effectifs au cours de la trop courte période de culture. Dans le cervelet de souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> *in vivo*, les premières pertes de cellules de Purkinje ont été détectées à 3 mois au plus tôt suggérant que jusqu'à cette période, l'effet neurotoxique de Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup> requiert une maturation des cellules de Purkinje et de leurs connections. On sait en effet que le développement postnatal du principal circuit du cortex cérébelleux n'est complètement achevé qu'à l'âge de 90 jours (Altman & Bayer, 1997). Dans les cultures organotypiques, les cellules de Purkinje ont au maximum 29 jours (8 au jour de mise en culture + 21 jours *in vitro*), âge auquel la neurotoxicité de Dpl n'est pas effective *in vivo* et pourrait ne pas être responsable de la mort des cellules de Purkinje. En faveur de la responsabilité du déficit de *Prnp* plutôt que de la neurotoxicité de Dpl, la perte des cellules de Purkinje est similaire dans les cultures de cervelet hétérozygote Ngsk *Prnp*<sup>+/-</sup> et Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> au cours de la période de culture. Ainsi, l'absence d'un seul allèle *Prnp* a un effet neurotoxique similaire à celui de l'absence des deux allèles, la perte des cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> ne pouvant être compensé par un allèle *Prnp* unique ce qui n'est pas le cas *in vivo* où la neurotoxicité de Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup> peut au contraire être antagonisée par la restauration d'un seul allèle *Prnp* (Sakaguchi et al., 1996).

### 2.3. L'autophagie et l'apoptose sont activées dans les cultures organotypiques de cervelets déficients en protéine prion

La mort neuronale induite par Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup> peut être partiellement supprimée par la délétion de *Bax* chez les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> ou par la surexpression de *Bcl-2* humain chez les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>-*Hu-Bcl-2*, indiquant qu'une voie apoptotique mitochondriale participe à la mort neuronale dans le cervelet des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (Heitz et al., 2007 et 2008). L'augmentation des marqueurs d'autophagie LC3-II et p62 et la présence de nombreux organites autophagiques dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> *in vivo* montre que l'autophagie était activée puis bloquée au stade des autolysosomes dans ces neurones (Heitz et al., 2009, 2010). En effet, LC3-II et p62 ainsi que LAMP-1 sont augmentés dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>. Dans les

cultures organotypiques de cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, l'analyse en Western blot montre une augmentation de LC3-II, p62 et bécline-1 entre 3 et 7 jours, indiquant que les cellules Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> pourraient être le siège d'une forte autophagie pendant la période critique de neurodégénérescence des cellules de Purkinje. L'examen des cultures organotypiques à 7 et 12 jours en microscopie électronique par transmission montre une autophagie intense dans ces neurones, même après la période critique de mort neuronale (entre 3 et 7 jours). L'autophagie pourrait témoigner d'une réponse neuroprotectrice et/ou de l'activation d'une voie de mort neuronale par la condition Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> *in vitro*.

L'augmentation des marqueurs LC3-II, p62 et bécline-1 dans les cultures de cervelet ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> indiquent que l'absence de PrP<sup>C</sup> est suffisante pour activer l'autophagie chez ce mutant. Des ARN interférents qui inhibent le transcrite *Prnp* provoquent l'activation de l'autophagie dans des cellules gliales en culture et la mort cellulaire dépendante de l'autophagie, indiquant que PrP<sup>C</sup> module l'autophagie et la mort cellulaire dans ce système (Barbieri et al., 2011). Le stress oxydatif induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des cultures neuronales hippocampiques provoque l'augmentation de l'autophagie qui est plus forte dans les neurones *Prnp*<sup>0/0</sup> que *Prnp*<sup>+/+</sup> du fait d'un blocage du flux autophagique qui contribue à la mort neuronale (Oh et al., 2012). De plus, l'autophagie n'est pas perturbée dans les neurones *Prnp*<sup>+/+</sup> et *Prnp*<sup>0/0</sup> en absence de stress oxydatif, indiquant que l'absence de PrP<sup>C</sup> ne provoque le blocage du flux autophagique qu'en condition de stress. Une étude récente montre néanmoins que l'absence de PrP<sup>C</sup> est suffisante pour induire le blocage de l'autophagie au stade de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes dans l'hippocampe des souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (Shin et al., 2014). Dans les cultures organotypiques de cervelet *Prnp*<sup>0/0</sup>, les conditions de culture combinées à l'absence de PrP<sup>C</sup> pourraient conduire au blocage de l'autophagie et contribuer à la mort des cellules de Purkinje mutantes *Prnp*<sup>0/0</sup>.

L'immunochimie détecte une quantité importante de marqueur lysosomal LAMP-1 dans les cultures organotypiques de cervelet de souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>, mais pas ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> ni sauvage à 7 jours. LAMP-1 est impliqué dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et son augmentation pourrait témoigner d'une autophagie plus intense dans les cultures Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> ou bien d'un blocage de l'autophagie au stade de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, comme c'est le cas *in vivo* dans les cellules de Purkinje Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (Heitz et al., 2009, 2010).

L'activation du marqueur apoptotique caspase-3 mesurée par Western blot révèle l'activation de l'apoptose dans les cultures organotypiques de cervelet Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> après 3 jours de culture. La faible activation de caspase-3 dans les cultures de cervelet sauvage de 3 jours est vraisemblablement due aux conditions de culture. L'activation de caspase-3 est plus intense après 3 jours de culture chez Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> que chez ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> où elle reste active à 5 jours de culture, révélant qu'une cinétique apoptotique différente distingue les deux mutants mais aboutit à un bilan identique de mort des cellules de Purkinje à 7 jours. Ainsi, l'activation de l'apoptose semble plus aigüe chez Ngsk que chez ZH-I où la mort neuronale est plus progressive jusqu'à 5 jours. Ces résultats suggèrent que la mort neuronale pourrait avoir des modalités différentes dans les cultures organotypiques Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup>.

Mes observations suggèrent que les deux voies autophagique et apoptotique sont activées parallèlement ou consécutivement dans les cellules Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup>. Dans l'état actuel de mes travaux, les types cellulaires concernés par l'apoptose n'ont pas été déterminés. Les cellules granulaires n'ont pas été quantifiées dans les cultures organotypiques au cours de la période critique. Il est probable que les cellules de Purkinje soient concernées par l'apoptose, comme l'indiquent les pertes neuronales importantes subies par cette population dans les cultures Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>. L'augmentation du marqueur de la glie astrocytaire GFAP entre 3 et 7 jours de culture indique que les astrocytes prolifèrent dans les tranches de cervelet et ne sont donc vraisemblablement pas le siège de l'apoptose brutale détectée par l'augmentation de caspase-3.

#### 2.4. Réaction microgliale et astrocytaire dans les cultures organotypiques de cervelet

L'immunofluorescence d'Iba-1 marqueur de la microglie active dans les cultures sauvages et Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> y révèle une activation microgliale similaire suggérant que les conditions de culture sont suffisantes à son induction qui n'est pas modifiée par l'absence de PrP<sup>C</sup> dans les cultures *Prnp*<sup>0/0</sup>. Cependant, si l'expression du marqueur astrocytaire GFAP augmente dans les cultures de cervelet sauvage, Ngsk et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup>, elle est plus intense dans les cultures de cervelets déficients en protéine prion sans doute en réaction à la perte neuronale plus importante, comme c'est le cas *in vivo* dans le cervelet des souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (Heitz et al., 2008).

#### 2.5. Les cultures organotypiques de cervelet constituent un système *ex vivo* adéquat pour étudier les mécanismes neurodégénératifs induits par la tremblante adaptée à la souris

Mes premières expériences visant à infecter des cultures organotypiques de cervelet par des souches de tremblante pour y étudier les mécanismes neurodégénératifs qu'ils induisent dans un système proche du vivant mais plus apte à l'expérimentation, sont assez encourageantes. En effet, les histoblots montrent que, comme dans le cervelet *in vivo*, PrP<sup>22L</sup> et PrP<sup>139A</sup> se forment dans une mesure compatible avec la période « utile » des cultures organotypiques de cervelet. Aussi, 22L et 139A induisent une perte importante de cellules de Purkinje indiquant que ces prions sont capables d'exercer leurs effets neurotoxiques dans ce système *ex vivo*. En accord avec les données de la littérature qui montrent que les souris *Prnp*<sup>0/0</sup> ne peuvent être infectées par les prions (Mallucci et al., 2003), les cultures mutantes ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> ne sont pas concernées par l'augmentation des dépôts de PrP<sup>Sc</sup>.

En résumé, mes résultats valident les cultures organotypiques pour l'étude mécanistique de la dégénérescence induite par les prions et la perte des fonctions de PrP<sup>C</sup> dans les modèles *Prnp*<sup>0/0</sup>. L'observation des cellules de Purkinje en microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques infectées y révèle une autophagie importante à l'instar de l'autophagie activée dans les cellules de Purkinje du cervelet de souris infectées par PrP<sup>22L</sup> et PrP<sup>139A</sup> *in vivo*. Ces observations amènent à poursuivre l'étude de la place de l'autophagie dans la mort des cellules de Purkinje infectées et des modalités de la mort neuronale dans les autres populations neuronales présentes dans les cultures organotypiques de cervelet. D'autres souches de prions pourront être utilisées dans de futures études qui pourront être poursuivies à des stades encore plus avancés (40 jpi).

En particulier, des organites aberrantes qui semblent avoir une origine ergastoplasmique et se sont formées dans les CPs infectées demandent à être étudiées à l'aide de marqueurs du réticulum endoplasmique granuleux et ce, également dans d'autres types neuronaux comme les neurones de l'hippocampe par exemple (Stoppini et al., 1991). Lorsque les caractéristiques des cultures organotypiques de cervelet de souris seront bien déterminées sur le plan de la mort neuronale et de la spécificité des réponses cellulaires à l'infection par les différentes souches de prion, il s'agira d'utiliser ce système pour mettre en œuvre des approches pharmacologiques et de biologie moléculaire (transfection, siRNA) pour connaître les mécanismes neurolytiques activés par les prions dans les neurones cérébelleux (apoptose et autophagie). La connaissance précise des cascades d'interaction moléculaires qui sous-tendent la réponse neuronale aux prions dans ce système d'infection *ex vivo* devrait permettre les études pharmacologiques nécessaires à la mise au point de traitements thérapeutiques contre la mort neuronale.



## Etude II. Compartimentation anatomique de la pathogenèse des prions dans le cervelet de souris

La spécificité des effets neurodégénératifs des prions dans le cerveau est déterminée par des paramètres liés à la « souche » de prion et à la voie par laquelle les prions accèdent au cerveau (qui sous-entend des étapes de réplication et de conversion différentes d'une voie à l'autre) et des paramètres cellulaires endogènes très mal connus (Guentchev et al., 1997 ; Belichenko et al., 1999). J'ai commencé mon doctorat au moment où l'on venait de découvrir au laboratoire que la tremblante 22L provoquait la formation de dépôts de PrP<sup>Sc</sup> dans le cortex cérébelleux de souris selon un patron de bandes rappelant celui de la compartimentation parasagittale du cervelet. Cette deuxième étude a visé à caractériser les effets neurodégénératifs de 22L dans le cervelet de souris et à analyser leur relation topographique avec le patron de déposition de PrP<sup>22L</sup> et de la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cervelet afin d'en déterminer la signification physiopathologique et l'importance dans la pathogenèse des prions.

### 1. PrP<sup>22L</sup> précipite suivant un patron de bandes parasagittales dans le cortex cérébelleux

La neuroinvasion du cervelet par les prions 22L i.cb. débute au stade préclinique par un envahissement progressif des noyaux profonds et forme des dépôts diffus dans la couche granulaire interne souvent étendus par des travées verticales dans la couche moléculaire du cervelet. Il en est de même après inoculation extracérébelleuse i.c. et i.p. Plus tard dans les périodes précliniques et cliniques, les travées de PrP<sup>22L</sup> forment des bandes à forte immunoréactivité dans la couche moléculaire poursuivies par des dépôts plus polymorphes dans la couche granulaire sous-jacente. Cette correspondance des bandes de dépôts à travers les couches moléculaire et granulaire interne suggère l'existence d'un paramètre commun aux deux domaines du cortex cérébelleux. Des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> en travées verticales dans le cortex cérébelleux sont décrits dans certaines formes sporadiques (Armstrong & Cairns, 2003) et familiales de MCJ (polymorphisme au codon 129 ; Jarius et al., 2003 ; Xiao et al., 2013a). Dans ces maladies, les dépôts de PrP<sup>Sc</sup> sont perpendiculaires ou transverses à l'orientation du folium dans la couche moléculaire du cervelet et semblent associés respectivement aux fibres grimpantes provenant de l'olive inférieure et aux fibres parallèles des cellules granulaires (Jarius et al., 2003). Aussi, des travaux menés chez des modèles murins expérimentaux infectés par la souche de tremblante ME7 et 22L évoquent brièvement une déposition de PrP<sup>Sc</sup> en travées et en bandes dans la couche moléculaire du cervelet (Cunningham et al., 2005 ; Bruce et al., 1991). En revanche, la souche 6PB1 d'ESB précipite sous forme de petites plaques dans la couche granulaire interne et la couche moléculaire et de fins dépôts polymorphes dans la couche granulaire interne du cortex cérébelleux. Cette forme de déposition de PrP<sup>6PB1</sup> ressemble à celle décrite dans le cervelet de patients atteints de MCJ d'origine sporadique (Ferrer et al., 2000). Ces résultats confirment que la souche de prion est un facteur important influençant la forme et la topographie des dépôts amyloïdes de PrP<sup>Sc</sup> dans le tissu cérébral.

Le « banding » de l'accumulation de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux suit un patron topographique reproductible d'un animal à l'autre indépendamment de la voie de la neuroinvasion. Aucune différence majeure du nombre de bandes ni de leur localisation n'est relevée dans le cortex cérébelleux entre les souris infectées par 22L i.cb, i.c. et i.p. Ceci suggère qu'un paramètre en relation avec la structure compartimentée du cortex

cérébelleux détermine la topographie de la précipitation de PrP<sup>22L</sup>. Un tel paramètre pourrait être en lien avec la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cervelet qui consiste en une division parasagittale du cortex cérébelleux en compartiments composés de sous-groupes de cellules de Purkinje en relation synaptique avec des afférences et des cibles spécifiques. En effet, les marqueurs de cette compartimentation révèlent les sous-groupes de cellules de Purkinje suivant un patron très semblable à celui de PrP<sup>22L</sup> (Hawkes et al., 2014). L'accumulation de PrP<sup>MCJ</sup> selon un patron topographique le long du folium du cervelet de patients atteints de MCJ d'origine familiale et sporadique suggère que les connexions du cervelet participent au schéma topographique de la neuroinvasion de cette structure par les prions (Armstrong & Cairns, 2003 ; Jarius et al., 2003 ; King et al., 2003 ; Xiao et al., 2013a). Cependant, la similitude du patron de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux des souris inoculées i.p. à ceux des souris inoculées i.c. et i.cb. suggère que la topographie des connexions afférentes et efférentes des cellules de Purkinje n'influence pas celle du patron de PrP<sup>22L</sup> de manière déterminante. La topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> subit cependant de fortes variations interindividuelles, allant, dans certaines régions du cortex cérébelleux d'une quasi-absence de PrP<sup>22L</sup>, à l'envahissement par des dépôts très denses au même stade de la maladie. Ces irrégularités du patron de PrP<sup>22L</sup> peuvent avoir plusieurs causes dont en premier lieu la variabilité interindividuelle de la neuroinvasion et de la sensibilité aux effets des prions d'une part, et les variations des conditions expérimentales concernant les doses et les sites d'injection en particulier i.c. et i.cb. d'autre part. Ainsi, on peut observer des bandes de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux de certaines souris qui ne sont pas encore formées chez un autre animal au même stade théorique de la maladie. A l'inverse, une bande de PrP<sup>22L</sup> formée à un stade précoce de la maladie peut s'être ensuite étendue aux bandes voisines à un stade plus avancé de la maladie et s'accumuler dans le cortex du lobule entier, masquant ainsi le patron initial de déposition de PrP<sup>22L</sup>. Par ailleurs, les bandes PrP<sup>22L</sup> sont en général symétriquement bilatérales de part et d'autre de la ligne médiane mais dans certains cas, peuvent n'être qu'unilatérales à un stade de la maladie. Cette dissymétrie peut s'expliquer par le fait que les injections ont été réalisées unilatéralement i.c. dans le cortex cérébral et i.cb. dans le cervelet.

## **2. La topographie des bandes de dépôts de PrP<sup>22L</sup> est semblable à celle de l'expression d'EAAT4**

Les patrons topographiques des dépôts de PrP<sup>22L</sup> et de l'expression d'eGFP dans le cortex cérébelleux sont superposables dans le cervelet des souris EAAT4 eGFP inoculées i.c. et i.cb. Ceci suggère que la compartimentation anatomique du cervelet influence la production et/ou l'accumulation de PrP<sup>22L</sup> dans le cortex cérébelleux et constitue un paramètre endogène local de la neuroinvasion par cette souche de prion. Les bandes de cellules de Purkinje orientées dans le plan parasagittal reçoivent des afférences spécifiques et émettent des projections efférentes spécifiques vers les noyaux profonds, constituant des modules cérébelleux, unités fonctionnelles du cervelet (Apps & Hawkes, 2009 ; Ruigrok, 2011). En fonction de la voie d'inoculation, les prions 22L empruntent différentes routes de la périphérie vers le SNC puis gagnent le cortex cérébelleux par les fibres afférentes et efférentes du cervelet. L'absence de différences majeures entre les patrons de déposition de PrP<sup>22L</sup> i.cb, i.c. et i.p. suggère que les prions rejoignent le cortex cérébelleux par les mêmes voies afférentes et/ou efférentes dans le cervelet provoquant *in fine* la dégénérescence de sous-groupes de cellules de Purkinje (bandes) spécifiques.

Ainsi, la neuroinvasion du cortex cérébelleux et ses conséquences neuropathologiques semblent suivre un patron topographiquement identique à celui de la compartimentation des zébrines telles qu'EAAT4. Cependant, si

la topographie des bandes est identique, PrP<sup>22L</sup> précipite dans les bandes exprimant la zébrine EAAT4 dans le vermis et dans les bandes ne l'exprimant pas dans les hémisphères chez les animaux inoculés i.c. Cette différence est inversée chez les animaux inoculés i.p. ce qui suggère une influence de la voie d'inoculation sur les voies de neuroinvasion empruntées par les prions jusqu'au cortex cérébelleux. L'influence de la voie d'inoculation sur la signature lésionnelle d'une souche de prions dans le cerveau a été démontrée par de nombreuses études (Lasmézas et al., 1996 ; Fraser, 1976).

Aux stades cliniques assez avancés de la maladie que j'ai étudiés, certaines régions ne présentent toutefois pas une correspondance aussi précise des deux patrons. La disparition de nombreuses cellules de Purkinje qui empêche la délimitation précise des bandes de zébrine aux stades cliniques est une explication plausible des défauts de corrélation topographique observés. Aussi, les bandes PrP<sup>22L</sup> formées à un stade précoce s'élargissent et envahissent progressivement les compartiments voisins chevauchant de ce fait des bandes EAAT4(+) et EAAT4(-) à un stade plus avancé. D'autre part, dans le lobule X qui est entièrement constitué de CPs EAAT4(+), PrP<sup>22L</sup> forme une bande centrale et une bande latérale symétrique de part et d'autre de la ligne médiane. Ce patron semble correspondre au patron d'expression de la protéine Hsp25 (*heat shock protein 25*; Armstrong et al., 2000b). Hsp25 est une molécule chaperone impliquée dans la neuroprotection en condition de stress et dans la tolérance au stress (Jakob et al., 1993). Elle est exprimée uniquement dans des bandes parasagittales des lobules VI, VII, IX et X du vermis dont la correspondance avec les bandes PrP<sup>22L</sup> demande à être confirmée. Cependant, ces bandes formées par PrP<sup>22L</sup> dans le lobule X ont perdu des cellules de Purkinje EAAT4(+).

### 3. PrP<sup>22L</sup> et perte neuronale coïncident topographiquement

Le double marquage des cellules de Purkinje et de PrP<sup>22L</sup> montre que PrP<sup>22L</sup> s'accumule dans les espaces où les cellules de Purkinje sont absentes. Ceci suggère que les cellules de Purkinje ne présentent pas la même vulnérabilité à la neurotoxicité de PrP<sup>22L</sup>, certaines bandes étant atteintes plus tôt que d'autres. Aux stades préclinique et clinique, PrP<sup>22L</sup> s'est accumulée dans la couche moléculaire de régions où l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje a dégénéré (travées) ou de régions d'où les cellules de Purkinje ont disparu (travées et bandes), suggérant une corrélation entre PrP<sup>22L</sup> et la mort des cellules de Purkinje (Müller et al., 1993 ; Forloni et al., 1993 ; Williams et al., 1997 ; Novitskaya et al., 2006). Plus précisément, la formation de travées de PrP<sup>22L</sup> dans la couche moléculaire de régions où les dendrites ont dégénéré mais où le soma des cellules de Purkinje est encore visible suggère que la dégénérescence des cellules de Purkinje commence au niveau des dendrites. Cette constatation est en accord avec les observations d'autres auteurs (Sisková et al., 2013) qui montrent que la dégénérescence des cellules de Purkinje commence au niveau post-synaptique des dendrites dans le cervelet de souris infectées par 22L. Cette corrélation topographique de PrP<sup>22L</sup> et de la mort neuronale s'étend aussi à la spongiose dans la couche moléculaire où l'augmentation du nombre de vacuoles est significative dans les bandes PrP<sup>22L</sup> aux stades cliniques. La corrélation topographique de la déposition de PrP<sup>MCJ</sup> et de la spongiose est observée dans la couche moléculaire du cervelet de patients atteints de MCJ d'origine sporadique (Armstrong & Cairns, 2003). Ceci confirme que spongiose et mort neuronale sont deux manifestations de la neurotoxicité de PrP<sup>22L</sup> (Bolton et al., 1991 ; Bruce et al., 1989 ; DeArmond & Prusiner, 1995).

#### 4. Vulnérabilité différentielle des cellules de Purkinje dans le cervelet infecté par 22L

Les régions EAAT4(+) où PrP<sup>22L</sup> s'est accumulée présentent souvent une perte neuronale plus marquée que celle observée dans les régions EAAT4(+) sans PrP<sup>22L</sup> mais moindre de celle observée dans les régions EAAT4(-) où PrP<sup>22L</sup> s'est accumulée. Ceci suggère soit l'atténuation de la neurotoxicité de PrP<sup>22L</sup>, soit une moindre vulnérabilité neuronale dans les compartiments EAAT4(+). Cette observation est confirmée par l'analyse quantitative des cellules de Purkinje EAAT4(+) et EAAT4(-) dans le cervelet infecté par 22L i.c. et qui montre en effet une perte significativement plus importante des cellules de Purkinje EAAT4(-), indiquant que les propriétés biochimiques des cellules de Purkinje pourraient moduler leur sensibilité à la neurotoxicité de 22L ou que des taux moindres de PrP<sup>22L</sup> neurotoxique se sont produits dans les compartiments EAAT4(+). Dans le cervelet de souris inoculées par 22L i.c., les cellules de Purkinje des lobules IX, X et crus 1 résistent à la neurotoxicité de 22L à un stade avancé de la maladie où la déposition de PrP<sup>22L</sup> et la perte neuronale sont importantes. Ces lobules sont essentiellement constitués de cellules de Purkinje EAAT4(+), confirmant que les cellules de Purkinje EAAT4(+) sont plus résistantes.

Chez les souris inoculées par voie i.c., PrP<sup>22L</sup> dépose dans les compartiments EAAT4(+) dans le vermis et, à l'inverse, PrP<sup>22L</sup> dépose dans les compartiments EAAT4(-) dans les hémisphères. La perte des cellules de Purkinje est plus forte dans les hémisphères que dans le vermis. De manière intéressante, le contraire est observé chez les animaux inoculés par voie i.p. En effet, les dépôts de PrP<sup>22L</sup> se font dans les compartiments EAAT4(-) dans le vermis et EAAT4(+) dans les hémisphères. Chez ces animaux, la perte en cellules de Purkinje est plus forte dans le vermis que dans les hémisphères. La voie de neuroinvasion de 22L dans le cervelet est donc un facteur important qui module la topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> et la mort des cellules de Purkinje.

Les compartiments ZII(-)/EAAT4(-) sont plus vulnérables dans de nombreux cas d'atteinte du cervelet comme par exemple l'ischémie (Welsh et al. 2002) et l'infection par le virus Borna (Williams et al., 2007), la maladie de Niemann–Pick de type C chez la souris (Sarna & Hawkes, 2003) et les mutations du canal calcique  $\alpha 1a$  chez les souris *tottering* et *leaner* (Fletcher et al., 1996). Un cas des plus intéressants est celui de la souris déficiente en PrP<sup>C</sup>, *Ngsk Pmp<sup>0/0</sup>* où le paralogue Dpl de PrP<sup>C</sup> induit une perte prématurée plus prononcée des cellules de Purkinje EAAT4(-), suggérant que l'absence de PrP<sup>C</sup> aggrave la vulnérabilité de cette sous population de cellules de Purkinje aux conditions neurotoxiques telles que la surexpression ectopique de Dpl (Heitz et al., 2007).

La double immunofluorescence de caspase-3 et de CaBP dans les cellules de Purkinje montre que l'apoptose est activée par 22L dans ces neurones. Cette voie de mort neuronale est donc probablement impliquée dans la perte des cellules de Purkinje dans le cervelet des souris infectées. L'apoptose est également décrite dans le cerveau de patients atteints de MCJ (Ferrer et al., 1999, 2002 ; Gray et al., 1999 ; Lucas et al., 1997) et d'insomnie fatale familiale (Dorandeu et al., 1998) et chez des souris infectées expérimentalement par d'autres souches de tremblante adaptées à la souris comme 301V, 87V, 22A, 79A et de MCJ Fujisaki (Lucassen et al., 1995 ; Giese et al., 1995 ; Jesionek-Kupnicka et al., 2001). Cependant, l'enrayement du flux autophagique a été également impliqué dans la mort neuronale induite par les prions (Chu, 2006 ; Yao et al., 2013) comme mes premières expériences d'infection de cultures organotypiques de cervelet le suggèrent et son lien avec l'apoptose dans les neurones infectés est encore inconnu.

Les cellules de Purkinje étant l'unique sortie du cortex cérébelleux vers les noyaux profonds, leur destruction se manifeste par des déficits de coordination motrice au niveau déficits occulo-moteur, la dysarthrie

(trouble de l'articulation, de la parole), des déficits du mouvement des jambes et des anomalies de la posture. La destruction de modules spécifiques du cervelet par PrP<sup>22L</sup> peut ainsi entraîner des symptômes moteurs caractéristiques. La toxine cholérique b conjuguée à la saporine injectée dans différentes régions du cervelet pour inactiver les neurones de l'olive de modules spécifiques entraîne un déficit des réponses cutanées durant la marche (Pijpers et al., 2008). Aussi, l'inactivation de modules de l'olive chez le chat par l'injection d'un bloquant des récepteurs glutamatergiques (CNQX) produit une série de déficits moteurs qui dépendent des régions de l'olive concernées (Horn et al., 2010). L'atteinte de modules cérébelleux spécifiques par 22L pourrait entraîner des déficits moteurs spécifiques qui restent à caractériser au cours de la progression de la maladie.

Dans le cervelet infecté par 22L i.cb. et i.c., la mort neuronale concerne également les cellules granulaires qui subissent une perte significative. Cependant, cette perte est diffuse dans l'ensemble du cortex cérébelleux et ne varie pas en fonction de la topographie de la déposition de PrP<sup>22L</sup> suggérant que des paramètres différents contribuent à la mort des cellules de Purkinje et des cellules granulaires. Le cervelet infecté par 22L i.cb. et i.p. ne perd pas d'interneurones dans la couche moléculaire du cervelet suggérant que ces neurones sont plus résistants que les cellules granulaires et les cellules de Purkinje à la neurotoxicité de 22L.

Quelle est la raison de la plus grande vulnérabilité des cellules de Purkinje EAAT4(-) ou de la plus grande résistance des cellules de Purkinje EAAT4(+) à la toxicité de 22L ? L'analyse de la LTD au niveau de la synapse fibre grimpeuse-cellules de Purkinje montre que la plasticité synaptique varie entre les bandes zébrine EAAT4(+) et EAAT4(-) (Wadiche & Jahr, 2005). Aussi, le niveau de glutamate libéré aux terminaisons des fibres grimpeuses varie dans les bandes de cellules de Purkinje (Paukert et al., 2010) en corrélation avec l'expression d'EAAT4 et les signaux des fibres grimpeuses provoquent des décharges synchrones des cellules de Purkinje d'une même bande (Sasaki et al., 1989 ; Lang et al., 1999 ; Blenkinsop & Lang, 2006 ; Wise et al., 2010). Ceci montre que la physiologie des cellules de Purkinje des bandes EAAT4(+) et EAAT4(-) présente des différences et suggère que les fibres grimpeuses pourraient contribuer à la spécificité fonctionnelle des bandes. En ce sens, le facteur de vulnérabilité/résistance des cellules de Purkinje à la neurotoxicité de 22L pourrait être lié à des différences dans la transmission glutamatergique entre les différents compartiments.

Les différences de courant induit par stimulation électrique dans la cellule de Purkinje ne seraient pas provoquées par une différence de la quantité de glutamate au niveau présynaptique, mais seraient permises par l'expression d'EAAT4 dans les cellules de Purkinje (Wadiche & Jahr, 2005). Le transporteur EAAT4 qui élimine le glutamate de la fente synaptique des synapses des fibres grimpeuses et des fibres parallèles avec les cellules de Purkinje (Otis et al., 1997 ; Takayasu et al., 2005) est exprimé selon un patron similaire au patron de ZII/aldolase-C (Dehnes et al., 1998). Les cellules de Purkinje qui expriment EAAT4 recapturent plus facilement le glutamate et cette propriété intrinsèque pourrait leur conférer une résistance à l'excitotoxicité, transmise en particulier par les récepteurs glutamatergiques AMPA impliqués dans la transmission au niveau de ces synapses (Garthwaite & Garthwaite, 1991). L'expression de l'aldolase-C, une enzyme du métabolisme glycolytique, pourrait conférer une plus grande résistance à l'anoxie aux cellules de Purkinje qui l'expriment (ZII(+)). Cependant, l'expression d'aldolase-C par certaines cellules de Purkinje n'est généralement pas considérée comme un avantage décisif dans la mesure où toutes les cellules de Purkinje expriment l'aldolase-A, une autre isoforme fonctionnelle de l'enzyme (Buono et al., 2001).

Outre EAAT4 et aldolase-C, d'autres zébrines tels que 5'-nucléotidase (Bailly et al., 1995) et le récepteur métabotrope du glutamate mGluR1b (Mateos et al., 2001) sont exprimés par les cellules de Purkinje suivant le même patron de bandes, suggérant que EAAT4, aldolase C et d'autres zébrines pourraient contribuer à

l'équipement biochimique nécessaire à la résistance/vulnérabilité des cellules de Purkinje à 22L (Nicoletti et al., 1996 pour revue). Par ailleurs, l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR1A, mGluR1BR et mGluR5R) initie la voie de la protéine kinase C (Beraldo et al., 2011 ; Willard & Koochekpour, 2013) et celle de la laminine, provoquant la libération de calcium et l'activation de la voie ERK1/2 qui permet la croissance neuritique (Beraldo et al., 2011). A cet égard, l'expression de l'isoforme gamma de la PKC par les cellules de Purkinje présente le même patron qu'EAAT4(+) dans le cortex cérébelleux de souris (Bailly et al., non publié). L'infection par 22L pourrait interférer avec ces voies contrôlées par PrP<sup>C</sup> et conduire à la mort neuronale (Chiarini et al., 2002 ; Schneider et al., 2003).

La protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup> est exprimée par les CPs de façon homogène dans le cortex cérébelleux, essentiellement aux membranes plasmiques des neurones (Haeberlé et al., 2000 ; Bailly et al., 2004). Malgré cette distribution homogène du substrat à partir duquel elle se forme, PrP<sup>22L</sup> s'accumule d'une façon hétérogène définie par les compartiments anatomiques du cortex cérébelleux. Des différences de glycosylation de PrP<sup>C</sup> dans les CPs pourraient différer entre les bandes et aussi entre le vermis et les hémisphères. De telles différences ont été impliquées dans la sensibilité différentielle des neurones centraux aux effets neurotoxiques des prions (Xiao et al., 2013b). Les glycoformes de PrP<sup>C</sup> peuvent être impliquées dans différentes voies de signalisation importantes pour la survie neuronale (Rodolfo et al., 1999 ; Martin, 2002) et des différences d'expression des glycoformes de PrP<sup>C</sup> entre les différentes sous-populations des cellules de Purkinje pourraient sous-tendre leurs différences de vulnérabilité aux effets de 22L.

### Etude III. Effets pro-inflammatoires des prions dans le cervelet de souris

Dans les maladies à prions, l'inflammation participe à la dégénérescence et la mort neuronale. Le tissu cérébral infecté par les prions est le siège de réactions inflammatoires telles que la gliose réactive des astrocytes à la mort neuronale et l'activation de la microglie. Les cellules gliales sont des sources majeures de cytokines pro-inflammatoires aux effets toxiques dont les premières cibles sont les neurones qui expriment leurs récepteurs dans le tissu nerveux. Une hypothèse soutenue par les résultats de nos collaborateurs dans des cultures primaires de neurones infectés par des prions est que, la transformation de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> supprime une fonction essentielle de PrP<sup>C</sup> qui est de réguler l'activité de la chaîne enzymatique en charge du taux membranaire de récepteurs TNFR1 à la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (Pietri et al., 2013). Ceci conduit à augmenter la sensibilité neuronale à TNF- $\alpha$ . Avec la neurotoxicité intrinsèque de PrP<sup>Sc</sup> et indirecte de la perte des fonctions neuroprotectrices de PrP<sup>C</sup>, ce mécanisme physiopathologique pourrait contribuer à la mort neuronale dans les maladies à prions. Cette troisième étude a eu pour objectif d'analyser l'expression et la localisation de TNFR1 *in situ* dans le cervelet de souris en réponse aux effets de l'infection par les prions 22L.

#### 1. Réponses gliales du cervelet aux prions 22L

L'activation des cellules microgliales et l'astrocytose sont parmi les premiers changements détectés dans le cerveau à la suite de l'infection par les prions chez l'homme et dans les modèles murins expérimentaux.

La réaction gliale précède ou suit l'apparition des premiers dépôts de PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1994 ; Giese et al., 1995 ; Sasaki et al., 1993). Les cellules gliales activées chroniquement prolifèrent autour des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> et

participent à sa neurotoxicité dans le cerveau infecté (Campbell et al., 1994 ; DeArmond et al., 1992 ; Giese et al., 1998). Mes observations dans le cervelet murin infecté par 22L sont en accord avec ces observations et montrent l'astroglie réactive par l'augmentation de l'intensité de l'immunoréactivité de GFAP et l'extension des palissades de glie de Bergman dans les bandes de PrP<sup>22L</sup> où la perte des cellules de Purkinje est la plus forte, suggérant que cette réaction est la conséquence de la mort neuronale. Aussi, l'activation microgliale est forte et diffuse dans le cervelet infecté et de nombreuses cellules microgliales ramifiées exprimant Iba-1 sont présentes dans l'ensemble du cortex cérébelleux infecté par 22L mais leur densité ne varie pas en fonction du patron des dépôts de PrP<sup>22L</sup>. Cette distribution homogène de la microglie dans le tissu cérébelleux suggère une distribution similaire des signaux activateurs. Cependant, la concentration des cellules microgliales au niveau des plaques de dépôts de PrP<sup>Sc</sup> observée dans le cerveau infecté par certains prions (MCJ, Wojtera et al., 2012) est en apparence contradiction avec l'activation diffuse des cellules microgliales dans le cervelet infecté par 22L. Une analyse de l'activation microgliale en fonction de la topographie de la déposition de PrP<sup>22L</sup> serait néanmoins intéressante à mener à un stade plus précoce de la maladie où la microglie activée pourrait migrer dans les premiers sites de déposition de PrP<sup>22L</sup>.

## 2. TNFR1 augmente dans le cervelet infecté par 22L

L'activation gliale est accompagnée par la libération de cytokines pro-inflammatoires incluant TNF- $\alpha$  (Campbell et al., 1994 ; Kim et al., 1999 ; Tribouillard-Tanvier et al., 2009). L'augmentation de l'immunoréactivité de TNFR1 est observée dès la période préclinique à proximité des dendrites des cellules de Purkinje dans la couche moléculaire du cortex cérébelleux infecté par 22L. Cette localisation suggère que TNFR1 est exprimé par les cellules de Purkinje. L'augmentation de l'immunoréactivité de TNFR1 a aussi été observée dans le cortex cérébelleux de souris infectées par l'encéphalopathie spongiforme bovine 6PB1 et dans les noyaux profonds du cervelet des souris infectées par 22L et 6PB1 (Pietri et al., 2013) suggérant que c'est une composante générale de la réponse du tissu nerveux à l'infection par les prions (Li et al., 2004 ; He et al., 2007).

Dans la maladie d'Alzheimer, le peptide A $\beta$  est capable d'induire l'apoptose dépendante du récepteur TNFR1 par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Li et al., 2004 ; He et al., 2007). Dans des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer, la concentration de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  est augmentée dans le cerveau des souris (Patel et al., 2005). La surexpression de TNFR1 entraîne la mort induite par A $\beta$  des neurones hippocampiques en culture (Li et al., 2004). A l'inverse, la délétion du gène codant TNFR1 dans un modèle expérimental de maladie d'Alzheimer, inhibe la génération d'A $\beta$  et diminue la formation des plaques amyloïdes dans le cerveau, l'activation microgliale et l'expression et l'activité de l'enzyme BACE1 qui clive APP et réduit la perte neuronale. Ceci entraîne la diminution des déficits de mémoire et d'apprentissage des souris (He et al., 2007). De plus, la déficience de *TNFR1* et de *TNFR2* rend les neurones plus sensibles à l'excitotoxicité (Bruce et al., 1996), suggérant l'existence d'une balance entre l'expression de TNFR1 et TNFR2 dans les neurones.

L'étude menée par nos collaborateurs dans les neurones *in vitro* infectés par les prions suggère que la levée de l'inhibition de l'enzyme PDK1 normalement effectuée par PrP<sup>c</sup> est responsable du défaut d'activité de TACE (Pietri et al., 2013). PDK1 provoque en effet l'internalisation de TACE qui ne joue plus son rôle d'élimination de PrP<sup>c</sup> et de TNFR1 de la surface membranaire ce qui amplifie la production de PrP<sup>Sc</sup> et favorise l'accumulation ecto-membranaire de TNFR1, sensibilisant les neurones aux effets du TNF- $\alpha$ . L'augmentation de

l'immunoréactivité de TNFR1 dans les travées et bandes formées par les cellules de Purkinje survivantes dans le cortex cérébelleux infecté par 22L semble confirmer les résultats obtenus dans les neurones primaires infectés par la même souche. J'ai alors tenté d'identifier les types cellulaires exprimant TNFR1 *in situ* dans le cortex cérébelleux infecté en utilisant des marqueurs immunocytochimiques des différents composants cellulaires du cortex cérébelleux.

### **3. TNFR1 est essentiellement localisé aux régions pérисynaptiques des filaments astrocytaires dans la couche moléculaire du cervelet de souris infectée par 22L**

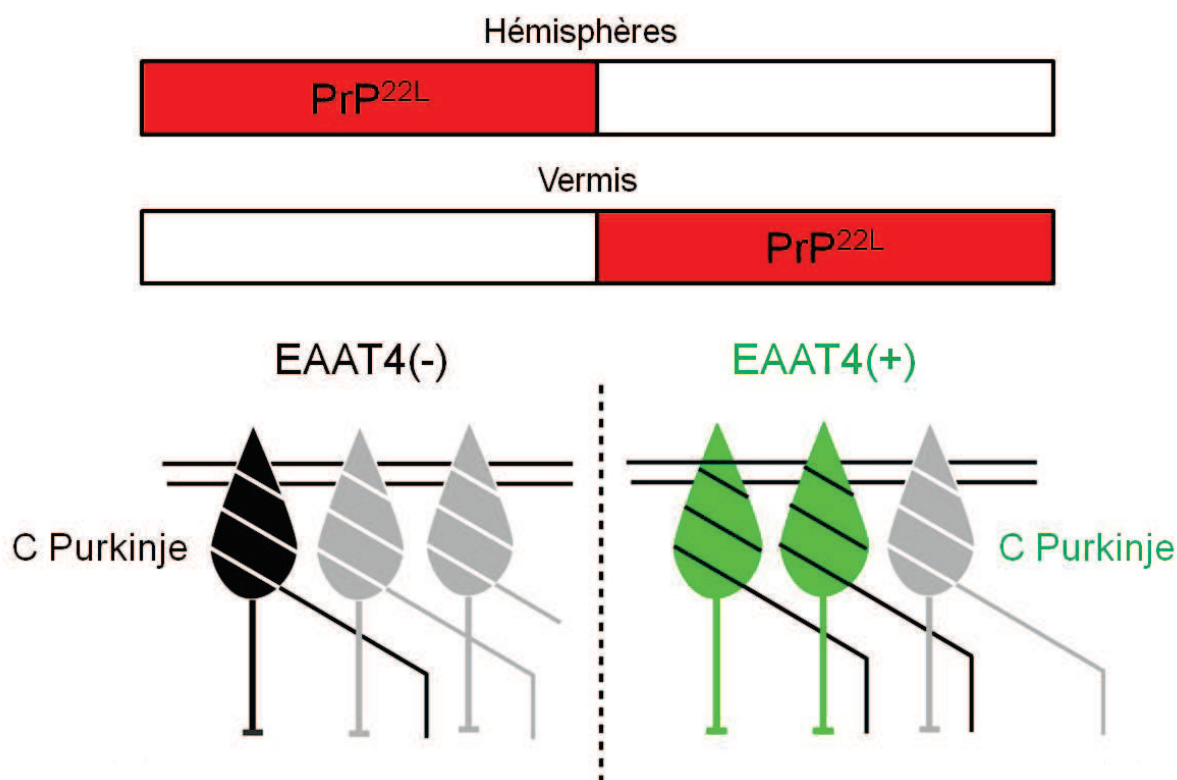
En accord avec la survie importante des cellules granulaires dans la couche granulaire interne du cortex cérébelleux infecté, le marquage des terminaisons présynaptiques de fibres parallèles par vGLUT1 indique peu de perte de ces terminaisons dans la couche moléculaire confirmant les observations récentes d'autres auteurs (Siskova et al., 2013). L'absence de co-localisation de TNFR1 et de vGLUT1 en immunofluorescence indique que TNFR1 est absent des terminaisons des fibres parallèles. La co-localisation de TNFR1 et de CaBP est moins claire, malgré leurs localisations supposées distinctes : ecto-membranaire de TNFR1 et cytosolique de CaBP. Néanmoins, l'immunoréactivité de TNFR1 semble augmentée à proximité de cellules de Purkinje survivantes suggérant l'importance de ces neurones dans la réponse pro-inflammatoire du cortex cérébelleux à 22L.

Dans la couche moléculaire du cervelet infecté par 22L, l'immunofluorescence de TNFR1 et de GFAP indique que TNFR1 n'est pas augmenté au niveau des prolongements de la glie astrocytaire réactive dans les régions dont les cellules de Purkinje ont dégénéré indiquant que les astrocytes réactifs ne surexpriment pas TNFR1. La localisation de TNFR1 distincte des palissades de glie astrocytaire de Bergman est également confirmée en microscopie confocale dans les compartiments où les cellules de Purkinje ont survécu. Cependant, TNFR1 est localisé aux niveaux les plus distaux des prolongements de la glie de Bergman par le double immunomarquage de TNFR1 et d'EAAT1 dans ces zones de survie neuronale. Ce résultat est confirmé par l'immuno-peroxydase de TNFR1 en microscopie électronique par transmission qui localise le récepteur presque exclusivement au niveau des filaments gliaux pérисynaptiques dans la couche moléculaire du cortex cérébelleux infecté par 22L.

Ce résultat est en contradiction avec l'augmentation de TNFR1 à la surface des neurones infectés *in vitro* (Pietri et al., 2013) qui est plutôt en faveur d'un rôle neurotoxique de TNFR1 dans les maladies à prions, l'augmentation des récepteurs TNFR1 membranaires sensibilisant les neurones aux effets neurotoxiques de TNF- $\alpha$  (Pietri et al., 2013). Au contraire, dans le cervelet infecté par 22L *in situ*, la localisation de TNFR1 sur la glie de Bergmann qui n'est pas affectée par la toxicité de PrP<sup>22L</sup> (Siskova et al., 2013) est plutôt en faveur d'un rôle neuroprotecteur indirect de TNFR1, l'augmentation du récepteur n'étant effective qu'à proximité des cellules de Purkinje et ce, jusqu'au niveau subcellulaire suggérant que la glie de Bergmann au contact des CPs les plus résistantes à la neurotoxicité de PrP<sup>22L</sup> pourrait contribuer à leur survie. Les fonctions neuroprotectrices des cellules de Bergmann sont déjà connues dans le contexte de la neurotransmission (Buffo & Rossi, 2013). Ainsi, les astrocytes enveloppent les boutons synaptiques de la couche moléculaire et expriment un taux important de transporteur au glutamate qui limite sa diffusion hors de la fente synaptique protégeant les neurones de son excitotoxicité. Une donnée intéressante au regard de mes résultats est que les interactions de la glie de Bergman avec les cellules de Purkinje ont lieu de manière compartimentée au niveau d'ensembles définis de synapses (Grosche et al., 1999, 2002).



En faveur d'un effet neurotoxique de l'augmentation de TNFR1 dans les filaments gliaux, l'activation du récepteur TNFR1 par les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  est impliquée dans l'apoptose des neurones en culture provoquée par le peptide prion-like PrP(106-126) (Chiarini et al., 2006). La sécrétion de composés réactifs à l'oxygène comme le monoxyde d'azote NO et son dérivé peroxydinitrite NO<sub>3</sub><sup>-</sup> par les astrocytes en réponse à l'activation de TNFR1 et des kinases MAPK, implique une interaction létale entre PrP(106-126) et l'unité astrocyte-neurone (Chiarini et al., 2006). La formation de NOS induite par TNF- $\alpha$  fait aussi intervenir les kinases MAPK (p38) et participe à la mort neuronale (Brown et al., 1999 ; Fabrizi et al., 2001). Il est donc possible que l'expression importante de TNFR1 dans les astrocytes se traduise par l'agression des cellules de Purkinje associées et qu'un lien bidirectionnel entre neurones et astrocytes soit nécessaire à la mort neuronale. La dégénérescence synaptique survenant dans le cervelet infecté par la souche de prion RML chez des souris transgéniques TG3 qui expriment PrP<sup>C</sup> uniquement dans les astrocytes est en faveur d'un tel scénario (Jeffrey et al., 2004).



**Figure 75. Pathogenèse des prions 22L dans le cervelet de souris.** PrP<sup>22L</sup> s'accumule dans des bandes EAAT4(-) des hémisphères et dans les bandes EAAT4(+) du vermis. La perte des cellules de Purkinje (gris) survient dans les deux compartiments EAAT4(+) et EAAT4(-) et est plus sévère dans les compartiments EAAT4(-). Ceci suggère que la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cervelet est un paramètre endogène de la pathogenèse de la tremblante 22L.

# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse suggèrent que PrP<sup>C</sup> intervient dans la régulation de voies apoptotiques et autophagiques dans les neurones. Les cultures organotypiques apparaissent comme un système *ex vivo* favorable à la manipulation des voies apoptotiques et autophagiques dans les neurones pour permettre de mieux comprendre les mécanismes vitaux compromis par l'absence de PrP<sup>C</sup> dans les modèles de déficience génétique ou d'origine infectieuse dans les maladies à prion. Le rôle de l'autophagie dans la survie/mort neuronale pourra être analysé dans ces modèles en utilisant des inhibiteurs (3-méthyladénine) ou des activateurs (rapamycine) spécifiques. Si l'autophagie contribue à la mort neuronale, la perte neuronale devrait être augmentée par sa stimulation et diminuée par son inhibition. A l'inverse, si l'autophagie constitue un mécanisme neuroprotecteur, sa stimulation devrait stimuler la survie des cellules de Purkinje et son inhibition en augmenter la perte. Stimuler l'autophagie en cas d'enrayement du processus pourrait aussi aggraver la perte neuronale si l'enrayement aboutit à la mort neuronale alors que l'inhiber pourrait atténuer les conséquences de l'enrayement du flux autophagique. Enfin, le cas du double mutant Nsgk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> est d'un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la survie neuronale et pourrait faire l'objet d'une étude mécanistique en culture organotypique afin d'avancer dans la compréhension des interactions entre apoptose et autophagie et des causes d'enrayement du flux autophagique dans les neurones (Heitz et al., 2009). La compréhension du mécanisme de blocage du flux autophagique a pris récemment une grande importance dans l'étude de neuropathologies humaines telles que la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer ou encore dans les glioblastomes où l'autophagie semble impliquée dans la survie et/ou la perte cellulaire (Bjorkoy et al., 2005 ; Wu et al., 2006 ; Liberski et al., 2008). Le défaut de fusion des autophagosomes avec les lysosomes est en effet une cause apparente de leur accumulation dans les neurones dans la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1996 ; Nixon et al., 2005a) et les autophagosomes ont été identifiés comme des réservoirs de peptides A $\beta$  dans les neurites dystrophiques (Yu et al., 2005). Enfin, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer sur-exprimant APP, le blocage du flux autophagique empêche la dégradation d'A $\beta$  et de tau (Yang et al., 2008, 2011).

L'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> et la cytopathologie des prions dans le tissu nerveux central sont influencées par des facteurs locaux très peu connus. Mes résultats montrent aussi que la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cortex cérébelleux définie par les modules composés de sous-populations de cellules de Purkinje et de leurs projections afférentes et efférentes, constitue un paramètre endogène important de l'impact neurodégénératif des prions dans le cervelet. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'effet de ce paramètre sur la physiopathologie des prions 22L restent encore inconnus mais sont d'une grande importance dans l'élaboration de thérapies efficaces dans les maladies à prion.

Chez l'homme, des caractéristiques moléculaires de PrP<sup>Sc</sup> dépendantes de la souche de prion et des mutations de *Prnp* influencent la distribution de PrP<sup>Sc</sup> dans le SNC (Kitamoto et al., 1992 ; Schulz-Shaeffer et al., 1996 ; Parchi et al., 1999). En effet, la MCJ familiale causée par plus de 30 mutations différentes de *Prnp* touche sévèrement le cortex cérébral (Gambetti et al., 2003), tandis que le syndrome de GSS affecte préférentiellement

le cervelet (Ghetti et al., 1994 ; Piccardo et al., 1998) et que l'insomnie fatale familiale cible le thalamus (Gambetti et al., 2003). A un stade avancée de la maladie, la sélectivité topographique de l'atteinte diminue et, bien que la neurotoxicité de PrP<sup>Sc</sup> touche initialement une région cérébrale spécifique, PrP<sup>Sc</sup> envahit ensuite de nouvelles régions cérébrales (Wemheurer et al., 2011) à l'instar de l'accumulation d'A $\beta$  dans le cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer (Braak & Braak, 1991). Ainsi, certains types de neurones sont spécifiquement affectés par la toxicité des prions. La neurotransmission glutamatergique, GABAergique, sérotonergique et dopaminergique est altérée dans les maladies à prions traduisant la vulnérabilité particulière de types neuronaux tels que certains neurones GABAergiques (Guentchev et al., 1997, 1998 ; Belichenko et al., 1999), les neurones sérotonergiques centraux (Vidal et al., 2009) et les neurones dopaminergiques (Yun et al., 1998). Dans mon étude, j'ai mis en évidence que des sous-populations de cellules de Purkinje formant des compartiments définis dans le cortex cérébelleux sont plus vulnérables aux effets des prions 22L. Les cellules de Purkinje ont perdu la majorité de leurs connexions dans les cultures organotypiques de cervelet dont j'ai montré l'intérêt en tant que système expérimental pour l'étude des effets neurodégénératifs des prions. Ce système permettra d'analyser les mécanismes sous-jacents à la vulnérabilité différentielle des cellules de Purkinje EAAT4(+) et EAAT4(-) afin de départager qui des connexions des cellules de Purkinje ou de leur équipement biochimique est impliqué dans leur résistance différentielle aux prions. Par ailleurs, l'utilisation d'ARNm interférents spécifiques de différentes zébrines (EAAT4, parvalbumine, mGluR) dans ces cultures permettra de déterminer si des paramètres biochimiques en rapport avec ces zébrines sont en relation avec les effets délétères des prions dans le cervelet.

Enfin, mes résultats mettent en évidence l'exacerbation d'une relation neurone-glie en réponse à l'infection par les prions et matérialisée par l'augmentation de l'expression du récepteur TNFR1 à la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  par les profils astrocytaires au contact des épines postsynaptiques qui sont les plus sensibles à la neurotoxicité des prions. Le mécanisme neurotoxique impliquant TNFR1 et contrôlé par PrP<sup>C</sup> dans les neurones en cultures primaires pourra être étudié dans les cultures organotypiques infectées par 22L ou 139A qui constituent un système *ex vivo* plus proche des conditions *in vivo* réunies dans l'organisme. Ce système devrait permettre de mieux caractériser la spécificité cellulaire et subcellulaire de l'expression et du trafic des protéines de la voie pro-inflammatoire reliant PrP<sup>Sc</sup> et TNFR1 (phospho-PDK1, TACE, cavéoline-1, TNFR1, PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup>) et aussi d'expliquer la différence de localisation de l'augmentation de TNFR1 neuronale *in vitro* et gliale *in vivo* dans le cortex cérébelleux infecté par 22L.

Une question fondamentale reste non résolue et concerne le mécanisme de sur-activation de PDK1 par PrP<sup>Sc</sup>. L'infection par les prions provoque la perte de fonction de PrP<sup>C</sup> du fait de sa conversion en PrP<sup>Sc</sup>. Or la sur-activation de PDK1 dépend de PrP<sup>C</sup>. La capacité d'inhibiteurs de la voie de signalisation PrP<sup>C</sup>-TACE-TNFR1 à désensibiliser les neurones infectés par les prions à la toxicité de TNF- $\alpha$  pourra être évaluée dans les cultures organotypiques de cervelet. L'effet des inhibiteurs de la kinase Src, de PI3K et de PDK1 à protéger les neurones de TNF- $\alpha$  et de la tremblante 22L sera évalué dans ce système pour confirmer l'implication de la voie Src kinase-TACE-TNFR1 dans la neurodégénérescence (Mouillet-Richard et al., 2000 ; Santucci et al., 2005 ; Nixon, 2005b). Cette approche devrait fournir des bases expérimentales à l'élaboration de stratégies thérapeutiques visant à protéger les neurones de l'inflammation chronique dans les maladies à prions et d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer où la dérégulation du trafic de TNFR1 est également impliquée dans la mort neuronale (Pietri et al., 2013). En effet, dans la maladie d'Alzheimer, le peptide A $\beta$  est capable d'induire l'apoptose dépendante du récepteur TNFR1 par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Li et al., 2004 ; He et al., 2007). La concentration en cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  est augmentée dans le cerveau des modèles murins de maladie d'Alzheimer (Patel et al., 2005) et la surexpression de TNFR1 induite par A $\beta$  entraîne la mort

des neurones hippocampiques en culture (Li et al., 2004). A l'inverse, la délétion du gène codant TNFR1 dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer inhibe la génération d'A $\beta$  et diminue la formation des plaques amyloïdes dans le cerveau. La délétion de *TNFR1* diminue l'activation microgliale et l'expression et l'activité de l'enzyme BACE1 qui clive APP et réduit la perte neuronale. Ceci entraîne la diminution des déficits de mémoire et d'apprentissage des souris (He et al., 2007). De plus, la déficience de TNFR1 et de TNFR2 rend les neurones plus sensibles à l'excitotoxicité (Bruce et al., 1996), suggérant l'existence d'une balance entre l'expression de TNFR1 et TNFR2 dans les neurones.

Les fonctions neuronales incluant la transmission synaptique sont définies par une activité coordonnée des neurones et de la glie. Ceci est particulièrement vrai dans la couche moléculaire du cervelet où les cellules de Purkinje (soma, dendrites, synapses) sont entièrement entourées par la glie de Bergman (Palay & Chan-Palay, 1974). Les astrocytes sont un support métabolique et physique pour les neurones et sont impliqués dans la signalisation neuronale (Bergles et al., 1997). Par exemple, les récepteurs glutamatergiques situés sur la glie de Bergmann contribuent au lien bidirectionnel entre cellules de Purkinje et astrocytes (Perea et al., 2009). Il est donc très vraisemblable qu'un lien bidirectionnel existe entre l'augmentation de TNFR1 dans la glie de Bergmann et la dégénérescence des cellules de Purkinje dans le cervelet infecté par les prions. L'infection de cultures organotypiques de cervelet de souris transgéniques TG3 qui expriment PrP<sup>C</sup> uniquement dans les astrocytes, pourrait permettre d'évaluer si TNFR1 est augmenté dans les astrocytes, même sans que PrP<sup>Sc</sup> n'exerce de toxicité directe sur les neurones et permettra de mettre en évidence le lien éventuel entre neurones et astrocytes dans le cervelet infecté par les prions (Jeffrey et al., 2004).

# **MATERIELS & METHODES**

## 1. Ethique en matière d'expérimentation animale

Les souris sont hébergées au Chronobiotron de Strasbourg (CNRS UMS 3415, Université de Strasbourg). Toutes les souris utilisées dans le cadre de ces travaux ont été soumises à l'expérimentation en respectant les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/EU). Les expérimentations ont été agréées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de Strasbourg CEEA35 (ref. AL/01/01/01/13).

## 2. Animaux

Des souris sauvages C57Bl6/J adultes (n = 28) et âgées de 8 jours (n = 58) et six lignées de souris mutantes ont été utilisées dont la lignée de souris EAAT4-eGFP (n = 18) et plusieurs lignées de souris *knock-out* et transgéniques pour le gène *Prnp* : hétérozygotes Ngsk *Prnp*<sup>+/-</sup> (n = 29), homozygotes Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 58), ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 56), double-mutantes Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> (n = 9) et des souris transgéniques exprimant Dpl sous le contrôle de l'énoïase spécifique des neurones (*Neuron specific enolase* : NSE) NSE-Dpl *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 18) et Tg(*Prnp*)20 (notées Tga20) qui sur-expriment *Prnp* (n = 12). Les souris ont été prélevées à différents âges : 8 à 11 jours (cultures organotypiques) et adultes (4 à 12 mois).

Les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (don de Dr. S. Sakaguchi) sont obtenues par délétion de 0,9 kb de l'intron 2, 10 pb de la région 5' non-codante, et la délétion complète du cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame : ORF) de *Prnp*, comprenant le site accepteur d'épissage localisé dans l'exon 3. Cette séquence nucléotidique est remplacée par un gène de résistance à la néomycine (cassette neo) (Sakaguchi et al., 1996). La perte du site accepteur d'épissage entraîne la formation d'un transcrit chimérique contenant les deux premiers exons non-codants de *Prnp* et l'exon du gène *Prnd* codant Dpl. L'expression de Dpl se fait alors sous le contrôle du promoteur de *Prnp* (Li et al., 2000). Les souris Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> se développent normalement après la naissance. Elles présentent des problèmes de fertilité, et un comportement maternel peu prononcé, aggravé de cannibalisme maternel.

Les souris *Bax*<sup>-/-</sup> ont été obtenues par délétion des exons 2-5 remplacés par une cassette néo (Knudson et al., 1995). Les mâles *Bax*<sup>-/-</sup> étant stériles, la lignée double mutante Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> : *Bax*<sup>-/-</sup> est obtenue en croisant des souris homozygotes Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> et des souris hétérozygotes *Bax*<sup>+/-</sup>.

Les souris ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> sont déficientes en protéine prion par délétion de l'ORF du gène *Prnp*, remplacé par une cassette neo (Büeler et al., 1992) et ne sur-expriment pas Dpl dans le SNC. Elles se développent et se reproduisent normalement.

Les souris Tga20 (don de V. Béringue) sont obtenues par l'insertion d'un transgène de *Prnp* à raison de 60 copies. Il en résulte un taux cérébral de PrP<sup>C</sup> 10 fois supérieur au taux d'une souris sauvage C57Bl/6J (Fisher et al., 1996).

Les souris transgéniques EAAT4-eGFP (n = 18 ; don de Dr. J. Rothstein) expriment un transgène permettant l'expression d'eGFP (*enhanced Green fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur du transporteur 4 du glutamate (*excitatory amino acid transporter 4*, Gincel et al., 2006). Dans le cervelet, seules les cellules de Purkinje exprimant ZII expriment la fluorescence d'eGFP permettant la visualisation des compartiments ZII(+) et ZII(-) dans les coupes transversales de cervelet.

Après décapitation, deux segments de 0,5 cm de queue sont coupés et congelés dans un tube Eppendorf plongé dans l'azote liquide puis conservé au congélateur à -80°C. Ces prélèvements permettent de vérifier le

génotype des souris par PCR. L'ORF de *Prnp* est identifié en utilisant un primer sens: 5'CCGCTACCCTAACCAAGTGT3' et anti-sens: 5'CCTAGACCACGAGAATGCGA3', tous deux situés dans l'ORF de *Prnp* (Heitz et al., 2010). Le primer suivant est utilisé afin d'identifier les mutants *Ngsk Prnp<sup>+/-</sup>*, *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* : sens 5'TGCCGCACTTCTTTGTGAAT3' et anti-sens : 5'CGGTGGATGTGGAATGTGT3' (situé à l'intérieur du domaine neo) (Heitz et al., 2010).

### 3. Microscopie électronique par transmission in situ dans le cervelet de souris

Les souris *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* (n = 6) et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* (n = 9) âgées de 4,5 mois, 6,5 mois et 12 mois et ZH-I *Prnp<sup>0/0</sup>* âgée de 12 mois (n=1) sont anesthésiées par l'injection i. p. de 0,1 ml d'un mélange de kétamine (125 mg/kg, Imalgène 500) et de xylazine (17 mg/kg, Rompun) avant d'être perfusées par l'aorte avec 250 ml de fixateur composé de PAF (paraformaldéhyde) 2% et glutaraldéhyde 2,5% dans PB (*Phosphate buffer*) 0,1 M pH 7,3. Les souris sont décapitées et le cervelet est disséqué puis immergé une nuit à 4°C dans le glutaraldéhyde 1% dans PB. Des coupes transversales de cervelet de 200  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées au vibratome dans le cervelet aux niveaux antérieur (Bregma - 1,6 à - 6,24 mm), médian (bregma - 6,24 à - 6,96 mm) et postérieur (- 7,08 à - 7,76 mm) (Paxinos & Franklin, 2001) puis lavées 3 fois 10 min dans PB et post-fixées 1h dans le tétr oxyde d'osmium O<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 0,5% dans PB. Elles sont ensuite déshydratées dans des bains d'éthanol croissant de 8 min (25°, 50°, 70°, 95°, 2 x 100°) et soumises au protocole d'inclusion dans la résine époxy (Araldite) : oxyde de propylène 50 : 50 dans l'éthanol 100° (2 x 8 min) et oxyde de propylène pur (2 x 8 min). Elles sont ensuite imprégnées dans un mélange d'Araldite (Sigma) et d'oxyde de propylène 50 : 50 pendant 2h et incluses dans l'Araldite pur pendant une nuit à 4°C puis 2h à température ambiante. Elles sont montées entre 2 lames de verre dans l'Araldite pour polymérisation 48h à 60°C. Les échantillons (1 mm<sup>3</sup>) sont découpés dans les tranches et collés sur des blocs d'Araldite. Des sections ultrafines (50 à 70 nm) sont effectuées à l'ultramicrotome (Reichert-Jung), et observées au microscope électronique par transmission (Hitachi 7500) équipé d'une caméra numérique AMT Hamamatsu.

### 4. Analyse quantitative des cellules de Purkinje autophagiques

Afin d'estimer l'autophagie dans les cellules de Purkinje des différents mutants *Prnp<sup>0/0</sup>*, j'ai estimé le nombre de cellules de Purkinje « autophagiques », c'est-à-dire de cellules de Purkinje dans le cytoplasme desquelles j'ai pu compter au moins trois figures caractéristiques de l'autophagie (phagophores, autophagosomes, autolysosomes). 200 cellules de Purkinje ont été analysées au hasard dans chacun des niveaux antérieur (bregma -5,24 à -6,34 mm, Paxinos & Franklin, 2001), médian (-6,36 à -7,09 mm) et postérieur (-7,20 à -8,24 mm) et ce, à raison de 50 cellules de Purkinje dans chacune des 4 régions : vermis droit et gauche et hémisphères droit et gauche. Dans les cas où le nombre de 50 cellules de Purkinje par région n'a pas été observé, je l'ai complété par l'analyse d'une coupe située à plus de 40  $\mu$ m de la première. 600 cellules de Purkinje par animal ont ainsi été analysées. Les données sont exprimées en moyenne de proportion de cellules de Purkinje « autophagiques » ( $\pm$  écart-type). La comparaison entre les groupes *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup> : Bax<sup>-/-</sup>* est effectuée par un test ANOVA à un facteur quand les conditions d'application sont satisfaites, suivi d'un test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences entre les groupes sont jugées significatives au seuil  $p \leq 0,05\%$ .

## 5. Cultures organotypiques de cervelet

Les cultures organotypiques de cervelet ont été réalisées selon la méthode décrite par Stoppini et al (1991) en vue de maintenir en culture des tranches de cervelet de 350  $\mu\text{m}$  d'épaisseur préparées à partir de cervelet de souris C57Bl6/J (n = 58), hétérozygotes Ngsk *Prnp*<sup>+/-</sup> (n = 16), homozygotes Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 58), ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 56), NSE-Dpl (n = 18) et Tga20 (n = 12) âgées de 8 jours. La souris est décapitée et la peau et le crâne sont découpés afin de dégager l'encéphale placé ensuite dans le milieu MEM (*Minimal Essential Medium*) (Invitrogen/Fischer) en conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Le cervelet est disséqué sous loupe binoculaire (Stemi 200C, Zeiss), puis des coupes sagittales de 350  $\mu\text{m}$  sont réalisées avec un trancheur (chopper, Mc Ilwain). Les tranches sont séparées l'une de l'autre et reprises sur une membrane perméable de 30 mm de diamètre avec des pores de 0,4  $\mu\text{m}$  (Millicell, Millipore) placée dans 800  $\mu\text{l}$  de milieu d'incubation composé de MEM 50%, de milieu basal d'Eagle 25% (Life Technologies), de sérum de cheval inactivé 25% (Life Technologies), de Glutamax 2 mM (Life Technologies), de glutamine 200 mM (Sigma) et de glucose 3,6 mM (Sigma, G-7021). Chaque membrane perméable porte environ 15 tranches de cervelet. Ces préparations sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé tous les deux jours pendant 3, 7, 12 ou 21 jours.

## 6. Infection des cultures organotypiques de cervelet

Les cultures organotypiques de cervelet ont été préparées comme décrit ci-dessus à partir de souris C57Bl6/J (n = 12), Tga20 (n = 12) et ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 6) âgées de 10 à 11 jours. L'infection des cultures est réalisée en adaptant le protocole décrit par Falsig et al (2008). Les tranches de cervelet sont séparées l'une de l'autre et lavées dans du milieu GBSSK (*Gey's balanced salt solution*) contenant 1 mM d'acide kynurénique, antagoniste des récepteur NMDA pour diminuer l'excitotoxicité du glutamate. Les tranches sont incubées 30 min à 4°C dans des homogénats de cerveau infectés par la souche 22L ou la souche 139A à 1% (poids/vol) dans GBSSK. Après le lavage dans GBSSK, les tranches sont déposées sur la membrane Milli-cell (Millipore) et incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> dans 1 ml de milieu de culture composé de MEM 50%, milieu basal d'Eagle 25%, sérum de cheval inactivé 25%, glucose 3,6 mM, glutamine 200 mM, Glutamax 2 mM et pénicilline/streptomycine 2 mM. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Les cultures sont maintenues pendant 20 et 30 jours.

## 7. Immunohistofluorescence de CaBP dans les cultures organotypiques de cervelet

Les cultures organotypiques de cervelet sont fixées au PAF 4% dans PBS à 4°C pendant 24h après 3, 7, 12, 21 ou 30 jours *in vitro*. Les tranches sont ensuite lavées 2 x 10 min dans PBS et perméabilisées dans le Triton X-100 1% dans PBS pendant une nuit à 4°C sous agitation. Les cultures sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit sous agitation dans l'anticorps monoclonal de souris anti-CaBP 1/1000 dans PBS contenant 1% NGS + 0,3% Triton X-100. Le lendemain, les cultures sont rincées 6 x 5 min dans PBS puis incubées pendant 1h sous agitation à l'obscurité dans l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris porteur du fluorochrome Alexa 546 (rouge) (Molecular Probes A11003) au 1/500 dans PBS + 0,1% Triton X-100. Les cultures sont ensuite rincées 3 fois 5 min dans du PBS contenant 0,1% Triton X-100 et 2 x 5 min dans PBS puis les Milli-cell porteurs des tranches sont découpés sous la loupe binoculaire à l'aide d'un scalpel et montés entre lame et lamelle dans le Mowiol



(Calbiochem 475904) selon la technique « en pont » pour éviter que les tranches ne soient écrasées par le montage (Yoon et al., 2011).

## 8. Analyse quantitative et morphométrie des cellules de Purkinje en culture organotypique

Le nombre de cellules de Purkinje immunofluorescentes pour CaBP est compté dans les tranches organotypiques C57Bl6/J (n = 15), Ngsk *Prnp*<sup>+/-0</sup> (n = 16), Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 29), ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 23) et NSE Dpl *Prnp*<sup>0/0</sup> (n = 18) prélevées après 3, 5, 7, 12 ou 21 jours de culture. Les cellules de Purkinje sont examinées et photographiées au microscope à épifluorescence (Axioskop-II, Zeiss) sous l'objectif x10, à l'aide du logiciel AxioVision. Le comptage des cellules de Purkinje est effectué manuellement dans tout le cervelet en culture afin d'obtenir un nombre moyen de cellules de Purkinje par souris.

Au moins vingt cellules de Purkinje isolées, immunofluorescentes pour CaBP ont été analysées dans les cultures issues de chaque animal (C57Bl6/J n = 9 ; Ngsk *Prnp*<sup>+/-0</sup> n = 11 ; Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> n = 22, ZH-I *Prnp*<sup>0/0</sup> n = 15 et NSE Dpl *Prnp*<sup>0/0</sup> n = 11). Chaque CP est photographiée à l'objectif x40 (microscope Axioskop-II, Zeiss) et trois paramètres sont mesurés à l'aide du logiciel Image J Launcher : l'aire totale de la CP (nombre de pixels de la surface représentée par le corps cellulaire, l'axone et de l'arborisation dendritique), le périmètre (nombre de pixels du contour cellulaire) et l'extension dendritique par la mesure de la distance entre l'extrémité dendritique la plus éloignée du soma et le centre somatique.

Les données sont exprimées en moyenne de l'aire, du périmètre, de la distance dendritique, et de la somme des cellules de Purkinje  $\pm$  écart-type afin de comparer le développement et le nombre moyen de cellules de Purkinje dans les cultures organotypiques des différents âges et génotypes considérés. Les comparaisons statistiques des moyennes des groupes (la somme des cellules de Purkinje, l'aire et le périmètre cellulaire et l'extension dendritique maximale sont effectuées avec le logiciel SigmaPlot par un test ANOVA à deux facteurs (« temps de culture » et « génotype ») quand les conditions d'application sont satisfaites, suivi d'un test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences entre les groupes sont jugées significatives au seuil  $p \leq 0,05\%$ .

## 9. Histoblot

Après 20 et 30 jours, les cultures organotypiques infectées par les prions sont congelées à -20°C. Le fond du Milli-cell est ensuite découpé et retourné au contact d'une membrane de nitrocellulose imbibée dans le tampon de lyse (Nonidet P40 0,5%, sodium deoxycholate 0,5%, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM et Tris-HCl 10 mM pH 7,2) pendant 30s. La membrane est ensuite séchée puis réhydratée 1h dans TBS (*Tris Buffered Saline*) pH 7,3 contenant du Tween-20 0,5% (Euromedex). Elle est ensuite digérée dans un tampon de protéolyse (PK 100  $\mu$ g/ml (Euromedex), du Brij35 0,1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,2) pendant 4h à 37°C pour détruire PrP<sup>C</sup>. La digestion enzymatique est stoppée pendant 30 min dans une solution de TBS + Tween-20 0,5% contenant 3 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride. La membrane est ensuite incubée 10 min dans une solution de TBS + Tween-20 0,5% contenant du thiocyanate de guanidine 3M pour dénaturer PrP<sup>Sc</sup>. Le marquage immunochimique qui suit consiste à incuber la membrane dans une solution de bloquant contenant 5% de lait écrémé dilué dans TBS + Tween 0,5% pendant 1h, avant incubation la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire de souris anti-PrP SAF32 1/1000 dans la solution de bloquant. Le lendemain, la membrane est lavée puis incubée dans l'anticorps secondaire (1/50 000) de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase de raifort pendant 1h. La

peroxydase est révélée par un substrat chemiluminescent (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce). Le signal est recueilli par la caméra Chemistart 5000 après 1 à 10 min d'exposition (logiciel ChemiCapt, Vilber-Lourmat).

## 10. Western blot

Après 3, 5 et 7 jours *in vitro*, les cultures sont congelées à -80°C et les protéines sont extraites dans 200  $\mu$ l (3 jours *in vitro*) et 150  $\mu$ l (5 et 7 jours *in vitro*) de tampon d'extraction composé de Triton X-100 1%, sodium dodécyl sulfate 0,1% (poids/vol), Tris-HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, d'un cocktail de protéases 2  $\mu$ l/ml (Sigma P8340) et de DNase 0,17  $\mu$ g/ml (Sigma). Les échantillons sont homogénéisés avec une broyeuse électrique (Argos Technologies) puis les protéines sont extraites 30 min à 4°C. Les échantillons sont centrifugés à 10000 rpm à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est repris et les concentrations en protéines sont déterminées par un test de Bradford (Bradford Ultra, Expedeon Ltd). La courbe étalon est réalisée en utilisant de l'albumine sérique bovine comme standard. Les extraits (25  $\mu$ g de protéines) sont ensuite dilués dans le tampon de réduction (Novex, 39000 Life Technologies), chauffés à 95°C à 400 rpm pendant 5 min puis soumis à l'électrophorèse dans un gel SDS-polyacrylamide 4-12% (Novex, NuPage) à 180 V pendant 45 min dans le tampon de migration (MES, Life Technologies) contenant de l'antioxydant 0,25%. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène fluoride) par électrophorèse dans le tampon de transfert (Nu-PAGE, Life Technologies) contenant de l'éthanol 20% et un antioxydant 0,1%. Le transfert est vérifié par le marquage de la membrane au rouge Ponceau. Après lavage dans du tampon TBS pH 7,2, les sites aspécifiques sont bloqués pendant 1h sous agitation dans une solution composée de Régilait 5% (poids/vol) dans TBS + Tween-20 0,1% (poids/vol) (TBST). La membrane est ensuite incubée dans l'anticorps primaire (**Tableau 6**) dilué dans Régilait 5% dans TBST pendant une nuit à 4°C sous agitation. L'anticorps anti-actine est utilisé pour contrôler la quantité de protéines ayant migré dans le gel et comme contrôle de l'immunoréactivité. La membrane est lavée dans TBST puis incubée sous agitation pendant 45 min dans l'anticorps secondaire anti-souris, anti-lapin ou anti-cochon d'Inde (1/25 000) couplé à la peroxydase de raifort dans Régilait 5% dans TBST. Après lavage dans TBST, l'immunoréactivité est révélée avec le substrat chemiluminescent (SuperSignal West Dura Substrate, Pierce). Le signal est recueilli par la caméra Chemistart 5000 et visualisé par le logiciel ChemiCapt (Vilber-Lourmat) et mesuré à l'aide du logiciel Blod-1d (Vilber-Lourmat).

Anticorps	Concentration	Marque
Anti- <b>actine</b> (souris) monoclonal	<b>1/5000</b>	Sigma A1978
Anti- <b>bécline-1</b> (lapin) polyclonal	<b>1/100</b>	Abgent E225
Anti- <b>CaBP</b> D-28K (souris) monoclonal	<b>1/1000</b>	Sigma C9848
Anti- <b>caspase-3</b> (lapin) polyclonal	<b>1/1000</b>	Cell Signalling 9661
Anti- <b>Doppel</b> (chèvre) polyclonal	<b>1/500</b>	Santa Cruz sc-16862
Anti- <b>GFAP</b> (souris) monoclonal	<b>1/10000</b>	Millipore MAB360
Anti- <b>LAMP1</b> (lapin) polyclonal	<b>1/500</b>	Abcam Ab24170
Anti- <b>LC3</b> (souris) monoclonal	<b>1/1000</b>	Nanotools 0231
Anti- <b>p62</b> (cochon d'Inde) polyclonal	<b>1/1000</b>	Progen Biotechnik GP62-C

**Tableau 6. Anticorps utilisés en Western blot.**

## 11. Microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques

Les observations sont effectuées à la Plateforme d'Imagerie In Vitro de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives CNRS UPR 3212.

### 11.1. Microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques de cervelet *Prnp<sup>0/0</sup>*

Les neurones cérébelleux ont été observés au niveau ultrastructural dans les cultures organotypiques de souris sauvages et *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*. Les tranches sont fixées après 7 et 21 jours *in vitro* en remplaçant le milieu de culture par une solution de glutaraldéhyde 2% dilué dans PB pendant 45 min à 4°C. Après 3 lavages de 10 min dans PB, les tranches sont post-fixées dans le tétr oxyde d'osmium O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 0,5% dilué dans PB pendant 1h avant d'être déshydratées dans des bains d'éthanol croissant de 10 min (25°, 50°, 70°, 95°, 2 x 100°). L'éthanol est éliminé dans l'oxyde de propylène 50 : 50 dans l'éthanol 100° pendant 8 min et dans l'oxyde de propylène pur 2 x 10 min. Les tranches sont ensuite imprégnées dans un mélange d'Araldite (Sigma) et d'oxyde de propylène 50 : 50 pendant une nuit à 4°C puis dans l'Araldite 2 x 2h. Elles sont incluses entre 2 lames de verre dans l'Araldite fraîche et mises à polymériser dans une étuve à 60°C pendant 48h. Les échantillons sont découpés (1 mm<sup>3</sup>) et collés sur un bloc d'Araldite pour permettre la réalisation de coupes semi-fines (1 µm) et ultrafines (50 à 70 nm) à l'ultramicrotome (Reichert-Jung). Les coupes sont observées au microscope électronique par transmission (Hitachi 7500) équipé d'une caméra numérique AMT Hamamatsu.

### 11.2. Microscopie électronique par transmission dans les cultures organotypiques de cervelet infectées par les prions

L'ultrastructure des neurones cérébelleux est étudiée dans les cultures organotypiques de cervelet de souris sauvages et Tga20 infectées par les souches de tremblante 22L et 139A. Les tranches sont fixées après 30 jours de culture en remplaçant le milieu de culture par une solution de glutaraldéhyde 2,5% dans PB pendant 4h

à 4°C. Après 3 lavages de 10 min dans PB, les tranches sont post-fixées dans le tétr oxyde d'osmium  $O_3O_4$  0,5% dilué dans l'eau déminéralisée pendant 1h avant d'être déshydratées et incluses à plat dans l'Araldite et soumises au protocole d'ultramicrotomie décrit plus haut (§ 11.1.).

## 12. Infection des souris par les prions

Après anesthésie par un mélange de kétamine (125 mg/kg) et de xylazine (17 mg/kg), les souris C57Bl6/J et EAAT4-eGFP sont infectées par la souche de tremblante 22L inoculée (1) par voie intra-cérébelleuse à raison de 2  $\mu$ l d'homogénat de cerveau infecté 1% (poids/vol) dans NaCl 0,9% (i.cb.), (2) par voie intra-cérébrale (2  $\mu$ l d'homogénat de cerveau infecté 1% (poids/vol) dans NaCl 0,9% dans le cortex pariéto-temporal (i.c), (3) par la voie intra-péritonéale (200  $\mu$ l d'homogénat de cerveau infecté dilué 1% (poids/vol) dans une solution de glucose 5% dans NaCl 0,9% (i.p.). Des souris C57Bl6/J (n = 3) sont infectées par la souche d'ESB 6PB1 inoculée i.c à raison de 20  $\mu$ l d'homogénat de cerveau infecté 1% dilués NaCl 0,9% (Lasmezas et al., 1996). Les souris sham subissent les mêmes injections d'homogénat de cerveau sain. Le suivi clinique des souris est effectué chaque semaine. La période d'incubation est déterminée comme l'intervalle entre l'injection et l'apparition des premiers symptômes cliniques de la maladie à prion (ataxie, trouble de l'équilibre, tremblements, prostration, perte de poids, pattes arrières resserrées quand tenue par la queue, incapacité à se redresser quand mise sur le dos). Les souris infectées par voie i.cb. sont prélevées aux stades précliniques 92 et 107 jours post-infection (jpi) et cliniques 135 et 156 jpi. Les souris infectées par voie i.c. sont prélevées aux stades cliniques 139 et 153 jpi et les souris infectées par voie i.p. sont prélevées au stade clinique 203 et 235 jpi (Kim et al., 1990).

## 13. Fixation et coupe du cervelet pour l'histologie et l'immunocytochimie

Les souris C57Bl6/J et EAAT4-eGFP anesthésiées par un mélange de kétamine (125 mg/kg) et de xylazine (17 mg/kg) sont soumises à une fixation chimique suivant quatre protocoles.

4.1. Les souris C57Bl6/J infectées par 22L i.c. et i.p. sont perfusées par l'aorte avec du PAF 4% dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 (PB). Le cervelet est disséqué et plongé dans PAF 4% pendant 24h à 4°C. Le cervelet est ensuite déshydraté dans des bains successifs d'éthanol 50° (3 x 15 min), 70° (2 x 30 min), 95° (30 min), 100° (2 x 1h) puis dans quatre bains de butanol (1h puis trois nuits) et dans un mélange de butanol et de paraffine (ParaPlast) 50:50 pendant une nuit. Le cervelet est ensuite inclus dans la paraffine à 60°C pendant six nuits. Des coupes transversales de 15  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome.

4.2. Après fixation au PAF 4% décrite ci-dessus, le cervelet des souris C57Bl6/J et transgéniques EAAT4-eGFP infectées par 22L i.c. et i.p. est cryo-protégé dans le sucrose 30% dans PB puis congelé dans l'isopentane à -80°C. Des coupes transversales de 15, 30 et 50  $\mu$ m sont réalisées au cryostat.

4.3. Les cervelets sont directement prélevés après décapitation des souris C56Bl6/J infectées i.c., i.cb. et i.p. par 22L et 6PB1 et plongés pendant 12h dans un bain de Carnoy composé d'éthanol, de chloroforme et d'acide acétique (6 :3 :1) puis immergés dans 4 bains de butanol (1h puis 3 nuits) avant inclusion dans la paraffine et coupe au microtome (15  $\mu$ m).

4.4. Les souris C57Bl6/J infectées par 22L i.p. sont perfusées par l'aorte avec un mélange de PAF 4% et glutaraldéhyde 0,1% ou de PAF2%-glutaraldéhyde 2,5% dans PB. Le cervelet est immergé une nuit dans le glutaraldéhyde 1% dans PB. Des coupes transversales de 50 ou 70  $\mu$ m sont réalisées au vibratome, lavées trois

fois 10 min dans PB puis soumises au protocole d'immunoperoxydase avant inclusion dans l'araldite et coupe ultrafine (60 nm) à l'ultramicrotome.

Les techniques histologiques, immunohistochimiques et immunocytochimiques décrites ici ont été appliquées à au moins une coupe prélevée à chacun des trois niveaux antérieur (bregma -5,40 to -6,12 mm), médian (-6,24 to -6,96 mm) et postérieur (-7,08 to -7,92 mm) (Paxinos & Franklin, 2001)

#### **14. Trichrome de Masson**

La coloration histologique au trichrome de Masson est appliquée aux coupes transversales de cervelet de souris infectées par 22L afin de visualiser la spongiose et d'établir le profil lésionnel de la souche 22L dans le cervelet (n = 22 i.cb., 5 i.c. et 11 i.p.). Le degré de spongiose est évalué selon une échelle de score allant de 0 (aucune vacuole) à 5 (vacuoles nombreuses et confluentes à travers l'aire considérée) dans le cortex, la substance blanche et les noyaux profonds du cervelet (Fraser & Dickinson, 1968 ; Kim et al., 1990). De plus, une approche menée en parallèle a évalué le nombre de vacuoles en fonction de la topographie des dépôts de PrP<sup>22L</sup> dans la couche moléculaire et granulaire du cervelet (n = 4).

#### **15. Immunohistochimie de PrP<sup>22L</sup> et PrP<sup>6PB1</sup>**

Les coupes de cervelet des souris sham et infectées par 22L sont déparaffinées dans deux bains de toluène de 10 min suivis de deux bains d'éthanol pur (10 min) puis réhydratées dans des bains d'éthanol décroissant (95°, 70°, 50°) et un bain d'eau déminéralisée. Les coupes de cervelet EAAT4-eGFP sont réhydratées dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 contenant NaCl 0,9% (PBS) puis les cellules de Purkinje fluorescentes sont visualisées et photographiées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence (AxioImager, Zeiss équipé d'une caméra numérique ProgRed CF cool Jenoptik). Les coupes sont ensuite incubées dans la PK (EuroBio) 1/5000 dans PBS + Triton X-100 0,25% (PBST) pendant 10 min à 37°C afin de détruire la PrP<sup>C</sup> endogène également reconnue par l'anticorps anti-PrP SAF32. Les coupes sont lavées 10 min dans l'eau déminéralisée et PrP<sup>22L</sup>/PrP<sup>6PB1</sup> est dénaturée 15 min dans le thiocyanate de guanidine 3,4 M dans PBST. Après deux rinçages dans PBS, les peroxydases endogènes sont bloquées 10 min dans la solution Peroxidase Block du kit EnVision (Dako) ou dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% dans le méthanol. Les coupes sont ensuite incubées 45 min dans le sérum normal de chèvre 20% dans PBST puis une nuit à 4°C dans l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-PrP SAF32 (don de J. Grassi) dilué 1 µg/ml dans PBST contenant 0,5% de sérum normal de chèvre. Le lendemain, les coupes sont rincées dans PBS puis incubées dans l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris biotinylé ou couplé à la peroxydase de raifort en suivant les instructions du kit EnVision (Dako) ou du kit Elite (Vector). Après lavage dans PBS puis l'eau déminéralisée, les coupes sont séchées, plongées dans le toluène puis montées entre lame et lamelle dans l'Eukitt.

#### **16. Double marquage immunohistochimique de PrP<sup>22L</sup> et d'un marqueur cellulaire dans le cervelet infecté par 22L**

Les coupes de cervelet déparaffinées et réhydratées dans PBS et les coupes à congélation (cryocoupes) sont soumises au protocole d'immunohistochimie afin de visualiser les marqueurs des cellules de Purkinje (CaBP et aldolase-C), de la glie astrocytaire (GFAP et EAAT1), des cellules microgliales activées (Iba1) ou des neurones

(NeuN). Elles sont ensuite soumises au protocole de révélation immunohistochimique de PrP<sup>22L</sup> décrit ci-dessus. Les coupes réhydratées dans PBS sont incubées dans le sérum normal de chèvre (NGS) 3% dans PBS + Triton-X100 0,1% pendant 45 min, puis incubées la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire (**Tableau 7**) dans PBS + Triton-X100 0,1% + 0,5% NGS. Le lendemain, les coupes sont rincées dans PBS puis incubées 1h dans l'anticorps anti-souris ou anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 546 ou Alexa 555 (Molecular Probes) dilué au 1/200 dans PBS + Triton-X100 0,1%. Les coupes sont rincées puis observées et photographiées au microscope à épi-fluorescence (AxioImager, Zeiss) avant d'être soumises au protocole de révélation de PrP<sup>22L</sup>.

<b>Anticorps</b>	<b>Concentration</b>	<b>Marque</b>
Anti- <b>Aldolase-C</b> (lapin) polyclonal	<b>1/50</b>	Don de I. Sugihara
Anti- <b>CaBP</b> D-28K (souris) monoclonal	<b>1/100</b>	Sigma C9848
Anti- <b>EAAT1/GLAST</b> (souris) monoclonal	<b>1/300</b>	Abcam ab49643
Anti- <b>GFAP</b> (lapin) polyclonal	<b>1/300</b>	Sigma G3893
Anti- <b>Iba1</b> (lapin) polyclonal	<b>1/250</b>	Wako 019-10741
Anti- <b>NeuN</b> (lapin) polyclonal	<b>1/1000</b>	Millipore Mab377
Anti- <b>PrP SAF32</b> (souris) monoclonal	<b>1/500</b>	Don de J. Grassi
Anti- <b>TNFR1</b> (lapin) polyclonal	<b>1/50</b>	MBL International JM-3125
Anti- <b>VGLUT1</b> (cochon d'Inde) polyclonal	<b>1/1000</b>	Synaptic System 135-304

**Tableau 7. Anticorps utilisés en immunohistochimie.**

### **17. Double marquage par immunohistochimique de TNFR1 et de PrP<sup>22L</sup> dans le cervelet infecté par 22L**

Les coupes de cervelet fixées au Carnoy sont déparaffinées et réhydratées. Les cryocoupes fixées au PAF 4% sont soumises à un démasquage des antigènes dans le tampon citrate 10 mM pH 6 à 100°C pendant 15 min. Toutes les coupes sont rincées dans PBS et incubées 45 min dans 3% NGS dans PBS puis dans l'anticorps primaire de lapin anti-TNFR1 (MBL International) au 1/50 dans 0,3% NGS dans PBS pendant la nuit à 4°C. Après trois lavages dans PBS, les coupes sont incubées dans l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes) au 1/200 dans PBS pendant 1h. Les coupes sont rincées puis observées et photographiées au microscope à épi-fluorescence (AxioImager, Zeiss) puis soumises au protocole de révélation de PrP<sup>22L</sup>.

## **18. Double marquage immunohistochimique de TNFR1 et des marqueurs cellulaires dans le cervelet infecté par 22L**

Les cryocoupes de cervelet sont soumises au protocole de marquage de TNFR1 (§ 17) et des marqueurs de cellules de Purkinje (CaBP, aldolase-C), d'astrocytes (GFAP, EAAT1) et du transporteur de glutamate présynaptique VGLUT1 des fibres parallèles, (**Tableau 7**, § 16). Dans certains cas, le marquage immunohistochimique de PrP<sup>22L</sup> est réalisé sur les mêmes coupes ou sur des coupes adjacentes. Les coupes fixées au Carnoy sont soumises au protocole immunohistochimique pour TNFR1 sans l'étape de démasquage des antigènes, puis au protocole immunohistochimique pour CaBP, aldolase-C, GFAP, EAAT1 ou VGLUT1 selon le protocole décrit plus haut (§ 16).

## **19. Analyse quantitative des cellules de Purkinje dans le cervelet de souris infectées par 22L**

Une coupe transversale par niveau antérieur, médian et postérieur du cervelet des souris transgéniques EAAT4-eGFP sham (n = 4) et infectées par 22L i.cb. (n = 9), i.c. (n = 7) et i.p. (n = 6) au stade clinique est soumise au protocole immunohistochimique pour la détection de CaBP. La longueur de la couche des cellules de Purkinje est mesurée chez les souris sham et les cellules de Purkinje sont comptées le long de celle-ci en utilisant le logiciel ImageJ. Le rapport du nombre de cellules de Purkinje sur la longueur occupée par ces cellules de Purkinje dans le vermis et les hémisphères des souris sham est la densité linéaire des cellules de Purkinje mesurée par mm dans chaque région, permettant ainsi de s'affranchir du rétrécissement dû à la dégénérescence du cervelet infecté par les prions. De plus, la densité linéaire des cellules de Purkinje fluorescentes pour EAAT4-eGFP est mesurée et comparée à la densité linéaire des cellules de Purkinje marquées seulement par CaBP pour estimer la perte des cellules de Purkinje en fonction du patron d'expression d'EAAT4.

## **20. Analyse quantitative des cellules granulaires dans le cervelet de souris infectées par 22L**

Une coupe transversale du cervelet par souris non-infectée (n = 5) et infectée par 22L i.c. (n = 3), i.cb. (n = 8) et i.p. (n = 5) est soumise à l'immunofluorescence (i.c.) ou l'immunoperoxydase (i.cb. et i.p.) de NeuN décrite ci-dessus (§ 16). Les coupes déparaffinées et réhydratées dans PBS sont incubées dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% dans méthanol 100% pour neutraliser les peroxydases endogènes. Après un lavage 5 min dans l'eau déminéralisée et 10 min dans PBS, les coupes sont incubées 45 min dans le sérum normal de cheval (NHS) 3% dans PBS + Triton-X100 0,5% puis dans l'anticorps primaire de souris anti-NeuN 1/1000 (**Tableau 7**) dans NHS 0,3% dans PBS + Triton-X100 0,1%. Le lendemain, les coupes sont rincées dans PBS puis incubées 1h dans l'anticorps anti-souris biotinylé 1/400 (kit Elite, Vector) dans PBS + 0,3% NHS en suivant les instructions du kit Elite (Vector). Les coupes sont rincées puis observées et photographiées au microscope (AxioImager, Zeiss) avant d'être soumises au protocole de révélation de PrP<sup>22L</sup>. L'aire occupée par les noyaux des cellules granulaires marqués par NeuN par mm<sup>2</sup> de couche granulaire interne est mesurée avec le logiciel AxioVision puis divisée par la surface moyenne d'un noyau de CG mesuré sur 50 CGs afin d'obtenir la densité des CGs dans le cervelet. Consécutivement au marquage de NeuN en immunofluorescence dans le cervelet de souris infectées par 22L i.c., le marquage de PrP<sup>22L</sup> en immunoperoxydase permet de mesurer la densité des CGs dans la couche granulaire interne sous-

jacente aux bandes de dépôt de PrP<sup>22L</sup> afin d'obtenir la densité des CGs en fonction du patron de déposition de PrP<sup>22L</sup>.

### **21. Analyse quantitative des interneurones dans le cervelet infecté par 22L**

Une coupe transversale de cervelet par souris non-infectée (n = 2) et infectée par 22L i.cb. (n = 10) et i.p. (n = 6) est soumise à l'immunoperoxydase de NeuN décrite ci-dessus (§ 20). La surface des interneurones marqués par immunoperoxydase de NeuN dans la couche moléculaire par mm<sup>2</sup> de couche moléculaire est divisée par la surface moyenne d'un interneurone pour obtenir la densité des interneurones dans le cervelet (nombre moyen d'interneurones/mm<sup>2</sup>).

### **22. Analyse quantitative des cellules microgliales activées dans le cervelet infecté par 22L**

Une coupe transversale au niveau médian du cervelet de souris transgéniques EAAT4-eGFP non-infectées (n = 1) et infectées par 22L i.c. (n = 4) est soumise à l'immunofluorescence de Iba-1 décrite ci-dessus. Les coupes sont observées et photographiées au microscope à épi-fluorescence (AxioImager, Zeiss) puis soumises au protocole de révélation de PrP<sup>22L</sup> (§ 15). Les cellules microgliales activées sont comptées dans les bandes de PrP<sup>22L</sup> PrP(+) et dans les bandes PrP(-) adjacentes, afin d'obtenir la densité des cellules microgliales par mm<sup>2</sup> de bandes PrP(+) et PrP(-).

### **23. Statistiques**

Les données sont exprimées comme la densité de cellules ( $\pm$  écart-type) afin de comparer le nombre de cellules de Purkinje, de CGs, d'interneurones et de cellules microgliales dans le cervelet infecté vs. non-infecté, en fonction du patron de déposition de PrP<sup>22L</sup>. La comparaison entre les groupes est effectuée par un test ANOVA à un facteur ou un test ANOVA à deux facteurs (facteurs « infection » et « bande EAAT4 » et facteurs « infection » et « régions du cervelet ») quand les conditions d'application sont satisfaites, suivi d'un test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences entre les groupes sont jugées significatives au seuil  $p \leq 0,05\%$ .



# **BIBLIOGRAPHIE**

- Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27:53–66.
- Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Parton RG, van der Goot FG (1998) A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 140(3):525-40.
- Adams JM & Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381):1322-6.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22:9430–44.
- Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Schätzl HM, Ertmer A (2009) Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy* 5(3):361-9.
- Aguzzi A & Falsig J (2012) Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci* 15(7):936–9.
- Ahn AH, Dziennis S, Hawkes R, Herrup K (1994) The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C. *Development* 120(8):2081-90.
- Al Bersaoui R, Robert I, Lutz Y, Blanc F, Sommermeyer-Leroux G, Shibaguchi H, Aunis D, Fuchs JP (2005) Purkinje-cell degeneration in prion protein-deficient mice is associated with a cerebellum-specific Doppel protein species signature. *FEBS Lett* 579(12):2715-21.
- Alfa Cissé M, Sunyach C, Slack BE, Fisher A, Vincent B, Checler F (2007) M1 and M3 muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity. *J Neurosci* 27(15):4083-92.
- Alisky JM & Tolbert DL (1997) Quantitative analysis of converging spinal and cuneate mossy fibre afferent projections to the rat cerebellar anterior lobe. *Neurosci* 80(2):373-88.
- Alleaume-Butaux A, Dakowski C, Pietri M, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2013) Cellular prion protein is required for neuritogenesis: fine-tuning of multiple signaling pathways involved in focal adhesions and actin cytoskeleton dynamics. *Cell Health Cytoskelet* 5:1-12.
- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acids? *Nature* 214:764-6.
- Altman J & Bayer SA (1997). *Development of the cerebellar system: In Relation to its Evolution, Structure and Functions*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Altmeppen HC, Prox J, Puig B, Dohler F, Falker C, Krasemann S, Glatzel M (2013) Roles of endoproteolytic  $\alpha$ -cleavage and shedding of the prion protein in neurodegeneration. *FEBS J* 280(18):4338-47.
- Anderson L, Rossi D, Linehan J, Brandner S, Weissmann C (2004) Transgene-driven expression of the Doppel protein in Purkinje cells causes Purkinje cell degeneration and motor impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3644-3649.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12(1):25-31.
- Antonyuk SV, Trevitt CR, Strange RW, Jackson GS, Sangar D, Batchelor M, Cooper S, Fraser C, Jones S, Georgiou T, Khalili-Shirazi A, Clarke AR, Hasnain SS, Collinge J (2009) Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(8):2554-8.
- Aoki E, Semba R, Kashiwamata S (1986) New candidates for GABAergic neurons in the rat cerebellum: an immunocytochemical study with anti-GABA antibody. *Neurosci Lett* 68(3):267-71.
- Apps R (1998) Input-output connections of the "hindlimb" region of the inferior olive in cats. *J Comp Neurol* 399(4):513-29.
- Apps R & Garwicz M (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci* 6(4):297-311.
- Apps R & Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 10(9):670-81.
- Armendariz AD, Gonzalez M, Loguinov AV, Vulpe CD (2004) Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiol Genomics* 20(1):45-54.

- Armstrong DM, Harvey RJ, Schild RF (1973) The spatial organisation of climbing fibre branching in the cat cerebellum. *Exp Brain Res* 18(1):40-58.
- Armstrong CL & Hawkes R (2000a) Pattern formation in the cerebellar cortex. *Biochem Cell Biol* 78(5):551-62.
- Armstrong CL, Krueger-Naug AM, Currie RW, Hawkes R (2000b) Constitutive expression of the 25-kDa heat shock protein Hsp25 reveals novel parasagittal bands of purkinje cells in the adult mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 416(3):383-97.
- Armstrong RA & Cairns NJ (2003) Spatial patterns of the pathological changes in the cerebellar cortex in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD). *Folia Neuropathol* 41(4):183-9.
- Armstrong RA, Ironside JW, Lantos PL, Cairns NJ (2009) A quantitative study of the pathological changes in the cerebellum in 15 cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *Neuropathol Appl Neurobiol* 35(1):36-45.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4(11):1116-22.
- Ashford T & Porter KR (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 12 :198-202.
- Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S (2003) Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 278:28944-28949.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182(4):685-701.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513(5):532-41.
- Azizi SA & Woodward DJ (1987) Inferior olivary nuclear complex of the rat: morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 263(4):467-84.
- Bailly Y, Schoen SW, Delhaye-Bouchaud N, Kreutzberg GW, Mariani J (1995) 5'-nucleotidase activity as a synaptic marker of parasagittal compartmentation in the mouse cerebellum. *J Neurocytol* 24(11):879-90.
- Bailly Y, Haeberlé AM, Blanquet-Grossard F, Chasserot-Golaz S, Grant N, Schulze T, Bombarde G, Grassi J, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C (2004) 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(2):244-69.
- Baker HF, Duchon LW, Jacobs JM, Ridley RM (1990) Spongiform encephalopathy transmitted experimentally from Creutzfeldt-Jakob and familial Gerstmann-Sträussler-Scheinker diseases. *Brain* 113(Pt 6):1891-909.
- Barbieri G, Palumbo S, Gabrusiewicz K, Azzalin A, Marchesi N, Spedito A, Biggiogera M, Sbalchiero E, Mazzini G, Miracco C, Pirtoli L, Kaminska B, Comincini S (2011) Silencing of cellular prion protein (PrPc) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy* 7(8):840-53.
- Bareggi SR, Braidà D, Gervasoni M, Carcassola G, Pollera C, Verzoni C, Sala M (2003) Neurochemical and behavioural modifications induced by scrapie infection in golden hamsters. *Brain Res* 984(1-2):237-41.
- Barry RA, Kent SB, McKinley MP, Meyer RK, DeArmond SJ, Hood LE, Prusiner SB (1986) Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *J Infect Dis* 153(5):848-54.
- Baskakov IV, Legname G, Gryczynski Z, Prusiner SB (2004) The peculiar nature of unfolding of the human prion protein. *Protein Sci* 13(3):586-95.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli 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):417-28.
- Bassant MH, Picard M, Olichon D, Cathala F, Court L (1986) Changes in the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic levels in the brain of scrapie-infected rats. *Brain Res* 367(1-2):360-3.
- Bate C, Reid S, Williams A (2001) Killing of prion-damaged neurones by microglia. *Neuroreport* 12(11):2589-94.

- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rülcke T, Bürkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* 26(2):538-47.
- Baumann F, Pahnke J, Radovanovic I, Rülcke T, Bremer J, Tolnay M, Aguzzi A (2009) Functionally relevant domains of the prion protein identified in vivo. *PLoS One* 4(9):e6707.
- Beekes M & McBride PA (2007) The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J* 274(3):588-605.
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14:724-38.
- Belichenko PV, Miklossy J, Belser B, Budka H, Celio MR (1999) Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 6(4):269-79.
- Belichenko PV, Brown D, Jeffrey M, Fraser JR (2000) Dendritic and synaptic alterations of hippocampal pyramidal neurons in scrapie-infected mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26(2): 143-9.
- Bengtsson F & Jörntell H (2009) Sensory transmission in cerebellar granule cells relies on similarly coded mossy fiber inputs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7):2389-94.
- Benilova I & De Stropper B (2010) Prion protein in Alzheimer's pathogenesis: a hot and controversial issue. *EMBO Mol Med* 2: 289-90.
- Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, Queiroz NG, Young K, Rylett RJ, Markus RP, Prado MA, Martins VR (2010) Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. *J Biol Chem* 285(47):36542-50.
- Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, Machado CF, Roffe M, Hajj GN, Lee KS, Magalhaes AC, Caetano FA, Mancini GL, Lopes MH, Americo TA, Magdesian MH, Ferguson SS, Linden R, Prado MA, Martins VR (2011) Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J* 25: 265e279.
- Berkley KJ & Hand PJ (1978) Projections to the inferior olive of the cat. II. Comparisons of input from the gracile, cuneate and the spinal trigeminal nuclei. *J Comp Neurol* 180(2):253-64.
- Bett C, Kurt TD, Lucero M, Trejo M, Rozemuller AJ, Kong Q, Nilsson KP, Maslah E, Oldstone MB, Sigurdson CJ (2013) Defining the conformational features of anchorless, poorly neuroinvasive prions. *PLoS Pathog* 9(4):e1003280.
- Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rülcke T, Janett F, Heppner FL, Ledermann B, Aguzzi A (2002) Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO J* 21(14):3652-8.
- Bergles DE, Dzubay JA, Jahr CE (1997) Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14821-5.
- Bessen RA & Marsh RF (1992) Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66:2096-101.
- Bessen RA & Marsh RF (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68(12):7859-68.
- Betmouni S, Clements J, Perry VH (1999a) Vacuolation in murine prion disease: an informative artifact. *Curr Biol* 9:R677-9.
- Betmouni S & Perry VH (1999b) The acute inflammatory response in CNS following injection of prion brain homogenate or normal brain homogenate. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(1):20-8.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391(6664):281-5.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Baretta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4(7):702-10.
- Bhutia SK, Dash R, Das SK, Azab B, Su ZZ, Lee SG, Grant S, Yacoub A, Dent P, Curiel DT, Sarkar D, Fisher PB (2010) Mechanism of autophagy to apoptosis switch triggered in prostate cancer cells by antitumor cytokine melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin-24. *Cancer Res* 70(9):3667-76.

- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171:603–14.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33.
- Blenkinsop TA & Lang EJ (2006) Block of inferior olive gap junctional coupling decreases Purkinje cell complex spike synchrony and rhythmicity. *J Neurosci* 26(6):1739-48.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8(1):57-69.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243(1-2):240-6.
- Boellaard JW, Schlote W, Tateishi J (1989) Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol* 78:410-8.
- Boland B & Nixon RA (2006) Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. *Mol Aspects Med* 27(5-6):503-19.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218(4579):1309-11.
- Bolton DC, Rudelli RD, Currie JR, Bendheim PE (1991) Copurification of Sp33-37 and scrapie agent from hamster brain prior to detectable histopathology and clinical disease. *Journal of General Virology*. 72:2905-13.
- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267(23):16188-99.
- Borchelt DR, Rogers M, Stahl N, Telling G, Prusiner SB (1993) Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* 3(4):319-29.
- Bossy J (1990) Anatomie clinique : Neuro-anatomie. Editeur : Birkhäuser.
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 276(42):39145-9.
- Bouzamondo-Bernstein E, Hopkins SD, Spilman P, Uyehara-Lock J, Deering C, Safar J, Prusiner SB, Ralston HJ 3rd, DeArmond SJ (2004) The neurodegeneration sequence in prion diseases: evidence from functional, morphological and ultrastructural studies of the GABAergic system. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(8):882-99.
- Bovellan M, Fritzsche M, Stevens C, Charras G (2010) Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: blebbing in programmed cell death. *FEBS J* 277(1):58-65.
- Bower JM, Beermann DH, Gibson JM, Shambes GM, Welker W (1981) Principles of organization of a cerebro-cerebellar circuit. Micromapping the projections from cerebral (SI) to cerebellar (granule cell layer) tactile areas of rats. *Brain Behav Evol* 18(1-2):1-18.
- Bower JM & Woolston DC (1983) Congruence of spatial organization of tactile projections to granule cell and Purkinje cell layers of cerebellar hemispheres of the albino rat: vertical organization of cerebellar cortex. *J Neurophysiol* 49(3):745-66.
- Braak H & Braak E (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82:239-59.
- Brambilla L, Martorana F, Rossi D (2013) Astrocyte signaling and neurodegeneration: new insights into CNS disorders. *Prion* 7(1): 28–36.
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379(6563):339-43.
- Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13(3):310-8.

- Broadwell RD & Cataldo AM (1984) The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals. *J Comp Neurol* 230(2):231-48.
- Brodal A & Jansen J (1946) The ponto-cerebellar projection in the rabbit and cat. *J Comp Neurol* 84:31-118.
- Brodal A (1969) Neurological anatomy in relation to clinical medicine. London, Oxford University Press.
- Brown P, Liberski PP, Wolff A, Gajdusek DC (1990) Conservation of infectivity in purified fibrillary extracts of scrapie-infected hamster brain after sequential enzymatic digestion or polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7240-4.
- Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG, Gajdusek DC (1994). Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 35(5):513-29.
- Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380(6572):345-7.
- 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):684-7.
- Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146(1):104-12.
- Brown D, Halliday W, Jeffrey M, Fraser JR (1997c) Visualising scrapie infected and normal neurons in the murine hippocampus using Golgi impregnation and confocal imaging of intracellular dye. *J Cell Pathol* 2:131-136.
- Brown DR, Wong B-S, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344:1-5.
- Brown D, Belichenko P, Sales J, Jeffrey M, Fraser J R (2001) Early loss of dendritic spines in murine scrapie revealed by confocal analysis. *NeuroReport* 12(1):179-83.
- Brown IE & Bower JM (2001) Congruence of mossy fiber and climbing fiber tactile projections in the lateral hemispheres of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 429(1):59-70.
- Brown DR & Sassoon J (2002) Copper-dependent functions for the prion protein. *Mol Biotechnol* 22(2):165-78.
- Brown LR & Harris DA (2003) Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem* 87(2):353-63.
- Brown GC & Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 41(2-3):242-7.
- Bruce ME & Fraser H (1982) Focal and asymmetrical vacuolar lesions in the brains of mice infected with certain strains of scrapie. *Acta Neuropathol* 58(2):133-40.
- Bruce ME, McBride PA, Farquhar (1989) Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 102:1-6.
- Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG (1991) The disease characteristics of different strains of scrapie in *Sinc* congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol* 72:595-603.
- Brugg B, Dubreuil YL, Huber G, Wollman EE, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1995) Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(7):3032-5.
- Brun A, Gottfries CG, Roos BE (1971) Studies of the monoamine metabolism in the central nervous system in Jakob-Creutzfeldt disease. *Acta Neurol Scandinav* 47:642-5.
- Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, Haltia M, Hauw JJ, Ironside JW, Jellinger K, et al (1995) Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* 5(4):459-66.
- Budka H (2000) Histopathology and immunohistochemistry of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). *Arch Virol Suppl* (16):135-42.
- Budka H (2003) Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull* 66:121-30.

- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356(6370):577–82.
- Buffo A & Rossi F (2013) Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol* 109:42-63.
- Bunge MB (1973) Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 56(3):713-35.
- Buono P, D'Armiento FP, Terzi G, Alfieri A, Salvatore F (2001) Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system. *J Neurocytol* 30(12):957-65.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273(43):27765-7.
- Cabal-Hierro L & Lazo PS (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 24(6):1297-305.
- Campbell NC & Armstrong DM (1983) Topographical localization in the olivocerebellar projection in the rat: an autoradiographic study. *Brain Res* 275(2):235-49.
- Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV (1994) Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* 68:2383–7.
- Campeau JL, Wu G, Bell JR, Rasmussen J, Sim VL (2013) Early increase and late decrease of purkinje cell dendritic spine density in prion-infected organotypic mouse cerebellar cultures. *PLoS One* 8(12):e81776.
- Capellari S, Zaidi SI, Long AC, Kwon EE, Petersen RB (2000) The Thr183Ala mutation, not the loss of the first glycosylation site, alters the physical properties of the prion protein. *J Alzheimers Dis* 2:27–35
- Carlson GA, Westaway D, DeArmond SJ, Peterson-Torchia M, Prusiner SB (1989) Primary structure of prion protein may modify scrapie isolate properties. *Proc Natl Acad Sci* 86:7475–9.
- Castilla J, Saá P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121(2):195-206.
- Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA (1996) Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16(1):186-99.
- Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA (1998) Strain-dependant differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* 272:32230-5.
- 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* 266:18217-23.
- Chan-Palay V, Palay SL, Brown JT, Van Itallie C (1977) Sagittal organization of olivocerebellar and reticulocerebellar projections: autoradiographic studies with 35S-methionine. *Exp Brain Res* 30(4):561-76.
- Chang YY & Neufeld TP (2009) An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell* 20:2004–14.
- 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):19173-80.
- Chen S, Mangé A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22(2):227-33.
- Chen RJ, Chang WW, Lin YC, Cheng PL, Chen YR (2013) Alzheimer's amyloid- $\beta$  oligomers rescue cellular prion protein induced tau reduction via the Fyn pathway. *ACS Chem Neurosci* 4(9):1287-96.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8(3):705-11.
- Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19:668–81.

- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21(13):3317-26.
- Chiarini A, Dal Pra I, Whitfield JF, Armato U (2006) The killing of neurons by beta-amyloid peptides, prions, and pro-inflammatory cytokines. *Ital J Anat Embryol* 111(4):221-46.
- 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):1339-51.
- 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 USA* 97(10):5574-9.
- Chiesa R, Piccardo P, Dossena S, Nowoslawski L, Roth KA, Ghetti B, Harris DA (2005) Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(1):238-43.
- Chiti Z, Knutsen OM, Betmouni S, Greene JRT (2006) An integrated, temporal study of the behavioural, electrophysiological and neuropathological consequences of murine prion disease. *Neurobiol Dis* 22(2): 363-73.
- Choi YP, Groner A, Ironside JW, Head MW (2011) Correlation of polydispersed prion protein and characteristic pathology in the thalamus in variant Creutzfeldt-Jakob disease: implication of small oligomeric species. *Brain Pathol* 21:298-307.
- Chou SM, Payne WN, Gibbs CJ, Gadjusek DC (1980) Transmission and scanning electron microscopy of spongiform change in Creutzfeld-Jakob disease. *Brain* 103:885-904.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008) Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151(1):10-27.
- Chu CT (2006) Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:423.
- Cid TP, Fernández MC, Benito Martínez S, Jones NL (2013) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 18(Suppl 1):12-7.
- Ciesielski-Treska J, Grant NJ, Ulrich G, Corrotte M, Bailly Y, Haeberle AM, Chasserot-Golaz S, Bader MF (2004) Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* 46(2):101-15.
- Cinar HN, Kothary M, Datta AR, Tall BD, Sprando R, Bilecen K, Yildiz F, McCardell B (2010) *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, developmental delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5(7):e11558.
- Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, Øvervatn A, Stenmark H, Bjørkøy G, Simonsen A, Johansen T (2010) p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 6(3):330-44.
- Clinton J, Forsyth C, Royston MC, Roberts GW (1993) Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. *Neuroreport* 4(1):65-8.
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16.
- Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I (2003) Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* 14(10):1375-9.
- Colby DW & Prusiner SB (2011) Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(1):a006833.
- Cole S & Kimberlin RH (1985) Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of vacuolation in brain and spinal cord after intraperitoneal infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 11(3):213-27.
- Colling SB, Collinge J, Jefferys JG (1996) Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K+ currents. *Neurosci Lett* 209(1):49-52.
- 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):295-7.
- Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Gowland I, Medori R, Ironside J, Lantos P (1995). Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet* 346(8974):569-70.



- Collins S, McLean CA, Masters CL (2001) Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* 8(5):387-97.
- Collins CA, Wairkar YP, Johnson SL, DiAntonio A (2006) Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* 51:57-69.
- Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C (2002) Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112(1):7-11.
- Come JH, Fraser PE, Lansbury PT Jr (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(13):5959-63.
- Cooper SE, Martin JH, Ghez C (2000) Effects of inactivation of the anterior interpositus nucleus on the kinematic and dynamic control of multijoint movement. *J Neurophysiol* 84(4):1988-2000.
- Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA (2012) Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *J Neurosci* 32:12396-12405.
- Coulpier M, Messiaen S, Hamel R, Fernández de Marco M, Lilin T, Eloit M (2006) Bax deletion does not protect neurons from BSE-induced death. *Neurobiol Dis* 23(3):603-11.
- Courville J, Faraco-Cantin F, Diakiw N (1974) A functionally important feature of the distribution of the olivocerebellar climbing fibers. *Can J Physiol Pharmacol* 52(6):1212-7.
- Courville J & Faraco-Cantin F (1978) On the origin of the climbing fibers of the cerebellum. An experimental study in the cat with an autoradiographic tracing method. *Neuroscience* 3(9):797-809.
- Creutzfeldt HG (1920) Über eine egenartige herdformige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiat* 57:1-18.
- Criado JR, Sánchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 19(1-2):255-65.
- Cronier S, Laude H, Peyrin JM (2004) Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(33):12271-6.
- Cronier S, Carimalo J, Schaeffer B, Jaumain E, Béringue V, Miquel MC, Laude H, Peyrin JM (2012) Endogenous prion protein conversion is required for prion-induced neuritic alterations and neuronal death. *FASEB J* 26(9):3854-61.
- Cuervo AM (2004a) Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263(1-2):55-72.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004b) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305(5688):1292-5.
- Cui T, Holme A, Sassoon J, Brown DR (2003) Analysis of doppel protein toxicity. *Mol Cell Neurosci* 23(1):144-55.
- Cuillé J & Chelle PL (1936) Pathologie animale. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ? *CR Acad Sci (Paris)* 203: 1552-4.
- Cunningham C, Deacon R, Wells H, Boche D, Waters S, Diniz CP, Scott H, Rawlins JN, Perry VH (2003) Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *Eur J Neurosci* 17(10): 2147-55.
- Cunningham C, Deacon RM, Chan K, Boche D, Rawlins JN, Perry VH (2005) Neuropathologically distinct prion strains give rise to similar temporal profiles of behavioral deficits. *Neurobiol Dis* 18(2):258-69.
- Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, Rawlins JN, Perry VH (2009) Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* 65(4):304-12.
- Curtis J, Errington M, Bliss T, Voss K, MacLeod N (2003) Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiol Dis* 13(1):55-62.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

- Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Deslys J-P, Lasmézas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M (1998) Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem* 273:7691-7.
- Davies P & Brown DR (2008) The chemistry of copper binding to PrP: is there sufficient evidence to elucidate a role for copper in protein function? *Biochem J* 410(2):237-44.
- DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB (1987) Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 37:1271-80.
- DeArmond SJ, Kristensson K, Bowler RP (1992) PrP<sup>Sc</sup> causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox. *Prog Brain Res* 94:437-46.
- DeArmond SJ, Yang SL, Lee A, Bowler R, Taraboulos A, Groth D, Prusiner SB (1993) Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(14):6449-53.
- DeArmond SJ & Prusiner SB (1995) Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol* 146(4):785-811.
- DeBurman SK, Raymond GJ, Caughey B, Lindquist S (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13938-43.
- Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* 18(10):3606-19.
- Delault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425:717-20.
- Delault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S (2007) Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9741-6.
- Deleault NR, Walsha DJ, Piroa JR, Wang F, Wang X, Mab J, Rees JR, Supattapone S (2012) Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(28):e1938-46.
- Desclin JC (1974) Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Res* 77(3):365-84.
- De Strooper B (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90(2):465-94.
- 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* 64:719-727.
- Diaz-Espinoza R & Soto C (2012) High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol* 19(4):370-7.
- Dickinson AG (1976) Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* 44:209-41.
- Dickinson AG & Taylor DM (1978) Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med* 299:1413-4.
- Dickinson AG & Outram GW (1979) The scrapie replication-site hypothesis and its implications for pathogenesis. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, vol 2:13-31. Edited by Prusiner SB & Hadlow WJ. New York & London: Academic Press.
- Didonna A, Sussman J, Benetti F, Legname G (2012) The role of Bax and caspase-3 in doppel-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Prion* 6:309-16.
- Diringer H, Beekes M, Ozel M, Simon D, Queck I, Cardone F, Pocchiari M, Ironside JW (1997) Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* 40(4):238-46.
- Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G (2010) Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* 29(12):1717-9.
- Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 74:4894-7.

- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem* 281:30684-96.
- Dopp JM, Sarafian TA, Spinella FM, Kahn MA, Shau H, de Vellis J (2002) Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochem Res* 27(11):1535-42.
- Dorandeu A, Wingertsmann L, Chrétien F, Delisle MB, Vital C, Parchi P, Montagna P, Lugaresi E, Ironside JW, Budka H, Gambetti P, Gray F (1998) Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 8(3):531-7.
- Dow RS & Moruzzi G (1958) *The Physiology and Pathology of the Cerebellum*. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Drew SC, Haigh CL, Klemm HM, Masters CL, Collins SJ, Barnham KJ, Lawson VA (2011) Optical imaging detects apoptosis in the brain and peripheral organs of prion-infected mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(2):143-50.
- Dron M, Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Haw J-J, Lebon P, Dormont D, Tovey MG (1998) Characterization of the human analogue of a scrapie-responsive gene. *J Biol Chem* 273:18015-8.
- Dron M, Bailly Y, Beringue V, Haeberlé AM, Griffond B, Risold PY, Tovey MG, Laude H, Dandoy-Dron F (2005) Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *Eur J Neurosci* 22(1):133-46.
- Dron M, Bailly Y, Beringue V, Haeberlé A-M, Griffond B, Risold P-Y, Tovey MG, Laude H, Dandoy-Dron F (2006) SCRG1, a potential marker of autophagy in transmissible spongiform encephalopathies. *Autophagy* 2:58-60.
- Dusart I, Guenet JL, Sotelo C (2006) Purkinje cell death: Differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *The Cerebellum* 5:163-73.
- Eccles JC, Llinás R, Sasaki K (1966) The inhibitory interneurons within the cerebellar cortex. *Exp Brain Res* 1(1):1-16.
- Eccles JC (1967) Circuits in the cerebellar control of movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(1):336-43.
- Eccles JC (1973) The cerebellum as a computer: patterns in space and time. *J Physiol* 229(1):1-32.
- Eghiaian F, Grosclaude J, Lesceu S, Debey P, Doublet B, Tréguer E, Rezaei H, Knossow M (2004) Insight into the PrPC → PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28):10254-9.
- Ehsani S, Huo H, Salehzadeh A, Pocanschi CL, Watts JC, Wille H, Westaway D, Rogaeva E, St George-Hyslop PH, Schmitt-Ulms G (2011) Family reunion--the ZIP/prion gene family. *Prog Neurobiol* 93(3):405-20.
- Ekerot CF, Garwicz M, Schouenborg J (1991) The postsynaptic dorsal column pathway mediates cutaneous nociceptive information to cerebellar climbing fibres in the cat. *J Physiol* 441:275-84.
- Ekerot CF & Jörntell H (2001) Parallel fibre receptive fields of Purkinje cells and interneurons are climbing fibre-specific. *Eur J Neurosci* 13(7):1303-10.
- Ellis HM & Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44(6):817-29.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662):43-50. Erratum in: *Nature* 393(6683):396.
- Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, Stein-Gerlach M, Klein MA, Schätzl HM (2004) The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *J Biol Chem* 279(40):41918-27.
- Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsässer HP, Schätzl HM (2007) The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* 21(5):936-42.
- Escobar A, Sampedro ED, Dow RS (1968) Quantitative data on the inferior olivary nucleus in man, cat and vampire bat. *J Comp Neurol* 132(3):397-403.
- Fabrizi C, Silei V, Menegazzi M, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F, Suzuki H, Lauro GM (2001) The stimulation of inducible nitric-oxide synthase by the prion protein fragment 106--126 in human microglia is tumor necrosis factor-alpha-dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276(28):25692-6.

- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405(6782):85-90.
- Fairbairn DW, Carnahan KG, Thwaites RN, Grigsby RV, Holyoak GR, O'Neill KL (1994) Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett* 115(2-3):341-6.
- Falsig J, Julius C, Margalith I, Schwarz P, Heppner FL, Aguzzi A (2008) A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nat Neurosci* 11(1):109-17.
- Falsig J, Sonati T, Herrmann US, Saban D, Li B, Arroyo K, Ballmer B, Liberski PP, Aguzzi A (2012) Prion pathogenesis is faithfully reproduced in cerebellar organotypic slice cultures. *PLoS Pathog* 8(11):e1002985.
- Faucheux BA, Privat N, Brandel JP, Sazdovitch V, Laplanche JL, Maurage CA, Hauw JJ, Haik S (2009) Loss of cerebellar granule neurons is associated with punctate but not with large focal deposits of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(8):892-901.
- Faucheux BA, Morain E, Diuron V, Brandel JP, Salomon D, Sazdovitch V, Privat N, Laplanche JL, Hauw JJ, Haik S (2011) Quantification of surviving cerebellar granule neurones and abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease supports a pathogenic role for small PrP<sup>Sc</sup> deposits common to the various molecular subtypes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37(5):500-12.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8204-9.
- Feng W, Huang S, Wu H, Zhang M (2007) Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of Beclin-1. *J Mol Biol* 372(1):223-35.
- Ferin M, Grigorian RA, Strata P (1971) Mossy and climbing fibre activation in the cat cerebellum by stimulation of the labyrinth. *Exp Brain Res* 12(1):1-17.
- Ferrer I (1999) Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol* 97(1):5-12.
- Ferrer I, Puig B, Blanco R, Marti E (2000) Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci* 97:715-26.
- Ferrer I (2002) Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebellum* 1(3):213-22.
- Fioriti L, Angeretti N, Colombo L, De Luigi A, Colombo A, Manzoni C, Morbin M, Tagliavini F, Salmona M, Chiesa R, Forloni G (2007) Neurotoxic and gliotrophic activity of a synthetic peptide homologous to Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease amyloid protein. *J Neurosci* 27(7):1576-83.
- Flechsich 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.
- Flechsich E, Hegyi I, Leimeroth R, Zuniga A, Rossi D, Cozzio A, Schwarz P, Rüllicke T, Götz J, Aguzzi A, Weissmann C (2003) Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *EMBO J* 22:3095-3101.
- Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy Jr JD, Hawkes R, Frankel WN, Copeland NG, Jenkins NA (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 87 :607-17.
- Ford MJ, Burton LJ, Li H, Graham CH, Frobert Y, Grassi J, Hall SM, Morris RJ (2002) A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* 111(3):533-51.
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362(6420):543-6.
- Forloni G, Sclip A, Borsello T, Balducci C (2013) The neurodegeneration in Alzheimer disease and the prion protein. *Prion* 7(1):60-5.
- Foster JD, Wilson M, Hunter N (1996) Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec* 139(21):512-5.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billelte 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* 318:339-344.

- Fraser H & Dickinson AG (1967) Distribution of experimentally induced scrapie lesions in the brain. *Nature* 216(5122):1310-1.
- Fraser H & Dickinson AG (1968) The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 78(3):301-11.
- Fraser H & Dickinson AG (1973) Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* 83:29-40.
- Fraser H (1976) The pathology of natural and experimental scrapie. In *Slow Virus Diseases of Animals and Man*, pp. 267-305. Edited by Kimberlin RH. New York: North-Holland.
- Fraser H (1979) Neuropathology of scrapie : the precision of the lesions and their diversity. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, vol. 1, p. 387-406. Edited by S. B. Prusiner & W. J. Hadlow. New York : Academic Press.
- Fraser H (1982) Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* 295(5845):149-50.
- Fraser JR, Halliday WG, Brown D, Belichenko PV, Jeffrey M (1996) Mechanisms of scrapie-induced neuronal cell death. In: *Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases* (Eds. L. Court & B. Dodet). Elsevier, Paris, p. 107-112.
- Fraser E, McDonagh AM, Head M, Bishop M, Ironside JW, Mann DM (2003) Neuronal and astrocytic responses involving the serotonergic system in human spongiform encephalopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(5):482-95.
- Fuhrmann M, Bittner T, Mitteregger G, Haider N, Moosmang S, Kretzschmar H, Herms J (2006) Loss of the cellular prion protein affects the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem* 98(6):1876-85.
- Fuhrmann M, Bittner T, Mitteregger G, Haider N, Moosmang S, Kretzschmar H, Herms J (2006) Loss of the cellular prion protein affects the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem* 98(6):1876-85.
- Fuhrmann M, Mitteregger G, Kretzschmar H, Herms J (2007) Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci* 27(23):6224-33.
- Fukutani Y, Cairns NJ, Rossor MN, Lantos PL (1996) Purkinje cell loss and astrocytosis in the cerebellum in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 214(1):33-6.
- Fukutani Y, Cairns NJ, Rossor MN, Lantos PL (1997) Cerebellar pathology in sporadic and familial Alzheimer's disease including APP 717 (Val → Ile) mutation cases: a morphometric investigation. *J Neurol Sci* 149(2):177-84.
- Furuta N, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Amano A (2010) Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol Biol Cell* 21(6):1001-10.
- Furutama D, Morita N, Takano R, Sekine Y, Sadakata T, Shinoda Y, Hayashi K, Mishima Y, Mikoshiba K, Hawkes R, Furuichi T (2010) Expression of the IP3R1 promoter-driven nls-lacZ transgene in Purkinje cell parasagittal arrays of developing mouse cerebellum. *J Neurosci Res* 88(13):2810-25.
- Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB (1987) Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(12):4017-21.
- Gähwiler BH, Thompson SM, Muller D (2001) Preparation and maintenance of organotypic slice cultures of CNS tissue. *Curr Protoc Neurosci* chap. 6: unit 6.11.
- 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* 257:974-978.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers MP (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-6.
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M, Kroemer G (2011) Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxid Redox Signal* 15(6):1691-714.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P,

- White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1):107-20.
- Galvan C, Camoletto PG, Dotti CG, Aguzzi A, Ledesma MD (2005) Proper axonal distribution of PrP(C) depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 30(3):304-15.
- Gambetti P, Parchi P, Chen SG (2003) Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clin Lab Med* 23(1):43-64.
- Garthwaite G & Garthwaite J (1991) AMPA Neurotoxicity in Rat Cerebellar and Hippocampal Slices: Histological Evidence for Three Mechanisms. *Eur J Neurosci* 3(8):715-728.
- Garwicz M, Jorntell H, Ekerot CF (1998) Cutaneous receptive fields and topography of mossy fibres and climbing fibres projecting to cat cerebellar C3 zone. *J Physiol* 512 ( Pt 1):277-93.
- Ghetti B, Tagliavini F, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B, Farlow MR, Dlouhy SR (1994) Familial Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Mol Neurobiol* 8(1):41-8.
- Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI (2011) Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?" *Apoptosis* 16:321-33.
- Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Latarjet R (1978) Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:6268-70.
- Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathology* 5(3):213-221.
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8(3):449-57.
- Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC (2013) Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm* 2013:320519.
- Gincel D, Regan MR, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD (2007) Analysis of cerebellar Purkinje cells using EAAT4 glutamate transporter promoter reporter in mice generated via bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. *Exp Neurol* 203(1):205-12.
- Godsave SF, Wille H, Kujala P, Latawiec D, DeArmond SJ, Serban A, Prusiner SB, Peters PJ (2008) Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. *J Neurosci* 28(47):12489-99.
- Goold R, Rabbanian S, Sutton L, Andre R, Arora P, Moonga J, Clarke AR, Schiavo G, Jat P, Collinge J, Tabrizi SJ (2011) Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun* 2(1): 281.
- Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(22):8342-7.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000a) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76(1):85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR (2000b) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 482(3):257-60.
- Grasbon-Frodl E, Lorenz H, Mann U, Nitsch RM, Windl O, Kretzschmar HA (2004) Loss of glycosylation associated with the T183A mutation in human prion disease. *Acta Neuropathol* 108(6):476-484.
- Gravel C, Eisenman LM, Sasseville R, Hawkes R (1987) Parasagittal organization of the rat cerebellar cortex: direct correlation between antigenic Purkinje cell bands revealed by mabQ113 and the organization of the olivocerebellar projection. *J Comp Neurol* 265(2):294-310.
- Gravel C & Hawkes R (1990) Parasagittal organization of the rat cerebellar cortex: direct comparison of Purkinje cell compartments and the organization of the spinocerebellar projection. *J Comp Neurol* 291(1):79-102.
- Gray F, Chrétien F, Adle-Biassette H, Dorandeu A, Ereau T, Delisle MB, Kopp N, Ironside JW, Vital C (1999) Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(4):321-8.

- Gray BC, Siskova Z, Perry VH, O'Connor V (2009) Selective presynaptic degeneration in the synaptopathy associated with ME7-induced hippocampal pathology. *Neurobiol Dis* 35(1):63-74.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Löhdén M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83(5):793-802.
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9(5):544-53.
- Griffith JS (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* 215:1043-4.
- Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139-43.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68(2):138-49.
- Grodd W, Hülsmann E, Lotze M, Wildgruber D, Erb M (2001) Sensorimotor mapping of the human cerebellum: fMRI evidence of somatotopic organization. *Hum Brain Mapp* 13(2):55-73.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17(14):3878-85.
- Guentchev M, Hainfellner JA, Trabattoni GR, Budka H (1997) Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(10):1119-24.
- Guentchev M, Groschup MH, Kordek R, Liberski PP, Budka H (1998) Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathol* 8(4):615-23.
- Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Druon C, Scarzello S, Checler F (2009) The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 284:35973-86.
- Hadlow WJ (1959) Scrapie and kuru. *Lancet* 2:289-90.
- Hadlow WJ, Eklund CM, Kennedy RC, Jackson TA, Whitford HW, Boyle CC (1974) Course of experimental scrapie virus infection in the goat. *J Infect Dis* 129(5):559-67.
- Haeberlé AM, Ribaut-Barassin C, Bombarde G, Mariani J, Hunsmann G, Grassi J, Bailly Y (2000) Synaptic prion protein immuno-reactivity in the rodent cerebellum. *Microsc Res Tech* 50:66-75.
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141(4):656-67.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hannaoui S, Maatouk L, Privat N, Levavasseur E, Faucheux BA, Haïk S (2013) Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type. *J Virol* 87(5):2535-48.
- Hansel C, Linden DJ, D'Angelo E (2001) Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 4(5):467-75.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006 441(7095):885-9.
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 181(3):497-510.
- Hardingham GE & Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11(10):682-96.
- Harry GJ, Lefebvre d'Hellencourt C, McPherson CA, Funk JA, Aoyama M, Wine RN (2008) Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons. *J Neurochem* 106(1):281-98.
- Harvey RJ & Napper RM (1991) Quantitative studies on the mammalian cerebellum. *Prog Neurobiol* 36(6):437-63.

- Hawkes R & Leclerc N (1987) Antigenic map of the rat cerebellar cortex: the distribution of parasagittal bands as revealed by monoclonal anti-Purkinje cell antibody mabQ113. *J Comp Neurol* 256(1):29-41.
- Hawkes R & Turner RW (1994) Compartmentation of NADPH-diaphorase activity in the mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 346(4):499-516.
- Hawkes R, Gallagher E, Ozol K (1998) Blebs in the mouse cerebellar granular layer as a sign of structural inhomogeneity. 2. Posterior lobe vermis. *Acta Anat (Basel)* 163(1):47-55.
- Hawkes R (2014) Purkinje cell stripes and long-term depression at the parallel fiber-Purkinje cell synapse. *Frontiers in Systems Neuroscience* 8:41.
- He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, Pei Y, Chen Y, Ling W, Wu C, Zhao S, Liu JO, Yu L (2003) Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* 278(31):29278-87.
- He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, Staufenbiel M, Li R, Shen Y (2007) Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid  $\beta$  generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J. Cell Biol* 178:829-41.
- He C & Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43:67-93.
- 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):827-34.
- Heikenwalder M, Julius C, Aguzzi A (2007) Prions and peripheral nerves: a deadly rendezvous. *J Neurosci Res* 85:2714-25.
- 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):976-7.
- Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schätzl HM (2009) Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem* 109 (1): 25-34.
- Heitz S, Lutz Y, Rodeau J-L, Zanjani H, Gautheron V, Bombarde G, Richard F, Fuchs JP, Vogel MW, Mariani J, Bailly Y (2006) BAX contributes to Doppel-induced apoptosis of prion protein-deficient Purkinje cells. *Dev Neurobiol* 67(5):670-86.
- Heitz S, Gautheron V, Lutz Y, Rodeau JL, Zanjani HS, Sugihara I, Bombarde G, Richard F, Fuchs JP, Vogel MW, Marani J, Bailly Y (2007) Bcl-2 counteracts Doppel-induced apoptosis of prion protein-deficient Purkinje cells in the *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* mouse. *Dev Neurobiol* 68(3):332-48.
- Heitz S, Grant NJ, Leschiera R, Haeberlé AM, Demais V, Bombarde G, Bailly Y (2010) Autophagy and cell death of Purkinje cells overexpressing Doppel in *Ngsk Prnp*-deficient mice. *Brain Pathol* 20(1):119-32.
- Heitz S, Grant NJ, Bailly Y (2009) Doppel induces autophagic stress in prion protein-deficient Purkinje cells. *Autophagy* 5(3):422-4.
- Heitz S, Grant NJ, Leschiera R, Haeberlé AM, Demais V, Bombarde G, Bailly Y (2010) Autophagy and cell death of Purkinje cells overexpressing Doppel in *Ngsk Prnp*-deficient mice. *Brain Pathol* 20(1):119-32.
- Henderson EE, Tudor G, Yang JY (1992) Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by ultraviolet and X irradiation. *Radiat Res* 131(2):169-76.
- Henry C, Lowman A, Will RG (2002) Creutzfeldt-Jakob disease in elderly people. *Age Ageing* 31:7-10.
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schürmann P, Windl O, Brose N, Kretschmar H (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 19(20):8866-75.
- Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretschmar HA (2000) Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* 75(4):1487-92.
- Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretschmar HA (2001) Prion protein affects  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis* 8(2):324-30.
- Hernandez D, Torres CA, Setlik W, Cebrián C, Mosharov EV, Tang G, Cheng HC, Kholodilov N, Yarygina O, Burke RE, Gershon M, Sulzer D (2012) Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron* 74(2):277-84.



- Hernandez-Rapp J, Martin-Lannerée S, Hirsch TZ, Pradines E, Alleaume-Butaux A, Schneider B, Baudry A, Launay JM, Mouillet-Richard S (2014) A PrP(C)-caveolin-Lyn complex negatively controls neuronal GSK3 $\beta$  and serotonin 1B receptor. *Sci Rep* 4:4881.
- Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C (2003) Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 22(20):5435-45.
- 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 USA* 97(18):10248-53.
- Hill AF & Collinge J (2003) Subclinical prion infection in humans and animals. *Br Med Bull* 66:161-70.
- Hilton KJ, Cunningham C, Reynolds RA, Perry VH (2013) Early Hippocampal Synaptic Loss Precedes Neuronal Loss and Associates with Early Behavioural Deficits in Three Distinct Strains of Prion Disease. *PLoS One* 8(6):e68062.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165:347-356.
- Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348(6299):334-6.
- Hoddevik GH & Walberg F (1979) The pontine projection onto longitudinal zones of the paramedian lobule in the cat. *Exp Brain Res* 34(2):233-40.
- Hogan RN, Baringer JR, Prusiner SB (1987) Scrapie infection diminishes spines and increases varicosities of dendrites in hamsters: a quantitative Golgi analysis. *J Neuropathol Exp Neurol* 46(4):461-73.
- Hökfelt T & Fuxe K (1969) Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli. *Exp Brain Res* 9(1):63-72.
- Hollenbeck PJ (1993) Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol* 121(2):305-15.
- Holmes G & Stewart TG (1908) On the Connection of the Inferior Olives with the Cerebellum in Man. *Brain* 31:125.
- Holmes C, El-Okli M, Williams AL, Cunningham C, Wilcockson D, Perry VH (2003) Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(6):788-9.
- Horiuchi M, Ishiguro N, Nagasawa H, Toyoda Y, Shinagawa M (1998) Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Anim Genet* 29(1):37-40.
- Horn KM, Pong M, Gibson AR (2010) Functional relations of cerebellar modules of the cat. *J Neurosci* 30(28):9411-23.
- Horvitz HR (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59(7 Suppl):1701s-1706s.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20(7):1981-91.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF Receptor I-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91:495-504.
- Hsu H, Huang J, Shu H-B, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-Dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex. *Immunity* 4(4):387-96.
- Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM (1998) Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273(45):29648-53.
- Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *EMBO J* 20:5876-86.
- Hung SY, Huang WP, Liou HC, Fu WM (2009) Autophagy protects neurons from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy* 5:502-510.

- Iqbal K, Somerville RA, Thompson CH, Wisniewski HM (1985) Brain glutamate decarboxylase and cholinergic enzyme activities in scrapie. *J Neurol Sci* 67(3):345-50.
- Ironside JW, McCardle L, Hayward PA, Bell JE (1993) Ubiquitin immunocytochemistry in human spongiform encephalopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19(2):134-40.
- Ishikura N, Clever JL, Bouzamondo-Bernstein E, Samayoa E, Prusiner SB, Huang EJ, DeArmond SJ (2005) Notch-1 activation and dendritic atrophy in prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(3):886-91.
- Ito M (1984) The modifiable neuronal network of the cerebellum. *The Jap J Physiol* 34(5):781-92.
- Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81(3):1143-95.
- Jackson WS, Borkowski AW, Faas H, Steele AD, King OD, Watson N, Jasanoff A, Lindquist S (2009) Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron* 63:438-50.
- Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 117(Pt 20):4837-48.
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 9(4):574-87.
- Jakob A (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosclerose-Encephalopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsch Z Nervenheilk* 70:132-46.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268(3):1517-20.
- James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB, Cohen FE (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(19):10086-91.
- Jamieson E, Jeffrey M, Ironside JW, Fraser JR (2001) Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie. *Neuroreport* 12(10):2147-53.
- Jarius C, Kovacs GG, Belay G, Hainfellner JA, Mitrova E, Budka H (2003) Distinctive cerebellar immunoreactivity for the prion protein in familial (E200K) Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 105(5):449-54.
- Jeffrey M, Scott JR, Williams A, Fraser H (1992) Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol* 84:559-69.
- Jeffrey M, Fraser JR, Halliday WG, Fowler N, Goodsir CM, Brown DA (1995) Early unsuspected neuron and axon terminal loss in scrapie-infected mice revealed by morphometry and immunocytochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21(1):41-9.
- Jeffrey M, Goodsir CM, Holliman A, Higgins RJ, Bruce ME, McBride PA, Fraser JR (1998) Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec* 142(20):534-7.
- Jeffrey M, Halliday W G, Bell J, Johnston A R, MacLeod N K, Ingham C, Sayers A R, Brown D A, Fraser J R (2000) Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26(1): 41-54.
- Jeffrey M, Goodsir CM, Race RE, Chesebro B (2004) Scrapie-specific neuronal lesions are independent of neuronal PrP expression. *Ann Neurol* 55:781-92.
- Jeffrey M, McGovern G, Sisó S, González L (2011) Cellular and sub-cellular pathology of animal prion diseases: relationship between morphological changes, accumulation of abnormal prion protein and clinical disease. *Acta Neuropathol* 121(1):113-34.
- Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY (2013) Autophagy induced by the class III histone deacetylase Sirt1 prevents prion peptide neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 34:146-156.
- Jesionek-Kupnicka D, Kordek R, Buczyński J, Liberski PP (2001) Apoptosis in relation to neuronal loss in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 61(1):13-9.

- Ji Z & Hawkes R (1994) Topography of Purkinje cell compartments and mossy fiber terminal fields in lobules II and III of the rat cerebellar cortex: spinocerebellar and cuneocerebellar projections. *Neuroscience* 61(4):935-54.
- Jiang J, Parameshwaran K, Seibenhener ML, Kang MG, Suppiramaniam V, Huganir RL, Diaz-Meco MT, Wooten MW (2009) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity require SQSTM1/p62. *Hippocampus* 19(4):392-406.
- Jones S, Batchelor M, Bhelt D, Clarke AR, Collinge J, Jackson GS (2005) Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem J* 392(Pt 2):309-12.
- Jörntell H, Garwicz M, Ekerot CF (1996) Relation between cutaneous receptive fields and muscle afferent input to climbing fibres projecting to the cerebellar C3 zone in the cat. *Eur J Neurosci* 8(8):1769-79.
- Joseph JW, Shambes GM, Gibson JM, Welker W (1978) Tactile projections to granule cells in caudal vermis of the rat's cerebellum. *Brain Behav Evol* 15(2):141-9.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20(7):1992-2003.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19:5720-8.
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell* 16:2544-53.
- Kabuta T, Suzuki Y, Wada K (2006) Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem*. 281(41):30524-33.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150:1507-13.
- Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, Ohsumi Y (2010) Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* 30(4):1049-58.
- Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J (2002) Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 9(10):1115-25.
- Kaushik S & Cuervo AM (2012) Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* 22(8):407-17.
- Kawamura K & Hashikawa T (1981) Projections from the pontine nuclei proper and reticular tegmental nucleus onto the cerebellar cortex in the cat. An autoradiographic study. *J Comp Neurol* 201(3):395-413.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57.
- Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemaire M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Gen Physiol* 131(6):i5.
- Kim YS, Carp RI, Callahan SM, Natelli M, Wisniewski HM (1990) Vacuolization, incubation period and survival time analyses in three mouse genotypes injected stereotactically in three brain regions with the 22L scrapie strain. *J Neuropathol Exp Neurol* 49(2):106-13.
- Kim JI, Ju WK, Choi JH, Choi E, Carp RI, Wisniewski HM, Kim YS (1999) Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res Mol Brain Res* 73(1-2):17-27.
- Kim BH, Lee HG, Choi JK, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2004) The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res* 124(1):40-50.
- Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J (2008) Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20567-74.
- Kim MO, Cali I, Oehler A, Fong JC, Wong K, See T, Katz JS, Gambetti P, Bettcher BM, Dearmond SJ, Geschwind MD (2013) Genetic CJD with a novel E200G mutation in the prion protein gene and comparison with E200K mutation cases. *Acta Neuropathol Commun* 1(1):80.

- Kimberlin RH, Cole S, Walker CA (1987) Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* 68(7):1875-81.
- Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H (1989) The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol* 70 ( Pt 8):2017-25.
- Kimberlin RH & Wilesmith JW (1994) Bovine spongiform encephalopathy (BSE): epidemiology, low dose exposure and risks. In: *Slow Infections of the Central Nervous System: the Legacy of Dr. Bjorn Sigurdsson*. Edited by Bjornsson J, Carp RI, Love A & Wisniewski HM. *Ann N Y Acad Sci* 724:210–20.
- King A, Doey L, Rossor M, Mead S, Collinge J, Lantos P (2003) Phenotypic variability in the brains of a family with a prion disease characterized by a 144-base pair insertion in the prion protein gene. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(2):98-105.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151(2):263–76.
- Kitamoto T, Doh-ura K, Muramoto T, Miyazono M, Tateishi J (1992) The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system. *Am J Pathol* 141(2):271-7.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25(39):8843-53.
- Kleene R, Loers G, Langer J, Frobert Y, Buck F, Schachner M (2007) Prion protein regulates glutamate-dependent lactate transport of astrocytes. *J Neurosci* 45:12331–40.
- Klionsky DJ, Abdalla FC et al (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8(4):445-544.
- Klöppel S, Pirker W, Brücke T, Kovács GG, Almer G (2002)  $\beta$ -CIT SPECT demonstrates reduced availability of serotonin transporters in patients with fatal familial insomnia. *J Neural Transm* 109:1105-10.
- Knaevelsrud H & Simonsen A (2010) Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. *FEBS Lett* 584(12):2635-45. Review.
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270(5233):96-9.
- 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):471-4.
- Koenig U, Eckhart L, Tschachler E (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285(5):1150-4.
- Kofuji P & Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045-56.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095):880-4.
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL Jr, Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(36):14489-94.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278(5336):294-8.
- Kourie JI (2002) Prion channel proteins and their role in vacuolation and neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J* 31(5):409-16.
- Kovacs G, Voigtlander T, Hainfellner A, Budka H (2002) Distribution of intra-neuronal immunoreactivity for the prion protein in human prion disease. *Acta Neuropathol* 104:320-6.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-8.

- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1):3–11.
- Kudo W, Petersen RB, Lee HG (2013) Cellular prion protein and Alzheimer disease: link to oligomeric amyloid- $\beta$  and neuronal cell death. *Prion* 7(2):114-6.
- Künzle H (1975) Autoradiographic tracing of the cerebellar projections from the lateral reticular nucleus in the cat. *Exp Brain Res* 22(3):255-66.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400(6741):225-6.
- Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, Klug GM, Sutcliffe T, Giulivi A, Alperovitch A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Poser S, Kretzschmar H, Rietveld I, Mitrova E, Cuesta Jde P, Martinez-Martin P, Glatzel M, Aguzzi A, Knight R, Ward H, Pocchiari M, van Duijn CM, Will RG, Zerr I (2005) Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 64(9):1586-91.
- Laffont-Proust I, Faucheux BA, Hassig R, Sazdovitch V, Simon S, Grassi J, Hauw JJ, Moya KL, Haik S (2005) The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. *FEBS Lett* 579:6333–7.
- Lainé J & Axelrad H (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339(2):159-73.
- Lainé J & Axelrad H (1998) Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 9(10):2399-403.
- Lainé J, Marc ME, Sy MS, Axelrad H (2001) Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *Eur J Neurosci* 14(1):47-56.
- Landis DM, Williams RS, Masters CL (1981) Golgi and electronmicroscopic studies of spongiform encephalopathy. *Neurology* 31(5):538-49.
- Lang EJ, Sugihara I, Welsh JP, Llinás R (1999) Patterns of spontaneous purkinje cell complex spike activity in the awake rat. *J Neurosci* 19(7):2728-39.
- Lange W (1975) Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res* 157(1):115-24.
- Laroche-Pierre S, Jodoin J, LeBlanc AC (2009) Helix 3 is necessary and sufficient for prion protein's anti-Bax function. *J Neurochem* 108(4):1019-31.
- Larsell O (1934) Morphogenesis and evolution of the cerebellum. *Archives of Neurology and Psychiatry* 31(2): 373-95.
- Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Hauw JJ, Dormont D (1996) Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 77 ( Pt 7):1601-9.
- Lasmézas 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):402-5.
- Lässle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR (1997) Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272(3):1876-84.
- Latarjet R (1979) Inactivation of the agents of scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, and kuru by radiations. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System* vol 2:387–407. Edited by Prusiner SB & Hadlow WJ. New York: Academic Press.
- Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457(7233):1128-32.
- Laurén J (2014) Cellular prion protein as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 38(2):227-44.

- Lazzari C, Peggion C, Stella R, Massimino ML, Lim D, Bertoli A, Sorgato MC (2011) Cellular prion protein is implicated in the regulation of local Ca<sup>2+</sup> movements in cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 116(5):881-90.
- Lee SB, Kim S, Lee J, Park J, Lee G, Kim Y, Kim JM, Chung J (2007) ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO Rep* 8(4):360–65.
- Lee JS, Li Q, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, Lee HR, Chang H, Zhou FC, Gao SJ, Liang C, Jung JU (2009) FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 11(11):1355-62.
- Lee HP, Choi JK, Shin HY, Jeon YC, Jeong BH, Lee HG, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2010) Altered expression of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the Nsg1 Prnp deficient mice. *Neuroscience* 167(3):799-808.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen H-O B, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305:673-6.
- Lemaire-Vieille C, Bailly Y, Erlich P, Loeuillet C, Brocard J, Haeblerlé AM, Bombarde G, Rak C, Demais V, Dumestre-Pérard C, Gagnon J, Cesbron JY (2013) Ataxia with cerebellar lesions in mice expressing chimeric PrP-Dpl protein. *J Neurosci* 33(4):1391-9.
- Levine B, Huang Q, Isaacs JT, Reed JC, Griffin DE, Hardwick JM (1993) Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 361(6414):739-42.
- Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):463-77. Review.
- Levine B & Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1):27-42.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–489.
- Li A, Sakaguchi S, Atarashi R, Roy BC, Nakaoko R, Arima K, Okimura N, Kopacek J, Shigematsu K (2000) Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol* 20(5):553-67.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842):95-9.
- Li R, Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Yue X, Hampel H, Zhang D, Shen Y (2004) Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid- $\beta$  protein-induced neuron death. *J Neurosci* 24(7):1760–71.
- Li A, Barmada S, Roth K, Harris D (2007) N-terminally deleted forms of the prion protein activate both Bax-dependent and Bax-independent neurotoxic pathways. *J Neurosci* 27:852-859.
- Li YR, Li Q, Yang JM, Zhou XM, Yin XM, Zhao DM (2008) Expression patterns of Doppel gene in golden hamster: quantification using real-time RT-PCR. *Mol Cell Probes* 22(4):255-8.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402(6762):672-6.
- Liberski PP, Yanagihara R, Gibbs CJ, Gadjusek DC (1989) White matter ultrastructural pathology of experimental Creutzfeld-Jakob disease in mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 79:1-9.
- Liberski PP, Kordek R, Brown P, Gadjusek DC (1998) Astrocytes in transmission spongiform encephalopathies (prion diseases). In: *Astrocytes in Brain Aging and Neurodegeneration*, edited par Schipper HM (R. G. Landes Company, Austin, Texas, USA, 1998): 127-164.
- Liberski PP & Ironside JW (2005) Neuropathology of transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). In: *Neurodegeneration and Prion Disease*, edited par Brown DR (Springer Science & Business Media, New York, USA):13-48.
- Liberski PP, Brown DR, Sikorska B, Caughey B, Brown P (2008) Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol* 46(1):1-25.
- Lin M-C, Mirzabekov T, Kagan BL (1997) Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment. *J Biol Chem* 272:44-7.

- Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P (2009) Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS ONE* 4:e4170.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88(2):673-728.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6(6):1389-99.
- Lipp HP, Stagliar-Bozicevic M, Fischer M, Wolfer DP (1998) A 2-year longitudinal study of swimming navigation in mice devoid of the prion protein: no evidence for neurological anomalies or spatial learning impairments. *Behav Brain Res* 95(1):47-54.
- Llinás R & Sugimori M (1980) Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 305:197-213.
- Logan K & Robertson LT (1986) Somatosensory representation of the cerebellar climbing fiber system in the rat. *Brain Res* 372(2):290-300.
- Long X, Müller F, Avruch J (2004) TOR action in mammalian cells and in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Top Microbiol Immunol* 279:115-38.
- Lonchamp E, Dupont JL, Beekenkamp H, Poulain B, Bossu JL (2006) The mouse cerebellar cortex in organotypic slice cultures: an in vitro model to analyze the consequences of mutations and pathologies on neuronal survival, development, and function. *Crit Rev Neurobiol* 18(1-2):179-86.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whitemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17):7951-5.
- López Garcia F, Zahn R, Riek R, Wüthrich K (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15):8334-9.
- Loubet D, Dakowski C, Pietri M, Pradines E, Bernard S, Callebert J, Ardila-Osorio H, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2012). Neuritogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity. *FASEB J* 26(2):678-90.
- Lowe J, McDermott H, Kenward N, Landon M, Mayer RJ, Bruce M, McBride P, Somerville RA, Hope J (1990) Ubiquitin conjugate immunoreactivity in the brains of scrapie infected mice. *J Pathol* 162(1):61-6.
- 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):13575-83.
- Lucas M, Izquierdo G, Muñoz C, Solano F (1997) Internucleosomal breakdown of the DNA of brain cortex in human spongiform encephalopathy. *Neurochem Int* 31(2):241-4.
- Lucassen PJ, Williams A, Chung WCJ, Fraser H (1995) Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett* 198(3):185-8.
- Luiken JJ, Blommaert EF, Boon L, van Woerkom GM, Meijer AJ (1994) Cell swelling and the control of autophagic proteolysis in hepatocytes: involvement of phosphorylation of ribosomal protein S6? *Biochem Soc Trans* 22(2):508-11.
- Luo S & Rubinsztein DC (2010) Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ* 17(2):268-77.
- Mabbott NA & MacPherson GG (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* 4(3):201-11.
- Mackenzie A & Wilson AM (1966) Accumulation of fat in the brains of mice affected with scrapie. *Vet Sci* 7: 45-54.
- Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL (2012) Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* 196(4):407-17.
- Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J (2001) Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 268(1-2):105-14.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007c) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9):741-52.

- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007a) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26(10):2527-39.
- Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007b) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3(4):374-6.
- Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, Baskakov IV (2010) Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol* 119(2):177-87.
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG and Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* 21:202-10.
- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klöhn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302(5646):871-4.
- Mallucci GR, White MD, Farmer M, Dickinson A, Khatun H, Powell AD, Brandner S, Jefferys JG, Collinge J (2007) Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron* 53:325-35.
- 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):121-7.
- Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C (2009) Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog* 5(5):e1000426.
- Marella M & Chabry J (2004) Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24:620-7.
- Marella M, Gaggioli C, Batoz M, Deckert M, Tartare-Deckert S, Chabry J (2005) Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem* 280:1529-34.
- Mariño G, Madeo F, Kroemer G (2011) Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol* 23:198-206.
- Martin PT (2002) Glycobiology of the synapse. *Glycobiology* 12(1):1R-7R.
- Martin DN & Baehrecke EH (2004) Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 131(2):275-84.
- Martinez-Vicente M & Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6(4):352-61.
- Marzban H, Sillitoe RV, Hoy M, Chung SH, Rafuse VF, Hawkes R (2004) Abnormal HNK-1 expression in the cerebellum of an N-CAM null mouse. *J Neurocytol* 33(1):117-30.
- Marzban H & Hawkes R (2011) On the architecture of the posterior zone of the cerebellum. *Cerebellum* 10(3):422-34.
- Massey AC, Kaushik S, Cuervo AM (2006) Lysosomal chat maintains the balance. *Autophagy* 2(4):325-7.
- Mastrangelo P & Westaway D (2001) The prion gene complex encoding PrP(C) and Doppel: insights from mutational analysis. *Gene* 275(1):1-18.
- Mateos JM, Osorio A, Azkue JJ, Benitez R, Elezgarai I, Bilbao A, Diez J, Nagore P, Kuhn R, Knöpfel T, Hawkes R, Donate-Oliver F, Grandes P (2001) Parasagittal compartmentalization of the metabotropic glutamate receptor mGluR1b in the cerebellar cortex. *Eur J Anat* 5:15-21.
- Mathy A, Ho SS, Davie JT, Duguid IC, Clark BA, Häusser M (2009) Encoding of oscillations by axonal bursts in inferior olive neurons. *Neuron* 62(3):388-99.
- McBride PA, Schultz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretschmar HA, Breekes M (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75:9320-7.



- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249–59.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35(1):57-62.
- McMahon HE, Mange A, Nishida N, Creminon C, Casanova D, Lehmann S (2001) Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 276: 2286-91.
- Medori R, Montagna P, Tritschler H-J, LeBlanc A, Cordelli P, Tinupe P, Lugaresi E, Gambetti P (1992) Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* 42(3 Pt 1):669-71.
- Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638):1387-91.
- Meijer AJ & Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12):2445-62.
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K (1981) Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* 54(1):63-74.
- Merz PA, Wisniewski HM, Somerville RA, Bobin SA, Masters CL, Iqbal K (1983) Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol* 60(1-2):113-24.
- Micheau O & Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114(2):181-90.
- Micheau O (2004) To die or not to die ? un modèle de la signalisation dichotomique de TNF-R1. *Med Sci (Paris)* 20:153-5.
- Mihailoff GA, Burne RA, Azizi SA, Norell G, Woodward DJ (1981) The pontocerebellar system in the rat: an HRP study. II. Hemispherical components. *J Comp Neurol* 197(4):559-77.
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7(7):673-82.
- Miller JM, Jenny AL, Taylor WD, Marsh RF, Rubenstein R, Race RE (1993) Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* 5(3):309-16.
- Miller MW & Williams ES (2004) Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol* 284:193-214.
- Mironov A Jr, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ (2003) Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* 23(18):7183-93.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116:1679–88.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15(3):1101-11.
- Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1535-41.
- Moda F, Suardi S, Di Fede G, Indaco A, Limido L, Vimercati C, Ruggerone M, Campagnani I, Langeveld J, Terruzzi A, Brambilla A, Zerbi P, Fociani P, Bishop MT, Will RG, Manson JC, Giaccone G, Tagliavini F (2012) MM2-thalamic Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological, biochemical and transmission studies identify a distinctive prion strain. *Brain Pathol* 22(5):662-9.
- Moore RC, Redhead NJ, Selfridge J, Hope J, Manson JC, Melton DW (1995) Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations. *Biotechnology (N Y)* 13(9):999-1004.
- 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.

- Moore RC, Mastrangelo P, Bouzamondo E, Heinrich C, Legname G, Prusiner SB, Hood L, Westaway D, DeArmond SJ, Tremblay P (2001) Doppel-induced cerebellar degeneration in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(26):15288-93.
- Moore SJ, Simmons M, Chaplin M, Spiropoulos J (2008) Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathol* 116(5):547-59
- Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortori CA, Barrett DA, Tsaytler P, Bertolotti A, Willis AE, Bushell M, Mallucci GR (2012) Sustained translational repression by eIF2 $\alpha$ -P mediates prion neurodegeneration. *Nature* 485(7399):507-11.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-94.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289(5486):1925-8.
- Mugnaini E, Sekerková G, Martina M (2011) The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Res Rev* 66(1-2):220-45.
- Mukherjee A, Morales-Scheihing D, Gonzalez-Romero D, Green K, Tagliatalata G, Soto C (2010) Calcineurin inhibition at the clinical phase of prion disease reduces neurodegeneration, improves behavioral alterations and increases animal survival. *PLoS Pathog* 6(10):e1001138.
- Müller WE, Ushijima H, Schröder HC, Forrest JM, Schatton WF, Rytik PG, Heffner-Laue M (1993) Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 246(3):261-7.
- Münch C & Bertolotti A (2012) Propagation of the prion phenomenon: beyond the seeding principle. *J Mol Biol* 421(4-5):491-8.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Bruce A, Yankner BA, Junying Yuan J (2000a) Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 403:98-103.
- Nakagawa T & Yuan J (2000b) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887-894.
- Napper RM & Harvey RJ (1988a) Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. *J Comp Neurol* 274(2):168-77.
- Napper RM & Harvey RJ (1988b) Quantitative study of the Purkinje cell dendritic spines in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 274(2):158-67.
- Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Pürro M, Schmid J, Biffiger K, Power AM, Oesch B, Raeber AJ, Telling GC (2005) Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* 24(13):2472-80.
- Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19(7):267-71.
- Nieznanski K, Choi JK, Chen S, Surewicz K, Surewicz WK (2012) Soluble prion protein inhibits amyloid-beta (A $\beta$ ) fibrillization and toxicity. *J Biol Chem* 287:33104-8.
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833(12):3448-59.
- Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, Erpel SP, Nakaoke 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):689-97.
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K (2002) Takeda. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16:1345-1355.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:113-22.
- Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120(Pt 23):4081-91.

- Nixon RA, Yang DS, Lee JH (2008) Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* 4(5):590-9.
- Norbury CJ & Hickson ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-401.
- Novitskaya V, Bocharova OV, Bronstein I, Baskakov IV (2006) Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J Biol Chem* 281(19):13828-36.
- Oh JM, Shin HY, Park SJ, Kim BH, Choi JK, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2008) The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 39(2):238-47.
- Oh JM, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2012) Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy* 8(10):1448-61.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-19.
- Oscarsson O (1968) Termination and functional organization of the ventral spino-olivocerebellar path. *J Physiol* 196(2):453-78.
- Oscarsson O (1969) Termination and functional organization of the dorsal spino-olivocerebellar path. *J Physiol* 200(1):129-49.
- Otis TS, Kavanaugh MP, Jahr CE (1997) Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science* 277(5331):1515-8.
- Ozol KO & Hawkes R (1997) Compartmentation of the granular layer of the cerebellum. *Histol Histopathol* 12(1):171-84.
- Ozol K, Hayden JM, Oberdick J, Hawkes R (1999) Transverse zones in the vermis of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 412(1):95-111.
- Paisley D, Banks S, Selfridge J, McLennan NF, Ritchie AM, McEwan C, Irvine DS, Saunders PT, Manson JC, Melton DW (2004) Male infertility and DNA damage in Doppel knockout and prion protein/Doppel double-knockout mice. *Am J Pathol* 164(6):2279-88.
- Paitel E, Sunyach C, Alves da Costa C, Bourdon JC, Vincent B, Checler F (2004) Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 279:612-618.
- Palay S & Chan-Palay V (1974) *Cerebellar Cortex : Cytology and Organisation* (Springer Verlag).
- Palmer AG & Patel DJ (2002) Kurt Wüthrich and NMR of biological macromolecules. *Structure* 10(12):1603-4.
- Pammer J, Weninger W, Tschachler E (1998) Human keratinocytes express cellular prion-related protein in vitro and during inflammatory skin diseases. *Am J Pathol* 153(5):1353-8.
- Pammer J, Cross HS, Frobert Y, Tschachler E, Oberhuber G (2000) The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. *Virchows Arch* 436(5):466-72.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282(33):24131-45.
- Parchi P, Castellani R, Cortelli P, Montagna P, Chen SG, Petersen RB, Manetto V, Vnencak-Jones CL, McLean MJ, Sheller JR, et al. (1995) Regional distribution of protease-resistant prion protein in fatal familial insomnia. *Ann Neurol* 38(1):21-9.
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46(2):224-33.
- Parchi P, Capellari S, Gambetti P (2011) Fatal familial and sporadic insomnia. In: *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movements Disorders*, édité par Dickson DW & Weller RO:346-9.

- Paschen W, Mengesdorf T (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38(3-4):409-15.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6):927-39.
- Pattison IH & Millson GC (1961) Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol* 71: 101-9.
- Pattison IH (1965) Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec* 77(47):1388-90.
- Pattison IH & Jones KM (1967) The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec* 80:2-9.
- Paukert M, Huang YH, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2010) Zones of enhanced glutamate release from climbing fibers in the mammalian cerebellum. *J Neurosci* 30(21):7290-9.
- Peeters RR, Verhoye M, Vos BP, Van Dyck D, Van Der Linden A, De Schutter E (1999) A patchy horizontal organization of the somatosensory activation of the rat cerebellum demonstrated by functional MRI. *Eur J Neurosci* 11(8):2720-30.
- 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):43071-8.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-31.
- Peters PJ, Mironov A, Peretz Jr 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* 162:703-17.
- Petersén A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* 10(12):1243-54.
- Petit-Paitel A, Ménard B, Guyon A, Béringue V, Nahon JL, Zsürger N, Chabry J (2012) Prion protein is a key determinant of alcohol sensitivity through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) activity. *PLoS One* 7(4):e34691.
- Peyrin JM, Lasmézas CI, Haïk S, Tagliavini F, Salmona M, Williams A, Richie D, Deslys JP, Dormont D (1999) Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* 10(4):723-9.
- Piao YS, Kakita A, Watanabe H, Kitamoto T, Takahashi H (2005) Sporadic fatal insomnia with spongiform degeneration in the thalamus and widespread PrPSc deposits in the brain. *Neuropathology* 25(2):144-9.
- Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, Young K, Bird TD, Nochlin D, Dickson DW, Vinters HV, Zimmerman TR, Mackenzie IR, Kish SJ, Ang LC, De Carli C, Pocchiari M, Brown P, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Bugiani O, Ironside J, Tagliavini F, Ghetti B (1998) Phenotypic variability of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(10):979-88.
- Piccardo P, Liepnieks JJ, William A, Dlouhy SR, Farlow MR, Young K, Nochlin D, Bird TD, Nixon RR, Ball MJ, DeCarli C, Bugiani O, Tagliavini F, Benson MD, Ghetti B (2001) Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations. *Am J Pathol* 158(6):2201-7.
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118:2190-2199.
- Pietri M, Dakowski C, Hannaoui S, Alleaume-Butaux A, Hernandez-Rapp J, Ragagnin A, Mouillet-Richard S, Haik S, Bailly Y, Peyrin JM, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2013) PDK1 decreases TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. *Nat Med* 19(9):1124-31.

- Pijpers A, Winkelman BH, Bronsing R, Ruigrok TJ (2008) Selective impairment of the cerebellar C1 module involved in rat hind limb control reduces step-dependent modulation of cutaneous reflexes. *J Neurosci* 28(9):2179-89.
- Piro JR, Wang F, Walsh DJ, Rees JR, Ma J, Supattapone S (2011) Seeding specificity and ultrastructural characteristics of infectious recombinant prions. *Biochemistry* 50(33):7111-6.
- Pobezinskaya YL, Kim YS, Choksi S, Morgan MJ, Li T, Liu C, Liu Z (2008) The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat Immunol* 9(9):1047-54.
- Pott Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ (2008) Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain* 131(Pt 7):1880-94.
- Pradines E, Loubet D, Mouillet-Richard S, Manivet P, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2009) Cellular prion protein coupling to TACE-dependent TNF-alpha shedding controls neurotransmitter catabolism in neuronal cells. *J Neurochem* 110(3):912-23.
- 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.
- Provini L, Redman S, Strata P (1968) Mossy and climbing fibre organization on the anterior lobe of the cerebellum activated by forelimb and hindlimb areas of the sensorimotor cortex. *Exp Brain Res* 6(3):216-33.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-44.
- Prusiner SB (1994) Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol* 48:655-86.
- Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L (1991) Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49(2):320-9.
- Puoti G, Giaccone G, Mangieri M, Limido L, Fociani P, Zerbi P, Suardi S, Rossi G, Iussich S, Capobianco R, Di Fede G, Marcon G, Cotrufo R, Filippini G, Bugiani O, Tagliavini F (2005) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: the extent of microglia activation is dependent on the biochemical type of PrPSc. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(10):902-9.
- Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P (2011) The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71:406-24.
- Quinn MR, Kim YS, Lossinsky AS, Carp RI (1988) Influence of stereotaxically injected scrapie on neurotransmitter systems of mouse cerebellum. *Brain Res* 445(2):297-302.
- Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R (2005) Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10427-32.
- Quy PN, Fujita H, Sakamoto Y, Na J, Sugihara I (2011) Projection patterns of single mossy fiber axons originating from the dorsal column nuclei mapped on the aldolase C compartments in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 519(5):874-99.
- Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B (2001) Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 75(21):10106-12.
- Ragagnin A, Guillemain A, Grant NJ, Bailly Y (2013) Neuronal autophagy and prion proteins. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* YJR Bailly (Ed.), pp. 377-419. InTech Publisher.
- Raman IM & Bean BP (1999) Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 19(5):1663-74.
- Ramon y Cajal (1911) *Histologie du système nerveux*. Maloine Vols I & II.
- Rana A, Gnaneswari D, Bansal S, Kundu B (2009) Prion metal interaction: is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal imbalance? *Chem Biol Interact* 181(3):282-91.
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277:21836-42.
- Rasheva VI & Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14(8):996-1007.

- Ratte S, Prescott SA, Collinge J, Jefferys JG (2008) Hippocampal bursts caused by changes in NMDA receptor-dependent excitation in a mouse model of variant CJD. *Neurobiol Dis* 32:96-104.
- Raturi A & Simmen T (2013) Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta* 1833(1):213-24.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12(8):747-57.
- Re L, Rossini F, Re F, Bordicchia M, Mercanti A, Fernandez OS, Barocci S (2006) Prion protein potentiates acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Pharmacol Res* 53(1):62-8.
- Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV (2013) New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci* 7:83.
- Rial D, Piermartiri TC, Duarte FS, Tasca CI, Walz R, Prediger RD (2012) Overexpression of cellular prion protein (PrP(C)) prevents cognitive dysfunction and apoptotic neuronal cell death induced by amyloid- $\beta$  (A $\beta$ 1-40) administration in mice. *Neurosci* 215:79-89.
- Rial D, Pamplona FA, Moreira EL, Moreira KM, Hipolide D, Rodrigues DI, Dombrowski PA, Da Cunha C, Agostinho P, Takahashi RN, Walz R, Cunha RA, Prediger RD (2014) Cellular prion protein is present in dopaminergic neurons and modulates the dopaminergic system. *Eur J Neurosci* 40(3):2479-86.
- Richter JD & Klann E (2009) Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes Dev* 23(1):1-11.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382(6587):180-2.
- Riesner D, Kellings K, Post K, Wille H, Serban H, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB (1996) Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol* 70(3):1714-22.
- Rodolfo K, Hassig R, Moya KL, Frobert Y, Grassi J, Di L (1999) Giamberardino, A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport, *Neuroreport* 10:3639-44.
- Roffé M, Beraldo FH, Bester R, Nunziante M, Bach C, Mancini G, Gilch S, Vorberg I, Castilho BA, Martins VR, Hajj GN (2010) Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(29):13147-52.
- Rohwer RG, Neckers LM, Trepel JB, Gajdusek DC, Wyatt RJ (1981) Serotonin concentrations in brain and blood of scrapie-infected and normal hamsters and mice. *Brain Res* 220:367-71.
- Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rüllicke 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.
- Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, LeBlanc A (2005) Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* 12:783-795.
- Rowland AM, Richmond JE, Olsen JG, Hall DH, Bamber BA (2006) Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABAA receptors in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26(6):1711-20.
- Rubenstein R, Merz PA, Kascsak RJ, Carp RI, Scalici CL, Fama CL, Wisniewski HM (1987) Detection of scrapie-associated fibrils (SAF) and SAF proteins from scrapie-affected sheep. *J Infect Dis* 156(1):36-42.
- Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A (2005) Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 1(1):11-22.
- Ruigrok TJ & Voogd J (2000) Organization of projections from the inferior olive to the cerebellar nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 426(2):209-28.
- Ruigrok TJ (2011) Ins and outs of cerebellar modules. *Cerebellum* 10(3):464-74.
- Russelakis-Carneiro M, Hetz C, Maundrell K, Soto C (2004) Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts. *Am J Pathol* 165:1839-48.

- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 4:e374.
- Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, March SA (2001) Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec* 148(1):7-13.
- Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411(6839):810-3.
- Saeki K, Matsumoto Y, Hirota Y, Matsumoto Y, Onodera T (1996) Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. *Virus Genes* 12(1):15-20.
- Safo PK, Cravatt BF, Regehr WG (2006) Retrograde endocannabinoid signaling in the cerebellar cortex. *Cerebellum* 5(2):134-45.
- 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):528-31.
- Sakthivelu V, Seidel RP, Winklhofer KF, Tatzelt J (2011) Conserved stress-protective activity between prion protein and Shadoo. *J Biol Chem* 286(11):8901-8.
- Sakudo A, Lee DC, Nakamura I, Taniuchi Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Ikuta K, Onodera T (2005) Cell-autonomous PrP-Doppel interaction regulates apoptosis in PrP gene-deficient neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333:448-454.
- Salès N, Rodolfo K, Hässig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 10(7):2464-71.
- Salès N, Hässig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Frétier P, Moya KL (2002) Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci* 15(7):1163-77.
- Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J (2011) Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* 470(7335):540-2.
- Santello M, Bezzi P, Volterra A (2011) TNF $\alpha$  controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron* 69:988-1001.
- Santuccion A, Sytnyk V, Leshchynska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169(2):341-54.
- Sarna JR & Hawkes R (2003) Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol* 70(6):473-507.
- Sasaki K, Bower JM, Llinás R (1989) Multiple Purkinje Cell Recording in Rodent Cerebellar Cortex. *Eur J Neurosci* 1(6):572-86.
- Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y (1993) Immunohistochemical study of microglia in the Creutzfeldt-Jakob brain. *Acat Neuropathol* 86:337-44.
- Sassoon J, Daniels M, Brown DR (2004) Astrocytic regulation of NMDA receptor subunit composition modulates the toxicity of prion peptide PrP106–126. *Mol Cell Neurosci* 25:181–91.
- Sauer H, Dagdanova A, Hescheler J, Wartenberg M (1999) Redox-regulation of intrinsic prion expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Free Radic Biol Med* 27(11-12):1276-83.
- Schätzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* 71(11):8821-31.
- Scherz-Shouval R, Weidberg H, Gonen C, Wilder S, Elazar Z, Oren M (2010) p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18511–6.
- Schilling K, Schmidt HH, Baader SL (1994) Nitric oxide synthase expression reveals compartments of cerebellar granule cells and suggests a role for mossy fibers in their development. *Neurosci* 59(4):893-903.
- Schmitt-Ulms G, Ehsani S, Watts JC, Westaway D, Wille H (2009) Evolutionary descent of prion genes from the ZIP family of metal ion transporters. *PLoS One* 4(9):e7208.

- Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O (2003) NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and non neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23):13326-31.
- Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D, Schütze S (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* 21(3):415-28.
- Schneider B, Pietri M, Pradines E, Loubet D, Launay JM, Kellermann O, Mouillet-Richard S (2011) Understanding the neurospecificity of prion protein signaling. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:169-86.
- Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Windl O, Kretzschmar HA (1996) Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene determines cerebellar pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neuropathol* 15(6):353-7.
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, Dröse W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000) The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 156(1):51-6.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* 300(5616):135-9.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* 17(1):1-11.
- Senatore A, Colleoni S, Verderio C, Restelli E, Morini R, Condliffe SB, Bertani I, Mantovani S, Canovi M, Micotti E, Forloni G, Dolphin AC, Matteoli M, Gobbi M, Chiesa R (2012) Mutant PrP suppresses glutamatergic neurotransmission in cerebellar granule neurons by impairing membrane delivery of VGCC  $\alpha(2)\delta-1$  Subunit. *Neuron* 74(2):300-13.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278(3):169-72.
- Shaham S & Horvitz HR (1996) Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* 10(5):578-91.
- Shambes GM, Beermann DH, Welker W (1978) Multiple tactile areas in cerebellar cortex: another patchy cutaneous projection to granule cell columns in rats. *Brain Res* 157(1):123-8.
- Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Ohkawa N, Inokuchi K (2012) Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci* 32(30):10413-22.
- Shen W & Ganetzky B (2009) Autophagy promotes synapse development in *Drosophila*. *J Cell Biol* 187(1):71-9.
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9(3):459-70.
- Shimizu H, Yamada M, Matsubara N, Takano H, Umeda Y, Kawase Y, Kitamoto T, Nishizawa M, Takahashi H (2009) Creutzfeldt-Jakob disease with an M232R substitution: report of a patient showing slowly progressive disease with abundant plaque-like PrP deposits in the cerebellum. *Neuropathology* 29(6):735-43.
- Shin HY, Park JH, Carp RI, Choi EK, Kim YS (2014) Deficiency of prion protein induces impaired autophagic flux in neurons. *Front Aging Neurosci* 6:207.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blättler T, Brandner S, Götz J, Rüllicke 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):203-14.
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 268(21):15922-8.
- Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125:1239-50.
- Shyu WC, Kao MC, Chou WY, Hsu YD, Soong BW (2000) Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Neuroreport* 11(4):771-4.



- Shyu WC, Chen CP, Saeki K, Kubosaki A, Matusmoto Y, Onodera T, Ding DC, Chiang MF, Lee YJ, Lin SZ, Li H (2005) Hypoglycemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *J Neurosci Res* 80(6):887-94.
- Sigurdsson B (1954) Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br Vet J* 110:341-54.
- Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Heikenwalder M, Manco G, Schwarz P, Ott D, Rüllicke T, Liberski PP, Julius C, Falsig J, Stitz L, Wüthrich K, Aguzzi A (2009) De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(1):304-9.
- Sikorska B, Liberski PP, Giraud P, Kopp N, Brown P (2004) Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2563-73.
- Sillitoe RV, Marzban H, Larouche M, Zahedi S, Affanni J, Hawkes R (2005) Conservation of the architecture of the anterior lobe vermis of the cerebellum across mammalian species. *Prog Brain Res* 148:283-97.
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* 437(7056):257-61.
- 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):26834-41.
- Simard M & Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-96.
- Simoneau S, Rezaei H, Salès N, Kaiser-Schulz G, Lefebvre-Roque M, Vidal C, Fournier JG, Comte J, Wopfner F, Grosclaude J, Schätzl H, Lasmézas CI (2007) In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog* 3(8):e125.
- Simonsen A & Tooze SA (2009) Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 186:773-82.
- Singh S & Dikshit M (2007) Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev* 54(2):233-50.
- Sisková Z, Page A, O'Connor V, Perry VH (2009) Degenerating synaptic boutons in prion disease: microglia activation without synaptic stripping. *Am J Pathol* 175(4):1610-21.
- Sisková Z, Reynolds RA, O'Connor V, Perry VH (2013) Brain region specific pre-synaptic and post-synaptic degeneration are early components of neuropathology in prion disease. *PLoS One* 8(1):e55004.
- Sisó S, Puig B, Varea R, Vidal E, Acín C, Prinz M, Montrasio F, Badiola J, Aguzzi A, Pumarola M, Ferrer I (2002) Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie. *Acta Neuropathol* 103(6): 615-26.
- Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK (2011) Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol* 18(4):504-6.
- Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 303:1514-1516.
- Solomon IH, Huettner JE, Harris DA (2010) Neurotoxic mutants of the prion protein induce spontaneous ionic currents in cultured cells. *J Biol Chem* 285:26719-26.
- Solomon IH, Biasini E, Harris DA (2012) Ion channels induced by the prion protein. *Prion* 6(1):40-5.
- Spencer MD, Knight RS, Will RG (2002) First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. *BMJ* 324:1479-82.
- Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5(4):e9979.
- Spire B, Dormont D, Barre-Sinoussi F, Montagnier L, Chermann JC (1985) Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma rays, and ultraviolet light. *Lancet* 1:188-9.

- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51(2):229-40.
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32(8):1991-2002.
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrP<sup>c</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(9):3416-21.
- Steele AD, King OD, Jackson WS, Hetz CA, Borkowski AW, Thielen P, Wollmann R, Lindquist S (2007a) Diminishing apoptosis by deletion of bax or overexpression of Bcl-2 does not protect against infectious prion toxicity in vivo. *J Neurosci* 27(47):13022-7.
- Steele AD, Hetz C, Yi CH, Jackson WS, Borkowski AW, Yuan J, Wollmann RH, Lindquist S (2007b) Prion pathogenesis is independent of caspase-12. *Prion* 1(4):243-7.
- Stein JF & Glickstein M (1992) Role of the cerebellum in visual guidance of movement. *Physiol Rev* 72(4):967-1017.
- Stern CM & Mermelstein PG (2010) Caveolin regulation of neuronal intracellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 67(22):3785-95.
- Stewart RS, Drisaldi B, Harris DA (2001) A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* 12(4):881-9.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Neurosci Methods* 37(2):173-82.
- Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5(18):2529-33.
- Sugihara I, Wu H, Shinoda Y (1999) Morphology of single olivocerebellar axons labeled with biotinylated dextran amine in the rat. *J Comp Neurol* 414(2):131-48.
- Sugihara I, Wu HS, Shinoda Y (2001) The entire trajectories of single olivocerebellar axons in the cerebellar cortex and their contribution to Cerebellar compartmentalization. *Journal Neurosci* 21(19):7715-23.
- Sugihara I & Shinoda Y (2004) Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldolase C and olivocerebellar labeling. *J Neurosci* 24(40):8771-85.
- Sugihara I & Quay PN (2007) Identification of aldolase C compartments in the mouse cerebellar cortex by olivocerebellar labeling. *J Comp Neurol* 500(6):1076-92.
- Sultan F (2001) Distribution of mossy fibre rosettes in the cerebellum of cat and mice: evidence for a parasagittal organization at the single fibre level. *Eur J Neurosci* 13(11):2123-30.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositolanchored prion protein. *EMBO J* 22:3591-3601.
- Sunyach C, Cisse MA, da Costa CA, Vincent B, Checler F (2007) The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem* 282:1956-63.
- Supattapone S (2004) Prion protein conversion in vitro. *J Mol Med (Berl)* 82(6):348-56.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718):441-6.
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 12:209-18.
- 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 prionrelated encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 184:1398-1404.

- Takayasu Y, Iino M, Kakegawa W, Maeno H, Watase K, Wada K, Yanagihara D, Miyazaki T, Komine O, Watanabe M, Tanaka K, Ozawa S (2005) Differential roles of glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *J Neurosci* 25(38):8788-93.
- Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA (2006) Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281:16016-24.
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406(6798):902-6.
- Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428:323-8.
- Tang P, Hung M-C, Klostergaard J (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35:8216-25.
- Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB (1992) Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* 3(8):851-63.
- Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 10(6):676-87.
- Tateishi J, Kitamoto T, Doh-ura K, Boellaard JW, Peiffer J (1992). Creutzfeldt-Jakob disease with amyloid angiopathy: diagnosis by immunological analyses and transmission experiments. *Acta Neuropathol* 83(5):559-63.
- Tateishi J, Kitamoto T, Hoque MZ, Furukawa H (1996) Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology* 46: 532-7.
- Taylor DR, Watts NT, Perera WS, Hooper NM (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependant endocytosis. *J Cell Sci* 118:5141-53.
- Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang S-L, Torchia M, Sidle KCL, Collinge J, DeArmond SJ, Prusiner SB (1994) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci* 91:9936-40.
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274:2079-82.
- Thach WT Jr (1967) Somatosensory receptive fields of single units in cat cerebellar cortex. *J Neurophysiol* 30(4):675-96.
- Thach WT (1970) Discharge of cerebellar neurons related to two maintained postures and two prompt movements. II. Purkinje cell output and input. *J Neurophysiol* 33(4):537-47.
- Thach WT & Bastian AJ (2004) Role of the cerebellum in the control and adaptation of gait in health and disease. *Prog Brain Res* 143:353-66.
- Theil D, Fatzer R, Meyer R, Schobesberger M, Zurbriggen A, Vandeveld M (1999) Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol* 121(4):357-67.
- Thellung S, Gatta E, Pellistri F, Corsaro A, Villa V, Vassalli M, Robello M, Florio T (2013) Excitotoxicity through NMDA receptors mediates cerebellar granule neuron apoptosis induced by prion protein 90-231 fragment. *Neurotox Res* 23(4):301-14.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-62.
- Thompson A, MacKay A, Rudge P, Lukic A, Porter MC, Lowe J, Collinge J, Mead S (2014) Behavioral and psychiatric symptoms in prion disease. *Am J Psychiatry* 171(3):265-74.
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke 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):639-42.

- Tolbert DL & Gutting JC (1997) Quantitative analysis of cuneocerebellar projections in rats: differential topography in the anterior and posterior lobes. *Neurosci* 80(2):359-71.
- Tombola F, Del Giudice G, Papini E, Zoratti M (2000) Blockers of VacA provide insights into the structure of the pore. *Biophys J*. 2000 Aug;79(2):863-73.
- 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):376-9.
- Tribouillard-Tanvier D, Striebel JF, Peterson KE, Chesebro B (2009) Analysis of protein levels of 24 cytokines in scrapie agent-infected brain and glial cell cultures from mice differing in prion protein expression levels. *J Virol* 83:11244–53.
- Trifilo MJ, Sanchez-Alavez M, Solforosi L, Bernard-Trifilo J, Kunz S, McGavern D, Oldstone MB (2008) Scrapie-induced defects in learning and memory of transgenic mice expressing anchorless prion protein are associated with alterations in the gamma aminobutyric acid-ergic pathway. *J Virol* 82(20):9890-9.
- Turnbaugh JA, Unterberger U, Saa P, Massignan T, Fluharty BR, Bowman FP, Miller MB, Supattapone S, Biasini E, Harris DA (2012) The N-terminal, polybasic region of PrP(C) dictates the efficiency of prion propagation by binding to PrP(Sc). *J Neurosci* 32:8817–30.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinase by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664–6.
- Van der Want JJ, Wiklund L, Guegan M, Ruigrok T, Voogd J (1989) Anterograde tracing of the rat olivocerebellar system with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). Demonstration of climbing fiber collateral innervation of the cerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 288(1):1-18.
- Van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP (1995) Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* 32(3):299-308.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9(2):267-76.
- Vassallo N & Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 86(3):538-44.
- Vassallo N, Herms J, Behrens C, Krebs B, Saeki K, Onodera T, Windl O, Kretzschmar HA (2005) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 332(1):75-82.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189):440-2.
- Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258(5090):1955-7.
- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75(2):229-40.
- Ventruiti A & Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7(5):443-51.
- Vidal C, Herzog C, Haerberle AM, Bombarde C, Miquel MC, Carimalo J, Launay JM, Mouillet-Richard S, Lasmézas C, Dormont D, Kellermann O, Bailly Y (2009) Early dysfunction of central 5-HT system in a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *Neuroscience* 160(4):731-43.
- Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, Grassi J, Lopez-Perez E, Checler F (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem* 276:37743-6.
- Vogt C (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkroete. (Alytes obstetricians), Solothurn: Jent und Gassman: 130.
- Voigtländer T, Unterberger U, Guentchev M, Schwaller B, Celio MR, Meyer M, Budka H (2008) The role of parvalbumin and calbindin D28k in experimental scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34(4):435-45.

- Voogd J (1967) Comparative aspects of the structure and fibre connexions of the mammalian cerebellum. *Prog Brain Res* 25:94-134.
- Voogd J & Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21(9):370-5.
- Voogd J, Pardoe J, Ruigrok TJ, Apps R (2003) The distribution of climbing and mossy fiber collateral branches from the copula pyramidis and the paramedian lobule: congruence of climbing fiber cortical zones and the pattern of zebrin banding within the rat cerebellum. *J Neurosci* 23(11):4645-56.
- Wadiche JI & Jahr CE (2005) Patterned expression of Purkinje cell glutamate transporters controls synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 8(10):1329-34.
- Wairkar YP, Toda H, Mochizuki H, Furukubo-Tokunaga K, Tomoda T, Diantonio A (2009) Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling. *J Neurosci* 29(2):517-28.
- Walmsley AR, Watt NT, Taylor DR, Perera WS, Hooper NM (2009) alpha-cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci* 40:242-8.
- Wan HI, DiAntonio A, Fetter RD, Bergstrom K, Strauss R, Goodman CS (2000) Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 26(2):313-29.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281(5383):1680-3.
- Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z (2006) Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* 26(31):8057-68.
- Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J (2010) Generating a prion bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327:1132-5.
- Wanschitz J, Klöppel S, Jarius C, Birner P, Flicker H, Hainfellner JA, Gambetti P, Guentchev M, Budka H (2000) Alteration of the serotonergic nervous system in fatal familial insomnia. *Ann Neurol* 48(5):788-91.
- Watt NT, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WS and Hooper NM (2005) Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280:35914-21.
- Watt NT, Griffiths HH, Hooper NM (2013) Neuronal zinc regulation and the prion protein. *Prion* 7(3):203-8.
- Watts JC & Westaway D (2007a) The prion protein family: Diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772:654-72.
- 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 (2007b) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J* 26(17):4038-50.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 278(27):25009-13.
- Wegiel J, Wisniewski HM, Dziwiatkowski J, Badmajew E, Tarnawski M, Reisberg B, Mlodzik B, De Leon MJ, Miller DC (1999) Cerebellar atrophy in Alzheimer's disease-clinical-pathological correlations. *Brain Res* 818(1):41-50.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517):727-30.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B (2008a) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30(6):678-88.
- Wei Y, Sinha S, Levine B (2008b) Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4(7):949-51.
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bähr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37(5):1296-300.
- Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA (2002) Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol* 89:331-59.

- Wemheuer WM, Benestad SL, Wrede A, Wemheuer WE, Brenig B, Bratberg B, Schulz-Schaeffer WJ (2011) PrPSc spreading patterns in the brain of sheep linked to different prion types. *Vet Res* 15:42-32.
- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(14):6418-22.
- Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, Harrison P (2011) The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Top Curr Chem* 305:225-56.
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772(6):629-44.
- Westergard L, Turnbaugh JA, Harris DA (2011) A naturally occurring C-terminal fragment of the prion protein (PrP) delays disease and acts as a dominant negative inhibitor of PrPSc formation. *J Biol Chem* 286:44234-42.
- White MD, Farmer M, Mirabile I, Brandner S, Collinge J, Mallucci GR (2008) Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(29):10238-43.
- Wiklund L, Toggenburger G, Cuénod M (1984) Selective retrograde labelling of the rat olivocerebellar climbing fiber system with D-[3H]aspartate. *Neuroscience* 13(2):441-68.
- Willard SS & Koochekpour S (2013) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci* 9:948e959.
- Wille H, Zhang GF, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB (1996) Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J Mol Biol* 259(4):608-21.
- Wille H, Bian W, McDonald M, Kendall A, Colby DW, Bloch L, Ollesch J, Borovinskiy AL, Cohen FE, Prusiner SB, Stubbs G (2009) Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(40):16990-5.
- Williams AE, Lawson LJ, Perry VH, Fraser H (1994) Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20(1):47-55.
- Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M (1997) PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* 144(2):433-8.
- Williams BL, Yaddanapudi K, Hornig M, Lipkin WI (2007) Spatiotemporal analysis of purkinje cell degeneration relative to parasagittal expression domains in a model of neonatal viral infection. *J Virol* 81(6):2675-87.
- Wilson DR, Ruth D, Anderson RD, Smith W (1950) Studies in scrapie. *J Comp Pathol* 60:267-82.
- Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Vanden Berghe T, Lippens S, Vandenaabeele P (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* 1:e18.
- Wise AK, Cerminara NL, Marple-Horvat DE, Apps R (2010) Mechanisms of synchronous activity in cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 588(Pt 13):2373-90.
- Wojtera M, Sobów T, Kłoszewska I, Liberski PP, Brown DR, Sikorska B (2012) Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature. *Folia Neuropathol* 50(1):74-84.
- Wolfe JW, Rawlings CA, Llinás RR (1973) A procedure for chronic microelectrode recording from cerebellar cortex in the awake cat and monkey. *Physiol Behav* 10(5):967-70.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1:139(5):1281-92.
- Wong BS, Liu T, Paisley D, Li R, Pan T, Chen SG, Perry G, Petersen RB, Smith MA, Melton DW, Gambetti P, Brown DR, Sy MS (2001) Induction of HO-1 and NOS in doppel-expressing mice devoid of PrP: implications for doppel function. *Mol Cell Neurosci* 17(4):768-75.
- Woolston DC, La Londe JR, Gibson JM (1982) Comparison of response properties of cerebellar- and thalamic-projecting interpo-laris neurons. *J Neurophysiol* 48(1):160-73.

- Wu H, Yang JM, Jin S, Zhang H, Hait WN (2006) Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 66(6):3015-23.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471-84.
- Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA, Wilesmith JW (1991) Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* 129:233-6.
- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756):555-6.
- Xiao X, Cali I, Dong Z, Puoti G, Yuan J, Qing L, Wang H, Kong Q, Gambetti P, Zou WQ (2013a) Protease-sensitive prions with 144-bp insertion mutations. *Aging (Albany NY)* 5(3):155-73.
- Xiao X, Yuan J, Haïk S, Cali I, Zhan Y, Moudjou M, Li B, Laplanche JL, Laude H, Langeveld J, Gambetti P, Kitamoto T, Kong Q, Brandel JP, Cobb BA, Petersen RB, Zou WQ (2013b) Glycoform-selective prion formation in sporadic and familial forms of prion disease. *PLoS One*. 2013;8(3):e58786.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19:3290-98.
- Xu Y, Tian C, Wang SB, Xie WL, Guo Y, Zhang J, Shi Q, Chen C, Dong XP (2012) Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy* 8(11):1604-20.
- Yamaguchi H & Wang HG (2004a) CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 279(44):45495-502.
- Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S (2004b) Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1247-1252.
- Yamanouchi H, Budka H, Vass K (1986) Unilateral Creutzfeld-Jakob disease. *Neurol* 36(11):1517-20.
- Yang Q, Hashizume Y, Yoshida M, Wang Y (1999) Neuropathological study of cerebellar degeneration in prion disease. *Neuropathology* 19(1):33-9.
- Yang DS, Kumar A, Stavrides P, Peterson J, Peterhoff CM, Pawlik M, Levy E, Cataldo AM, Nixon RA (2008) Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 173(3):665-81.
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson DW, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Therapeutic effects of remediating autophagy failure in a mouse model of Alzheimer disease by enhancing lysosomal proteolysis. *Autophagy* 7(7):788-9.
- Yao H, Zhao D, Khan SH, Yang L (2013) Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45(6):494-502.
- Yeh WC, de la Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279(5358):1954-8.
- Yokoyama T, Kimura KM, Ushiki Y, Yamada S, Morooka A, Nakashiba T, Sassa T and Itohara S (2001) In vivo conversion of cellular prion protein to pathogenic isoforms, as monitored by conformation-specific antibodies. *J Biol Chem* 276:11265-71.
- Yoon JY, Suri V, Nicholson LFB, Green CR (2011) Improved immunohistochemical protocol for organotypic brain slice cultures. *Microscopy and Analysis* 25(1): 5-7.
- 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 N-terminal Half of Prion Protein on Neurotoxicity of Prion Protein-like Protein/Doppel in Mice. *J Biol Chem* 283(35): 24202-11.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8(10):1124-32.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75(4):641-52.

- Yuan S, Topf M, Reubold TF, Eschenburg S, Akey CW (2013) Changes in Apaf-1 conformation that drive apoptosome assembly. *Biochemistry* 52(13):2319-27.
- Yue Z, Horton A, Bravin M, DeJager PL, Selimi F, Heintz N (2002) A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35(5):921-33.
- Yue Z (2007) Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy* 3(2):139-41.
- Yue Y, Wang Y2, Li D3, Song Z4, Jiao H5, Lin H6 (2014) A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced mice anorexia. *J Endocrinol* 27 JOE-14-0523.
- Yun SW, Choi EK, Ju WK, Ahn MS, Carp RI, Wisniewski HM, Kim YS (1998) Extensive degeneration of catecholaminergic neurons to scrapie agent 87V in the brains of IM mice. *Mol Chem Neurobiol* 34( 2-3):121-32.
- Yun SW, Ertmer A, Flechsig E, Gilch S, Riederer P, Gerlach M, Schätzl HM, Klein MA (2007) The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate delays prion neuroinvasion by inhibiting prion propagation in the periphery. *J Neurovirol* 13(4):328-37.
- Zahn R, Liu A, Lühns T, Riek R, von Schroetter C, López García F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(1):145-50.
- Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 10(3):285-92.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21(13):3307-16.
- Zeidler M, Stewart GE, Barraclough CR, Bateman DE, Bates D, Burn DJ, Colchester AC, Durward W, Fletcher NA, Hawkins SA, Mackenzie JM, Will RG (1997) New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350(9082):903-7.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12:982-95.



# ANNEXES

### Communications (poster)

- Ragagnin A, Ayrancy G, Dole S, Bombarde G, Haeberle A-M, Demais V, Grant NJ, Bailly Y (2011) New insights into Purkinje cell death in cerebellar organotypic cultures from the prion protein-deficient Zrch-I and Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> mice, PRION 2011, 16-19 mai 2011, Montreal, Canada.
- Ragagnin A, Guillemain A, Grant NJ, Bailly Y (2012) Purkinje cell death mechanisms in cerebellar organotypic cultures from prion protein-deficient mice, Neurex Annual Meeting, 25 octobre 2012, Strasbourg.
- Ragagnin A, Pietri M, Guillemain A, Alleaume-Butaux A, Haeberlé A-M, Grant NJ, Vidal C, Kellermann O, Schneider B, Bailly Y (2013) Parasagittal compartmentation of scrapie prion protein deposition and inflammation in the mouse cerebellar cortex, 11<sup>ème</sup> colloque de la Société des Neurosciences, 21-24 mai 2013, Lyon.
- Guillemain A, Ragagnin A, Bailly Y, Grant NJ (2013) Neuronal death in cerebellar organotypic cultures from prion protein-deficient mice, 11<sup>ème</sup> colloque de la Société des Neurosciences, 21-24 mai 2013, Lyon.
- Ragagnin A, Grant NJ, Schneider B, Kellermann O, Bailly Y (2014) Anatomical compartmentation of prion pathology in mouse cerebellum, Journée de l'École Doctorale, 19 février 2014, Strasbourg.
- Demuth S, Ragagnin A, Haeberlé A-M, Grant NJ, Bailly Y (2014) Prion-induced neuroinflammation in the mouse cerebellum. Journées scientifiques de l'École de l'Inserm Liliane Bettencourt, Paris, 12-14 septembre 2014.
- Ragagnin A, Grant NJ, Schneider B, Kellermann O, Bailly Y (2014) Anatomical compartmentation of prion pathology in mouse cerebellum, Annual Meeting of the Society for Neurosciences, 15-18 novembre 2014, Washington DC.

### Communication orale

- Ragagnin A. (2013) Compartimentation anatomo-pathologique du cervelet infecté par les prions, Journée d'Inauguration du Neuropôle, 22 novembre 2013, Strasbourg.

### Publications

- Pietri M., Dakowski C., Hannaoui S., Alleaume-Butaux A., Hernandez-Rapp J., Ragagnin A, Mouillet-Richard S., Haik S., Bailly Y., Peyrin J-M., Launay J-M., Kellermann O., Schneider B. (2013) PDK1-dependent switch-off of TACE shedding activity in prion and Alzheimer's diseases. *Nat. Med.* 19 (9): 1124-31.
- Ragagnin A, Guillemain A., Grant N. J., Bailly Y. (2013) Neuronal autophagy and prion proteins. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* YJR Bailly (Ed.), pp. 377-419. ISBN: 978-953-51-1062-0, InTech Publisher.

### **Publication 1**

Ragagnin A., Guillemain A., Grant N. J., Bailly Y. (2013) Neuronal autophagy and prion proteins. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* YJR Bailly (Ed.), pp. 377-419. ISBN: 978-953-51-1062-0, InTech Publisher.

---

# Neuronal Autophagy and Prion Proteins

---

Audrey Ragagnin, Aurélie Guillemain,  
Nancy J. Grant and Yannick J. R. Bailly

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/55646>

---

## 1. Introduction

Protein and organelle turnover is essential to maintain cellular homeostasis and survival. Removing and recycling cell constituents is achieved by autophagy in all cells, including neurons. Autophagy contributes to various physiological processes, such as intracellular cleansing, cellular homeostasis, development, differentiation, longevity, tumor suppression, elimination of invading pathogens, antigen transport to the innate and adaptive immune systems, and counteracting endoplasmic reticulum (ER) stress and diseases characterized by the accumulation of protein aggregates [1]. Autophagy plays a role in a number of infectious and inflammatory diseases, in addition to protein unfolding and misfolding diseases that lead to neuron, muscle and liver degeneration or heart failure [2-4]. Whereas autophagy has long been defined as a form of non-apoptotic, programmed cell death [5], recent findings suggest that autophagy functions primarily to sustain cells, and only defects in autophagy lead to cell death [6].

## 2. Autophagy in neuronal physiology

Autophagy was initially identified and characterized in a few cell types including neurons. The distinct vacuoles which feature this self-eating process were originally described at the ultrastructural level [7, 8]. The formation of autophagosomes was associated with chromatolysis of a restricted neuroplasm area, free of organelles, but filled with various types of vesicles [9]. The function of autophagy in mature neurons, however, is still debated. In comparison with other organs, rodent brains show high expression levels of autophagy-related (Atg) proteins and low levels of autophagy markers such as autophagosome number and LC3-II. Indeed, even under prolonged fasting conditions, the number of autophagosomes does not

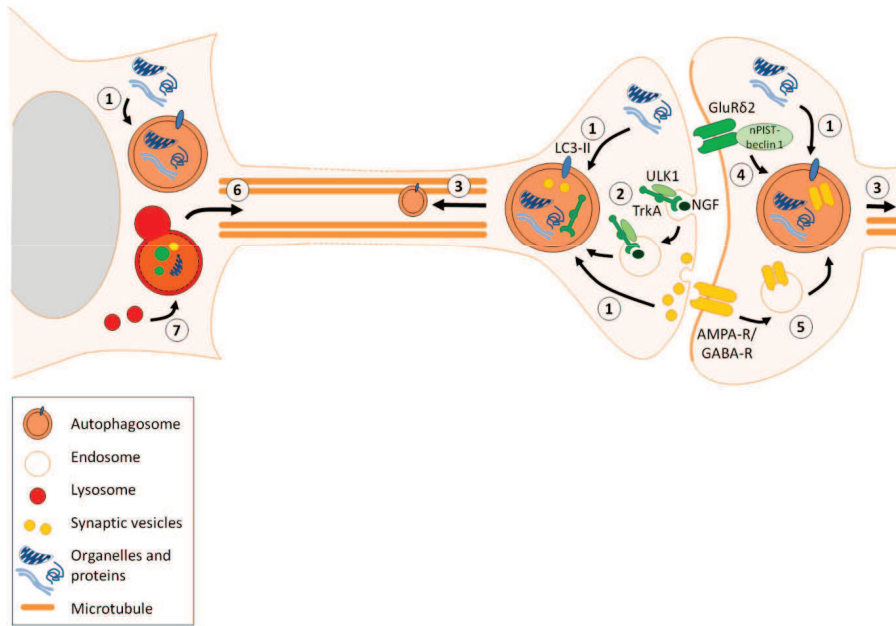
increase in neurons, probably because their nutrient supply from peripheral organs is maintained [10]. However, mice with CNS defects in their autophagic machinery exhibit neurological deficits, such as abnormal limb-clasping reflexes, locomotor ataxia, and lack of motor coordination, in addition to a significant loss of large pyramidal neurons in the cerebral cortex and Purkinje cells (PCs) in the cerebellar cortex [11-13].

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is initiated when a portion of the cytoplasm is sequestered within a double-membrane organelle, the so-called autophagosome [14]. The autophagic machinery has been extensively detailed at the molecular level in a number of reviews including several chapters of this book [14-17]. Atg and several non-Atg proteins have been identified as regulators of key steps leading to the degradation of cytosolic components in lysosomes: initiation and nucleation of phagophores, expansion of autophagosomes, maturation of autophagosomes into amphisomes/autolysosomes, and execution of autophagic degradation [18]. The endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) pathway functions in the sorting of transmembrane proteins into the inner vesicles of multivesicular bodies (MVB) during endocytosis. Also it is conceivably an essential part of the basal autophagy process in neurons because ubiquitin- or p62/SQSTM1 (p62)-labelled inclusions and autophagosomes accumulate in neurons deficient in ESCRT components [19]. Increasing evidence suggests that autophagy is regulated in a cell type-specific manner and as such autophagy may serve a distinct function in neurons and may show difference in the molecular machinery underlying basal autophagy (Fig. 1).

### 2.1. Axonal autophagy

In neurons, autophagy occurs in axons, suggesting that it may be uniquely regulated in this compartment and specifically adapted to local axonal physiology [20]. In primary dorsal root ganglion neurons, autophagosomes initiate distally in nerve terminals and mature during their transport toward the cell soma [21, 22]. In non-neuronal cells, the autophagosomal membrane has multiple possible origins, including endocytosed plasma membrane (amphisome), ER, mitochondria, and trans-Golgi membranes [18, 21, 23- 32]. In contrast, the origin of autophagosomes in the axons is likely to be restricted to the sources of membrane available in the terminals such as smooth ER and plasma membrane [33, 34], excluding rough ER and Golgi dictyosomes.

As observed in ultrastructural studies of axotomized neurons [9, 35], analysis of Purkinje cell (PC) degeneration in lurcher mutant  $\text{GluR}\delta 2^{\text{Lc}}$  [36] demonstrates autophagosomes in their axonal compartment. In this study, an excitotoxic insult mediated by  $\text{GluR}\delta 2^{\text{Lc}}$  triggered a rapid and robust accumulation of autophagosomes in dystrophic axonal swellings providing evidence that autophagy is induced in dystrophic terminals and that autophagosome biogenesis occurs in axons [37]. The molecular scenario underlying the initiation of this axonal autophagy is unclear. Liang *et al.* [38] suggested that autophagy in lurcher PCs could be directly activated by an interaction between the postsynaptic  $\text{GluR}\delta 2^{\text{Lc}}$ , nPIST and beclin 1 an important regulator of autophagy. Nevertheless, how activation of this postsynaptic signaling pathway in dendrites initiates autophagosome formation in axon compartments is uncertain. PC death that is correlated with early signs of autophagy appears to be independent of depolarization



**Figure 1. Physiological neuronal autophagy.** Autophagy recycles synaptic components to sustain neuronal homeostasis and regulate synaptic plasticity and growth. **1.** Autophagic degradation of organelles, synaptic vesicles and proteins. **2.** ULK1-mediated autophagy of endocytosed NGF-bound TrkA receptors. **3.** Dynein-mediated retrograde transport of autophagosomes. **4.** GluRδ2 activation of beclin 1-dependent autophagy via nPIST. **5.** Targeting of postsynaptic receptors to autophagosomes via endocytosis. **6.** Kinesin-dependent anterograde transport of autophagosomes. **7.** Formation of autophagolysosomes by fusion of autophagosomes with lysosomes.

in the heteroallelic mutant *Lurcher/hotfoot* bearing only one copy of the *lurcher* allele and no wild-type *GRID2* [39]. However, in the *lurcher* mutant bearing only one copy of the *lurcher* allele and one copy of the wild-type *GRID2* allele, the leaky channel of *GluRδ2<sup>Lc</sup>* depolarizes the neuron and this could transduce an electrical signal to the distal ends causing rapid physiological changes within axons. This effect combined with the local changes in postsynaptic signaling in dendrites may promote autophagosome biogenesis [37, 40].

## 2.2. Microtubule-dependent dynamics of neuronal autophagy

Previous data indicate that autophagy is a microtubule-dependent process. In cultured sympathetic neurons, autophagosomes formed in the distal ends of axon undergo retrograde transport along microtubules to the cell body where lysosomes that are necessary for the degradation step of autophagy are usually located [21]. Consistent with these observations, prominent retrograde transport of GFP-LC3-labelled autophagosomes has been observed in the axons of primary cerebellar granule cells [36]. In serum-deprived PC12 cells, autolysosomes formed by fusion of autophagosomes with lysosomes move in both anterograde and retro-

grade directions in neurites, and this trafficking requires microtubules [41]. Furthermore, both pharmacological and siRNA-based inhibition of directional microtubule motor proteins kinesin and dynein partially block respectively, anterograde and retrograde neuritic transport of autophagosomes, indicating that they participate in this transport. Recent observations in primary dorsal root ganglionic neurons support a maturation model in which autophagosomes initiate distally, engulfing mitochondria and ubiquitinated cargo, and move bidirectionally along microtubules driven by bound anterograde kinesin and retrograde dynein motors [22]. Fusion with late endosomes or lysosomes may then allow autophagosomes to escape from the early distal pool by robust retrograde dynein-driven motility. The involvement of the dynein-dynactin complex in the movement of autophagosomes along microtubules to lysosomes has also been demonstrated in non-neuronal cells [42]. Consistent with the formation of an autolysosomal compartment, autophagosomes increasingly acidify as they approach the cell soma, thereby fueling the catalysis of the degradation of their engulfed contents. Fully acidified autolysosomes undergo bidirectional motility suggesting reactivation of kinesin motors [22, 41].

The interaction of the autophagic membrane marker Atg8/LC3 with the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) [43] implicates microtubule-dependent, axon-specific regulation of autophagosomes. Overexpression of MAP1B in non-neuronal cells reduces the number of LC3-associated autophagosomes without impairing autophagic degradation. The scarcity of LC3-labelled autophagosomes in CNS neurons under normal conditions may be explained by their high expression levels of MAP1B [10, 36]. By modifying microtubule function, the LC3-MAP1B interaction has been proposed to accelerate the delivery of LC3-autophagosomes to lysosomes, thereby promoting efficient autophagic turnover [37]. The exact mechanism underlying the involvement of microtubule in autophagosome formation, as well as targeting and fusion with lysosomes is open to debate [44, 45]. Based on (i) the absence of obvious changes in LC3 autophagosomes when they are associated with phosphorylated MAP1B-P, (ii) the elevated level of MAP1B-P bound to LC3 in dystrophic terminals containing a large number of autophagosomes [36] and, (iii) the conserved role of MAP1B-P in axonal growth and repair during development or injury (which implicates autophagy in remodelling axonal terminals during regeneration) [46], the interactions of LC3 with MAP1B and MAP1B-P have been proposed to represent a regulatory determinant of autophagy in axons under normal and pathological conditions respectively [37].

### 2.3. Functions of neuronal autophagy

Neurons, as non-dividing cells, are more sensitive to toxic components than dividing cells. Therefore, their survival and the maintenance of their specialized functions under physiological and pathological conditions is crucial requiring a tight quality control of cytoplasmic components and their degradation. Autophagy is believed to be of particular importance in the synaptic compartments of neurons where high energy requirements and protein turnover are necessary to sustain synaptic growth and activity. The CNS displays relatively low levels of autophagosomes under normal conditions, even after starvation, but requires an indispensable turnover of cytosolic contents by autophagy even in the absence of any disease-associated

mutant proteins [10, 47, 48]. The scarcity of immature autophagosomes in neurons is likely to reflect a highly efficient autophagic degradation in the healthy brain. Accordingly, inhibition of autophagy causes neurodegeneration in mature neurons suggesting that autophagy may regulate neuronal homeostasis [11, 12]. For example, abnormal protein accumulation and eventual neurodegeneration are observed in the CNS of mice lacking the *atg5* or the *atg7* genes. This implies that basal autophagy is normally highly active and required for neuronal survival [11, 12]. The cardinal importance of autophagy in central neurons is further supported by recent studies showing a rapid accumulation of autophagosomes in cortical neurons when lysosomal degradation is inhibited. Thus, constitutive autophagy apparently plays an active role in neurons even under nutrient-rich conditions [49, 50].

### 2.3.1. Axonal homeostasis

Constitutive autophagy is probably essential for axonal homeostasis. Suppression of basal autophagy by either deleting an *atg* gene or inhibiting autophagic clearance in neurons disrupts axonal transport of vesicles destined for lysosomal degradation, and causes axonal swelling and dystrophy [11, 12, 37, 50]. For examples, *Atg1/Unc-51* mutants in *C. elegans* show defaults in axonal membranes [51], and *Unc-51.1*, the murine homologue of *Unc-51* is necessary for axonal extension, suggesting a possible role for these proteins in axonal membrane homeostasis [20, 52, 53]. In the cerebellum, neuron-specific deletion of *FIP200*, a protein implicated in autophagosome biogenesis, causes axon degeneration and neuronal death [13]. Altogether, these data suggest that autophagy is essential to maintain axonal structure and function through retrograde axonal transport [16]. The degree of vulnerability and the formation of intracellular inclusions vary significantly among the different types of CNS neurons in mutant brains deficient in *Atg5* or *Atg7* suggesting disparate intrinsic requirements for autophagy and relative levels of basal autophagy [20]. For example, while ubiquitinated inclusions are rare in the *Atg5*- or *Atg7*-deficient PCs, these cells are among the most susceptible neurons to *Atg 5/7* gene deletion [54, 55]. *ULK1*, the human homologue of *Atg1* is incorporated into the active *NGF-TrkA* complex after its K-63 polyubiquitination and association with p62 [52, 56]. The subsequent interaction of *ULK1* with endocytosis regulators allows trafficking of *NGF-bound TrkA* receptors into endocytic vesicles [57] providing a possible mechanism of crosstalk between autophagy and endocytosis. By fusing with autophagosomes, some membrane compartments, including endosomes, can be removed from axons and degraded in lysosomes. This process maintains the homeostasis of the axonal membrane networks and as such is essential for axonal physiology [20, 53].

Indeed, dysfunctional autophagy has been implicated in axonal dystrophy. Axonal swellings occur in autophagy-deficient mouse brains [11, 12] and genetic ablation of *Atg7* provokes cell-autonomous axonal dystrophy and degeneration, inferring that autophagy is crucial for membrane trafficking and turnover in axons [53]. In *Atg5*- or *Atg7*-deficient PCs, axonal endings exhibit an accumulation of abnormal organelles and membranous profiles much earlier than the somato-dendritic compartment [53, 54]. Axonal degeneration is increasingly believed to precede somatic death by a non-apoptotic auto-destructive mechanism [58, 59]. The “dying-back” progressive retrograde degeneration of the distal axon is a likely model of



the chronic injury observed in neurodegenerative diseases [59]. NGF-deprivation induces autophagosome accumulation in the distal tips of neurites of PC12 cells, and knocking down *Atg7* or *beclin 1* expression delays neurite degeneration of NGF-deprived sympathetic neurons [60]. This suggests that overactive or deficient autophagy contributes to axonal degeneration in a dying-back manner due to the fragility of the axonal tips [20].

### 2.3.2. Dendritic autophagy

Early autophagosomes have also been observed in dendrites and the cell body of neurons suggesting that axon terminals are not be the only sites where neuronal autophagosomes form, and that autophagy may play a regulatory function in dendrites under physiological and pathological conditions [19]. Along this line, mTOR a key regulator of the autophagic pathway, modulates postsynaptic long-term potentiation and depression, suggesting that autophagy may critically control synaptic plasticity at the postsynaptic, dendritic compartment [61]. Further investigations are required to determine the specific roles of autophagy in dendrites and axons.

Since autophagosomes can fuse with endosomes and form amphisomes, there is a link between autophagy and endocytosis [62]. ESCRT proteins have recently been implicated in normal autophagy [19, 63, 64]. The endocytic pathways, in particular multi-vesicular bodies (MVBs) may serve as critical routes for autophagosomes to reach lysosomes, because defects in ESCRT function prevents fusion or maturation of autophagosomes. The ESCRT-MVB pathway could represent the primary, if not the only, route for delivering autophagosomes to lysosomes in some cell types [20]. In neurons, a large part of the endocytosed cargo merges with the autophagic pathway prior to being degraded by lysosomes [65]. Alterations in ESCRT function have also been linked to autophagy-deficiency in fronto-temporal dementia (FTD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In these cases, the particular vulnerability of the neurons appears to be associated with a dysfunction in the autophagosome-MVB pathway in the dendritic compartment [19].

### 2.3.3. Protein homeostasis

Neurons deficient in *Atg5* or *Atg7* exhibit an accumulation of polyubiquitinated proteins in inclusion bodies even though the proteasome function is normal, suggesting that basal autophagy prevents spontaneous protein aggregation and plays an essential role in protein clearance and homeostasis in neurons. Such a function is even more critical in neurons expressing disease-related proteins like the aggregate-prone mutant  $\alpha$ -synuclein and poly-glutamine-containing proteins [66-68], although how autophagy selectively degrades these disease-related proteins is unclear. The ubiquitin-associated protein p62 is a likely candidate, providing a link between autophagy and selective protein degradation. Indeed, p62 binds numerous proteins through multiple protein-protein interacting motifs, including one for LC3 [55, 56] and the ubiquitin-associated C-terminal domain which binds ubiquitinated proteins. The relationship between p62 and autophagy is further supported by the observation that a marked accumulation of p62 and LC3 occurs only when lysosomes, but not proteasomes, are blocked. Furthermore, p62 protein levels are elevated in autophagy-deficient neurons [36, 55].

This argues that p62 is a specific substrate of autophagic degradation rather than a molecule involved in autophagosome formation since p62-knockout mice display intact autophagosomes and slower protein degradation. Autophagy-deficient cells and neurons accumulate ubiquitin- and p62-positive inclusions, and this accumulation is greatly reduced by ablating p62 [55, 69]. p62 with mutations in the LC3 recognition sequence escape autophagic degradation, leading to the formation of inclusions, whereas those with mutations in the self-oligomerizing domain PB1 are poorly degraded, but no protein inclusions form. Thus increased levels and oligomerization of p62 are required for the formation of inclusion bodies, and their degradation is facilitated by oligomerization. Ubiquitinated aggregates induced by proteasome inhibition are also reduced in p62-deficient cells suggesting that p62 is a general mediator of inclusion formation and normally functions as an adaptator targeting proteins for autophagic degradation [20].

#### 2.3.4. Neuronal autophagy in synapse development, function and remodeling

Neuronal autophagy has been recently shown to play an important role in synapse development. The ubiquitin-proteasome system negatively regulates growth of the neuromuscular junction (NMJ) in *Drosophila* [70] whereas NMJ is positively regulated by neuronal autophagy; a decrease or an increase in autophagy correspondingly affects synapse size [71]. Indeed, an overexpression or a mutation of *Atg1*, a gene involved in autophagy induction, respectively enhanced or decreased NMJ growth. Furthermore, this positive effect of autophagy on NMJ development is mediated by downregulating Hiw, an E3 ubiquitin ligase which negatively regulates synaptic growth by downregulating Wallenda (Wnd), a MAP kinase kinase [70- 72]. Although autophagy is considered as a nonselective bulk degradation process, it can regulate specific developmental events in a substrate-selective mode [73, 74]. In *C. elegans*, when presynaptic afferences are removed from postsynaptic cells, GABAA receptors are selectively targeted to autophagosomes [73]. Accordingly, Hiw could traffic to autophagosomes via a still unknown mechanism, although Hiw could be unselectively degraded by autophagy along with other presynaptic proteins. Interestingly, the synaptic density in mice carrying an *atg1* mutation is decreased due to excessive activity of the MAP kinase ERK, suggesting that activated ERK negatively regulates synapse formation and that *Atg1* regulates synaptic structure by downregulating ERK activity [75]. As pointed out by Shen and Ganetzky [71], autophagy is a perfect candidate to modulate synaptic growth and plasticity in function of environmental conditions, resulting in plausible consequences in learning and memory.

Autophagy has recently been shown to regulate neurotransmission at the presynaptic level [76]. Besides enhancing protein synthesis via the mTORC1 complex, mTOR activity inhibits autophagy by an Atg13 phosphorylation-induced blockade of Atg1 [77]. In the nervous system, mTORC1 promotes learning and synaptic plasticity dependent on protein synthesis [78- 80]. Conversely, the mTOR inhibitor rapamycin impedes protein synthesis and blocks cell injury-induced axonal hyperexcitability and synaptic plasticity, as well as learning and memory [81, 82]. In prejunctional dopaminergic axons, inhibition of mTOR induces autophagy as shown by an increase in autophagosome formation, and decreases axonal volume, synaptic vesicle number and evoked dopamine release. Similarly, non-dopaminergic striatal terminals also

display more autophagosomes and fewer synaptic vesicles. Conversely, chronic autophagy deficiency in dopamine neurons increases dopaminergic axon size and evoked dopamine release, and promotes rapid presynaptic recovery. Thus mTOR-dependent axonal autophagy locally regulates presynaptic structure and function. In cultured brain slices, the occurrence of autophagosomes in presynaptic terminals isolated from their cell bodies confirms that autophagosomes are locally synthesized [83], and supports the view that this autophagy may serve to modulate presynaptic terminal function by sequestering presynaptic components [76]. The global stimulating effect of chronic autophagy deficiency on dopaminergic neurons is consistent with the implication of autophagy in neurite retraction of sympathetic neurons *in vitro* [84] and neuritic growth in developing neurons [21].

There are only a few other reports indicating that autophagy may participate in synapse remodeling. In the cerebellar cortex of the (*Bax*<sup>-/-</sup>;*GluRδ2*<sup>Lc</sup>) double mutant mouse (Fig. 2A), prominent autophagic profiles are evident in parallel fiber terminals subjected to intense remodeling in the absence of the PCs, their homologous target neurons [85]. As mentioned above, endocytosed GABAA receptors are selectively targeted to autophagosomes in *C. elegans* neurons [73], whereas autophagy promotes synapse outgrowth in *Drosophila* [71]. Autophagy may also modulate synaptic plasticity as recently demonstrated in mammalian hippocampal neurons [61]. Here, neuronal stimulation by chemical LTD induces NMDAR-dependent autophagy by inhibiting the PI3K-Akt-mTOR pathway. Enhanced autophagosome formation in the dendrites and spines of these neurons targets internalized AMPA receptors to lysosomes suggesting that autophagy contributes to the NMDAR-dependent synaptic plasticity required to maintain LTD and assure certain brain functions [61]. A possible mechanism for this formation of autophagosomes and autophagic degradation of AMPARs in dendritic shafts and spines may involve a change in endosome cycling. The formation of more amphisomes due to the fusion of endosomes with autophagosome [86, 87] would reduce the recycling endosome population, and direct more AMPAR-containing endosomes to autophagosomes for lysosomal degradation. Another alternative, but not exclusive actor is p62. This autophagosomal protein is important for LTP and spatial memory [88], interacts with AMPAR and is required for the trafficking of AMPAR [89]. AMPAR via its interaction with p62 would be trapped in autophagosomes as their number increased [61]. mTOR regulates protein turnover in neurons by functioning at the intersection between protein synthesis and degradation. During learning and reactivation in the amygdala and hippocampus, rapamycin inhibition of mTOR has recently been shown to impair object recognition memory [90], implicating signaling mechanisms involved in protein synthesis, synaptic plasticity and cell metabolism in this cognitive function.

#### 2.4. Few autophagosomes, a feature of basal neuronal autophagy

Neurons are highly resistant to large-scale induction of autophagy in response to starvation, probably due to the multiple energy sources available to assure their function [48]. Interestingly, the activity of mTOR, a negative regulator of autophagy is significantly reduced in hypothalamic neurons from mice after a 48h starvation [91], although there are reports that autophagy in neurons can be regulated independently of mTOR [92, 93]. For example, insulin

impairs the induction of neuronal autophagy *in vitro*, but in its absence induction of autophagy is mTOR-dependent. Furthermore, a potent Akt inhibitor provokes robust autophagy [92]. Thus insulin signaling maintains a low level of autophagosome biogenesis in healthy neurons constituting a critical mechanism for controlling basal autophagy in neurons. In addition to insulin signaling, multiple parallel signaling pathways including the mTOR pathway can regulate autophagy in neurons. From these data, Yue and collaborators [20] have proposed that basal autophagy in CNS neurons is regulated by at least two mechanisms: (1) a non-cell-autonomous mechanism whereby regulators (nutrients, hormones and growth factors) are supplied by extrinsic sources (glia, peripheral organs), (2) a cell-autonomous mechanism controlled by intrinsic nutrient-mediated signaling or specific factors expressed in neurons.

Neurons may depend less on autophagy to provide free amino acids and energy under physiological conditions given their quasi exclusive use of blood-born glucose as a source of carbon and energy for protein synthesis. Accordingly, the primary function of neuronal autophagy may be different than a primary response to starvation, and autophagy regulatory mechanisms are likely to be specific in neurons. Furthermore, gender differences in autophagic capacity have been suggested by the faster autophagic response to starvation of cultured neurons from male rats compared to those from females [94]. While *in vivo* evidence of neuronal autophagy mediated by nutrient signaling is still missing, a number of stress-related signals, neuron injuries and neuropathogenic conditions trigger prominent formation and accumulation of autophagosomes in neurons. During this process, neurons may undergo a significant change in autophagy regulation, involving a deregulation that allows neurons to switch from basal level (neuron-specific process featured by a low number of autophagosomes) to an activated state (well-conserved induced autophagy with large-scale biosynthesis of autophagosomes) [20]. Hypoxic-ischemia [95, 96], excitotoxicity [97-99], the dopaminergic toxins, methamphetamine and MPP+ [65, 100, 101], proteasome inhibition [102-104], lysosomal enzyme/lipid storage deficiencies [105-108] are examples of these pathological inducers of neuronal autophagy (see below).

### 3. Autophagy in neuronal physiopathology

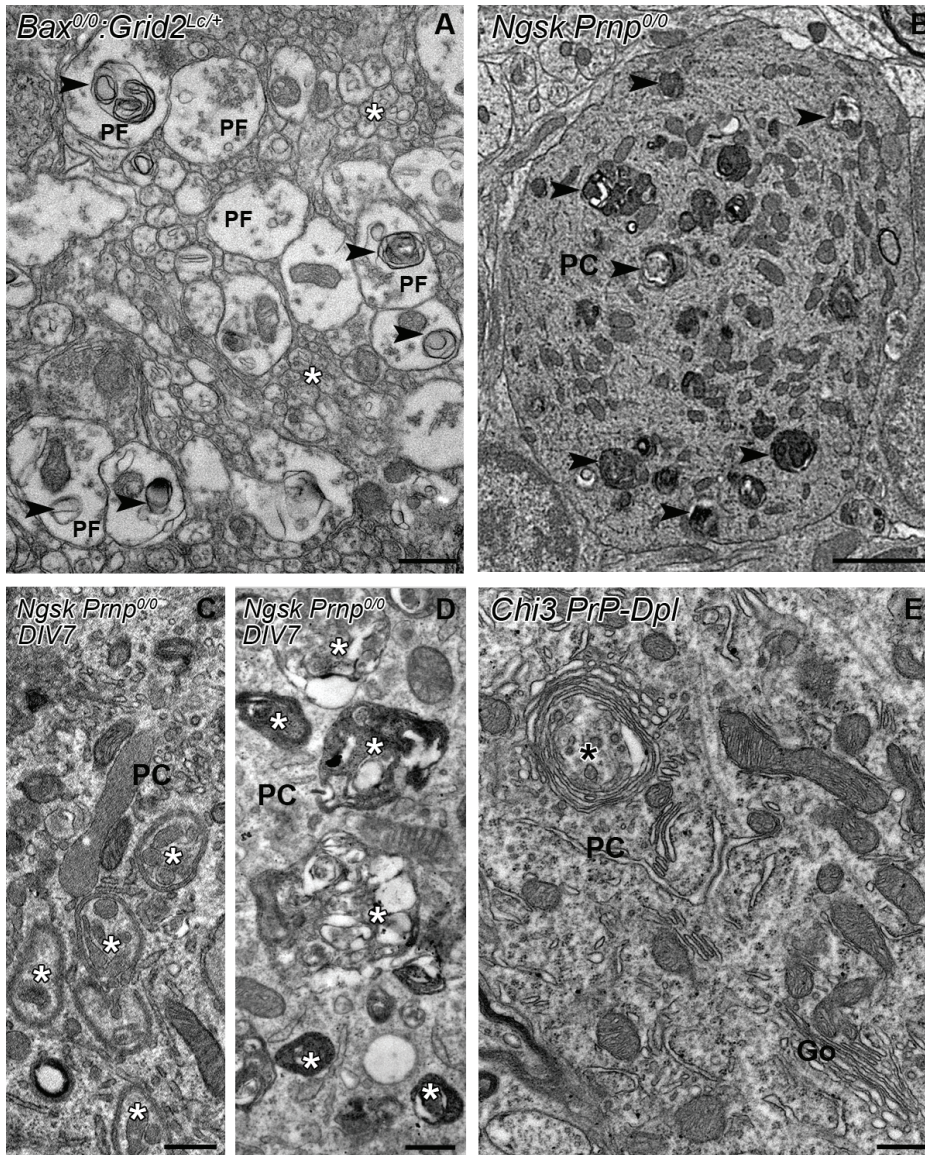
Autophagy normally protects effect against neurodegeneration, but defects in the autophagy machinery are sufficient to induce neurodegeneration. Indeed, neuron-specific disruption of autophagy results in neurodegeneration [11, 12]; for example PC-specific Atg7 deficiency impedes axonal autophagy via an important p62-independent axonopathic mechanism associated with neurodegeneration [55]. Furthermore, specific defects in selective autophagic components or in the cargo selection process can induce neurodegeneration. This hypothesis is supported by the studies of cargo recognition and degradation components, such as p62, NBR1, or ALFY [109, 110]. Defects at any one of the autophagic steps can cause an abnormal accumulation of cytosolic components and lead to disease states. Therefore, each step of the autophagic process needs to be tightly regulated for efficient autophagic degradation.

The housekeeping role of neuronal autophagy is more evident when neurons are loaded with pathogenic proteins [67]. In many neurodegenerative disorders, cytoplasmic, nuclear and

extracellular inclusions composed of aggregated and ubiquitinated proteins are believed to contribute to organelle damage, synaptic dysfunction and neuronal degeneration. The autophagic process in diseased neurons participates in the clearance of abnormal aggregate-prone proteins such as the expanded glutamine (polyQ)-containing proteins (e.g. mutant huntingtin in Huntington's disease (HD)), mutant forms of  $\alpha$ -synuclein in familial Parkinson disease (PD), different forms of tau in Alzheimer's disease (AD), tauopathies and FTD, mutant forms of SOD1 in motor diseases such as ALS, and mutant forms of PMP22 in peripheral neuropathies are cleared from diseased neurons by autophagy [19, 20, 55, 56, 66, 67, 111-115]. However, accumulation of these intracellular aggregates is believed to play a significant role in the etiology of neurodegenerative diseases including prion diseases (PrD) [3, 67]. One common feature is the dramatic cyto-pathological accumulation of autophagosomes in injured and degenerating neurons [116-121]. Such signs of defects in autophagy have been interpreted as a result of an "autophagic stress", or in other words an imbalance between protein synthesis and degradation [116]. This has traditionally been viewed as a highly destructive cellular mechanism, driving the cell to death [117]. In these diseases, it is now accepted that autophagy eliminates aggregate-prone proteins and damaged organelles more efficiently than the proteasome machinery. Since the proteasome is unable to degrade them [122], the clearance of misfolded, aggregated proteins originating from neuropathologic deficits is highly dependent on autophagy. However, a blockade of the autophagic flux is likely to impede the clearance of these proteins. The accumulation of aggregated proteins and organelles within the diseased neurons then contributes to cell dysfunction and in the end results in cell death [16], (Fig. 3). Indeed, pharmacological upregulation of autophagy reduces neuronal aggregates and slows down the progression of neurological symptoms in animal models of tauopathy and HD [123], AD [41, 124, 125] and PrD [126, 127].

The mechanisms that determine the activation of autophagy for the removal of aggregated proteins are not clearly understood, but failure of the other proteolytic systems to handle the altered proteins seems to at least partly underlie autophagy activation. Thus oligomers and fibers of particular proteins can block the proteolytic activity of the ubiquitin-proteasome system and chaperone-mediated autophagy (CMA) that results in autophagy upregulation [128, 129]. In addition, sequestration of negative regulators of autophagy in the protein aggregates could also provoke activation of this pathway. Thus it has been shown that blockage of autophagy in neurons leads to the accumulation of aggregated proteins and neurodegeneration even in the absence of aggregate-prone proteins [11, 12]. Although the specific reasons for the failure of the proteolytic systems are unknown, factors such as enhanced oxidative stress and aging seem to precipitate entry into a late failure stage when the activity of all degradation systems are blocked or decreased, leading to accumulation of autophagic vacuoles and aggregates and finally cell death [130].

Autophagy protects against cell death in the case of growth factor withdrawal, starvation and neurodegeneration, but it is required for some types of autophagic cell death [131-134]. However, the role of autophagy as a positive mediator of cell death is not well understood in mammalian systems, although many studies suggest that impaired autophagy sensitizes cells and organisms to toxic insults. Atg1-dependent autophagy restricts cell growth [135]. Cells



**Figure 2. Autophagy in cerebellar neurons.** **A.** Neuronal autophagy in the cerebellum of a Purkinje cell-deficient *Bax<sup>0/0</sup>;Grid2<sup>Lc/+</sup>* double mutant mouse. Autophagic-like profiles (arrowheads) in presynaptic parallel fiber boutons (PF) in the cerebellar molecular layer. \* intervaricose parallel fibers. **B.** Autophagolysosomes (arrowheads) characteristic of neuronal autophagy in the soma of a cerebellar Purkinje cell (PC) of a prion protein-deficient *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* mouse. **C-D.** Phagophores, autophagosomes (\* in C) and autophagolysosomes (\* in D) in the soma of cerebellar Purkinje cells (PC) from prion protein-deficient *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* mouse maintained 7 days *in vitro* (DIV7) in organotypic culture. **E.** Autophagosome (\*) forming from a Golgi dictyosome in the Purkinje cell soma (PC) of a transgenic mouse expressing a neurotoxic Chi3 PrP-Dpl chimera. Go, normal Golgi dictyosome. Scale bars = 500 nm in A, C-E, 2  $\mu$ m in B.

deficient in Pdk1, a positive regulator of mTOR pathway [136], display autophagy and reduced growth. The increased growth capacity that results from disrupting autophagy may contribute to the tumorigenicity of cells mutant for tumor suppressors [38, 137, 138]. Overexpression of Atg1 leads to apoptotic cell death [135]. Cells undergoing autophagic cell death display signs of apoptosis [139], as do Atg1-null cells [135]. Thus, elevated levels of autophagy promote cell death and the role of autophagy in cell death is likely to be context-dependent.

Neuronal autophagy is currently believed to constitute a protective mechanism that slows the advance of neurodegenerative disorders, and that its inhibition is associated with neurodegeneration [130]. Substantial attention is currently being focused on the molecular mechanisms underlying the autophagic fight against neurodegeneration, the role of autophagy in early stages of pathogenesis and therapeutic approaches to upregulate protective neuronal autophagy. It is unclear whether accumulation of autophagic vacuoles in degenerating neurons results from increased autophagic flux or impaired flux. A chronic imbalance between autophagosome formation and degradation causes "autophagic stress" [140]. Due to obvious therapeutic consequences, it is imperative to understand how autophagic stress occurs in each autophagy-associated neurodegenerative condition: either a cellular incapacity to support an excessive autophagic demand or a defective degradation (lysosomal) step [141].

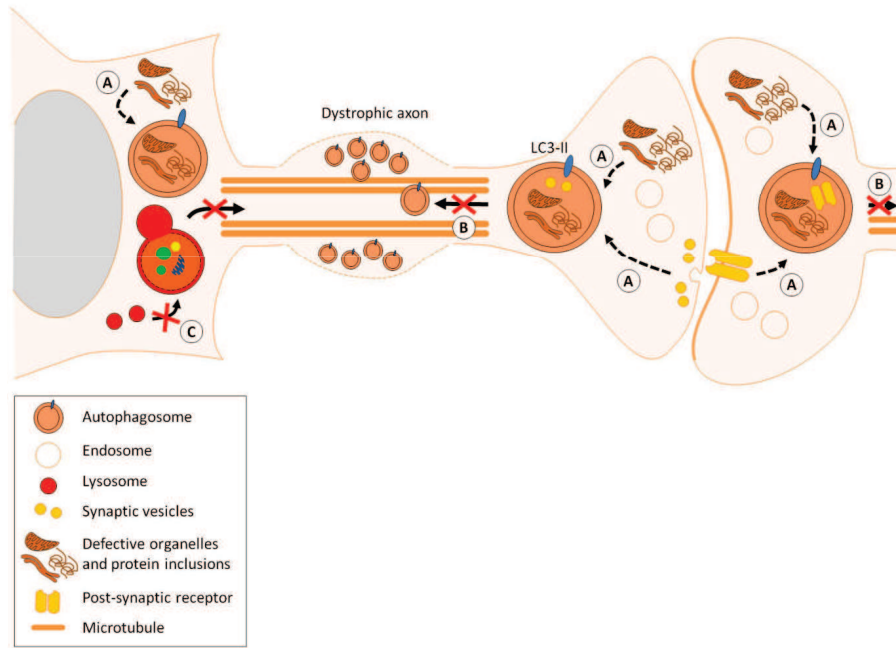
## 4. Autophagy in prion diseases

### 4.1. Prion diseases

#### 4.1.1. Infectious and familial prion diseases

Prion diseases (PrD) are transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) which are fatal neurodegenerative diseases in humans (Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), variant CJD (vCJD), fatal familial insomnia (FFI) and kuru) and in animals (bovine spongiform encephalopathy (BSE), transmissible mink encephalopathy (TME), chronic wasting disease (CWD) and scrapie). In humans, PrD manifest after a long incubation period free of symptoms as a rapid progressive dementia that leads inevitably to death. Severe loss of neurons with extensive astrogliosis and moderate microglial activation, characteristic of all TSEs, results in a progressive spongiform degeneration of the brain tissue which is reflected by ataxia, behavioral changes and, in humans, a progressive cognitive decline [142-145]. According to the protein-only hypothesis [146], TSEs are caused by prions that are believed to be proteinaceous infectious particles mainly consisting of PrP<sup>Sc</sup>, an abnormal isoform of the normal, host-encoded prion protein (PrP<sup>C</sup>), [142]. Prions are able to catalyze a switch from PrP<sup>C</sup> conformation into an aggregated misfolded conformer PrP<sup>Sc</sup> which collects throughout the brain according to a prion strain-specific anatomo-pathologic signature. These PrDs share a protein misfolding feature with other neurodegenerative diseases (e.g. AD, PD and HD), [147].

The central role played by PrP<sup>C</sup> in the development of PrD was first illustrated by the observation that disruption of the PrP gene (PRNP) in mice confers resistance to PrD and impairs



**Figure 3. Impaired steps of neuronal autophagy in neurodegenerative disorders.** **A.** Defective autophagosome biogenesis. **B.** Blockage of retrograde transport and accumulation of autophagosomes in dystrophic neurites. **C.** Failure of autophagosomes to fuse with lysosomes.

the propagation of infectious prions [148], while PrP-overexpressing (*tga20*) mice exhibit reduced incubation periods when compared with wild-type mice [149]. Overall, the current data argue for a primary role of the neuronal, GPI-anchored PrP<sup>C</sup> in prion neuropathogenesis [150]. The subversion of PrP<sup>C</sup> function(s) as a result of its conversion into PrP<sup>Sc</sup> is assumed to account for prion-associated toxicity in neurons [151]. Whether PrP<sup>Sc</sup> triggers a loss of PrP<sup>C</sup> physiological function (loss-of-function hypothesis) or promotes a gain of toxic activity (gain-of-function hypothesis), or both, is an ongoing debate in the TSE field [152]. Elucidating the roles of PrP<sup>C</sup> in neurons should help to answer this question. Knockout experiments, however, have failed to reveal any obvious physiological role for PrP<sup>C</sup>. Mice devoid of PrP<sup>C</sup> are viable and display only minor phenotypic or behavioural alterations that vary according to the null strain, and hence, these results do not permit one to assign a specific function to PrP<sup>C</sup>. *Ex vivo* studies support the involvement of PrP<sup>C</sup> in copper homeostasis [153]. In addition, the localisation of PrP<sup>C</sup> on the cell membrane and its affinity for the neuronal cell adhesion molecule (N-CAM), laminin, and the laminin receptor [154, 155] have implicated PrP<sup>C</sup> in cell adhesion. Such properties may reflect the involvement of PrP<sup>C</sup> in the outgrowth and maintenance of neurites, and even cell survival. Indeed, recent experimental evidence showing that PrP<sup>C</sup> interacting with  $\beta 1$  integrin controls focal adhesion and turnover of actin microfilaments in neurons substantiates a role for PrP<sup>C</sup> in neuritogenesis. Of note, integrins are well known



inducers of autophagy (see review in chapter by Nollet and Miranti). Remarkably, during neuronal differentiation, the downregulation of Rho kinase (ROCK) activity by PrP<sup>C</sup> is necessary for neurite sprouting [156]. A stress-protective activity has also been assigned to PrP<sup>C</sup> based on results obtained with primary neuronal cultures. Neuronal cells derived from PrP-knockout mice are more sensitive to oxidative stress and serum deprivation than wild type cells [157-159]. Moreover, after ischemic brain injury, PrP<sup>C</sup>-depleted mice revealed enlarged infarct volumes [160-162]. This neuroprotective role of PrP<sup>C</sup> has been linked to cell signaling events. The interaction of PrP<sup>C</sup> with the stress inducible protein (STI-1) generates neuroprotective signals that rescue cells from apoptosis [163]. Previous studies of both neuronal and non-neuronal cells substantiate the coupling of PrP<sup>C</sup> to signaling effectors involved in cell survival, redox equilibrium and homeostasis (e.g. ERK1/2, NADPH oxidase [164], cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) transcription factor and metalloproteinases [165, 166]. According to these data, PrP<sup>C</sup> has been proposed to function as a « dynamic cell surface platform for the assembly of signaling modules » [167]. Despite these overall advances, the sequence of cellular and molecular events that leads to neuronal cell demise in TSEs remains obscure [168, 169]. At present, one envisions that neuronal cell death results from several parallel, interacting or sequential pathways involving protein processing and proteasome dysfunction [170], oxidative stress [159, 171], apoptosis and autophagy [172].

#### 4.1.2. Autophagy in prion-infected neurons

Prion propagation involves the endocytic pathway, specifically the endosomal and lysosomal compartments that are implicated in trafficking and recycling, as well as the final degradation of prions. Shifting the equilibrium between propagation and lysosomal clearance impairs the cellular prion load. This and the presence of autophagic vacuoles in prion diseased neurons [173, 174] suggest a role for autophagy in prion infection (reviewed in [172]). Indeed, the high numbers of autophagic vacuoles observed in neurons from experimentally prion-infected mice (Fig. 4A, B, Fig. 5) and hamsters is indicative of a robust activation of autophagy [175, 176]. Furthermore, autophagic vacuoles and multivesicular bodies have been detected in prion-infected neuronal cells in vitro [177]. The formation of autophagic vacuoles has recently been observed in neuronal pericarya, neurites and synapses of neurons experimentally infected with scrapie, CJD and GSS [174], as well as in neuronal synaptic compartments in humans with certain PrD [173]. PrDs are further correlated with autophagy given that the Scrg1 protein (encoded by the scrapie responsive gene1, *Scrg1*) is upregulated in scrapie and BSE-infected brains, as well as in brains of patients with sporadic CJD [178-180] and is associated with neuronal autophagosomes [181, 182]. This Scrg1 protein is thus, a new marker for autophagic vacuoles in prion-infected neurons (Fig. 4A, B). In the brains of CJD and FFI patients and experimentally scrapie-infected hamsters, increased cytoplasmic levels of LC3-II-immunostained autophagosomes have been demonstrated in neurons, again indicating autophagy activation. In addition, the decreased p62 and polyubiquitinated proteins levels in hamster and human brains infected with prion suggest an upregulation of autophagy with enhanced autophagic flux and protein degradation. Downregulation of the mTOR pathway and upregulation of the beclin 1 pathway in these infected tissues provide further evidence of autophagy activation [183]. On the basis of these observations, Xu *et al.* [183] propose that

neuronal autophagy is an intricate element of prion infections. They suggest that once PrP<sup>Sc</sup> enters host cells and is delivered to endosomes, it accumulates in amphisomes via fusion with autophagosomes and then with lysosomes. At this initial stage of infection, PrP<sup>Sc</sup> does not colocalize with autophagosomes, probably because PrP<sup>Sc</sup> levels are too low to be detected due to their rapid degradation in autophagolysosomes. In agreement with this explanation, blocking the fusion of autophagosomes with lysosomes using bafilomycin A1 permits the visualization of PrP-PG14 and PrP<sup>Sc</sup> in autophagosomes [183], as is the case for A $\beta$ 1-42 [184].

The role of lysosomes in PrDs is still controversial. Although autophagic lysosomal degradation of PrP<sup>Sc</sup> in infected neurons is supposed to clear prion aggregates and inhibit PrP<sup>Sc</sup> replication, there are indications that PrP<sup>Sc</sup> may subvert the autophagic-lysosomal system to promote the conversion of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup>. Lysosomal inhibitors prevent the build-up of PrP<sup>Sc</sup> [126] and agonists of the autophagy-lysosome pathway enhance the clearance of PrP<sup>Sc</sup> [185, 186, 126]. However, as PrP<sup>Sc</sup> production increases, the accumulating PrP<sup>Sc</sup> may saturate the clearance capacity of the system causing lysosomal disruption and release of PrP<sup>Sc</sup> aggregates into the neuropil. In turn this would cause cell stress and over-activate autophagy, as has been reported in prion-diseased brain tissue [183].

The octapeptide repeats region of PrP<sup>C</sup> has been shown to negatively influence autophagy. As measured by LC3-II expression, autophagy induced by serum deprivation occurs earlier and to a greater extent in hippocampal neurons from ZH-I *Prn<sup>P</sup>-/-* compared with those from wild type mice. Reintroduction of PrP<sup>C</sup>, but not *PrP<sup>C</sup>* lacking its N-terminal octapeptide region, into ZH-I *Prn<sup>P</sup>-/-* neurons delays this upregulation of autophagy [187]. The transconformation of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup> could interfere with the function of this domain and as a consequence, upregulate autophagy. It is conceivable that the activation of autophagy observed in PrD models reflects a defense mechanism designed to degrade prions and resist oxidative stress. A reduction in autophagy combined with endosomal/lysosomal dysfunction has indeed been proposed to contribute to the development of PrD [188]. Furthermore, the anti-cancer drug imatinib has been shown to activate lysosomal degradation of PrP<sup>Sc</sup> [186] and is a potent autophagy inducer [189]. When administered early during peripheral infection, imatinib delays both PrP<sup>Sc</sup> neuroinvasion and the onset of clinical disease in prion-infected mice [190]. Upregulation of autophagy has beneficial effects on the clearance of aggregate-prone proteins in PrD and other neurodegenerative diseases [66, 111-115, 191, 192]. Both lithium and trehalose enhance PrP<sup>Sc</sup> clearance from prion-infected cells by inducing autophagy, as demonstrated by increases in LC3-II protein and the number of GFP-LC3 puncta [193, 126]. Furthermore, PrP<sup>Sc</sup> can be cleared not only by mTOR-independent autophagy (lithium and trehalose), but also by the mTOR-dependent route because the mTOR inhibitor rapamycin also causes a decrease in cellular PrP<sup>Sc</sup>. Lithium-induced autophagy also reduces PrP<sup>C</sup> levels. This treatment causes internalization of PrP<sup>C</sup> [194], and the consequent reduction of available membrane-bound PrP<sup>C</sup> is known to decrease its conversion into pathologic PrP<sup>Sc</sup> [195-198]. This would provide an additional, indirect way to reduce PrP<sup>Sc</sup> by reducing of PrP<sup>C</sup> with lithium treatment.

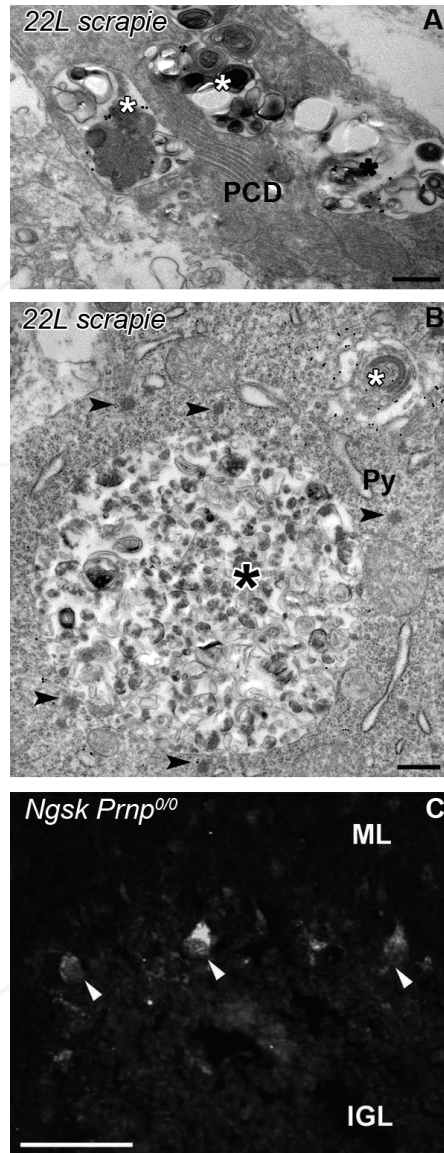
Whether autophagy-inducing compounds are candidates for therapeutic approaches against prion infection has recently been investigated in prion-infected mice. Starting in the last third of the incubation periods, treatment with rapamycin and to a lesser extent with lithium

significantly prolonged incubation times compared to mock-treated control mice [126, 172]. Along this line, activation of the class III histone deacetylase Sirtuin 1 (Sirt1) has been shown to mediate the neuroprotective effect of resveratrol against prion toxicity [199] and prevent prion protein-derived peptide 106-126 (PrP106-126) neurotoxicity via autophagy processing [200]. Moreover, Sirt1-induced autophagy protects against mitochondrial dysfunction induced by PrP106-126, whereas siRNA knockdown of Sirt1 sensitizes cells to PrP106-126-induced cell death and mitochondrial dysfunction. Finally, knockdown of Atg5 decreases LC3-II protein levels and blocks the effect of a Sirt1 activator against PrP106-126-induced mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. Thus inducing Sirt1-mediated autophagy may be a principal neuroprotective mechanism against prion-induced mitochondrial apoptosis. Nevertheless, understanding the mechanisms underlying Sirt1-mediated autophagy against prion neurotoxicity and mitochondrial damage merits further investigation, in particular determining the Sirt1-mediated downstream signaling network, including FOXOs, p53 and PGC-1 $\alpha$ . More recently, the mTOR inhibitor and autophagy inducer rapamycin has been shown to delay disease onset and prevent PrP plaque deposition in a mouse model of the Gerstmann-Sträussler-Scheinker PrD [127]. Here, the reduction in symptom severity and prolonged survival correlate with increases in LC3-II levels in the brains of treated mice, suggesting that autophagy induction enhances elimination of misfolded PrP before plaques form. This is in agreement with the well known neuroprotective effects of rapamycin in various models of neurodegenerative diseases with misfolded aggregate-prone proteins (e.g. PD [111], ALS [201], HD [115], spinocerebellar ataxia [66, 202], FTD [203] and AD [41, 124, 125]).

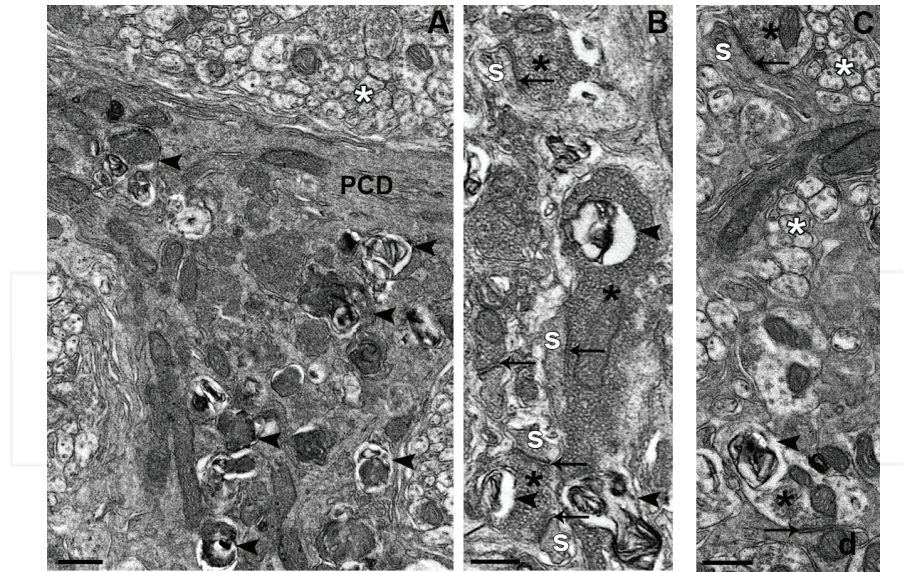
#### 4.2. Doppel-expressing prion protein-deficient mice

Research efforts to determine the function of PrP<sup>C</sup> using knockout mutant mice have revealed that large deletions in the PrP<sup>C</sup> genome result in the ectopic neuronal expression of the prion-like protein Doppel (Dpl) causing late onset degeneration of PCs and ataxia in *Prnp*<sup>-/-</sup> mouse lines, such as Ngsk [204], Rcm0 [205], ZH-II [206] and Rikn [207].

Similar PC degeneration is observed when the N-terminal truncated form of PrP is expressed ( $\Delta$ PrP) in *Prnp*-ablated mouse lines [208] and when Dpl is overexpressed [209, 210]. Of note, full-length PrP<sup>C</sup> antagonizes the neurotoxic effects of both Dpl and  $\Delta$ PrP [208-212], but not PrP<sup>C</sup> lacking the N-terminal residues 23-88 [213]. These results imply that Dpl and  $\Delta$ PrP induce cell death by the same mechanism, likely by interfering with a cellular signaling pathway essential for cell survival and normally controlled by full-length PrP<sup>C</sup> [209, 214]. The mechanism underlying Dpl-induced neurotoxicity is still under debate. PrP-deficient neurons undergo Dpl-induced apoptosis in a dose-dependent, cell autonomous manner [215]. Oxidative stress is a likely candidate to play a role in the death of these neurons because NOS activity is induced by Dpl both in vitro and in vivo [212, 216]. Endogenous, as well as exogenous PrP<sup>C</sup> has been shown to inhibit Dpl-induced apoptosis, a neuroprotective function that has been attributed to its BCL-2-like properties [158]. Like BCL-2, PrP<sup>C</sup> antagonizes mitochondrial apoptotic pathways, thereby protecting neurons from cell death [217- 219]. In BAX-induced apoptosis [220, 221], PrP<sup>C</sup> probably acts by preventing the conformational changes in BAX that are necessary for its activation [222]. In primary cultures, Dpl-induced apoptosis of *Prnp*<sup>+/+</sup> as



**Figure 4. Scrapie responsive gene 1 (Scrg1)-immuno-cytochemistry in prion-infected and prion protein-deficient neurons.** A-B. Scrg1 immunogold labeling in central neurons of a clinically ill 22L-scrapie-infected mouse. Scrg1-bound immunogold particles label autophagolysosomes (\* in A) in a Purkinje cell dendrite (PCD) and an autophagosome forming from a Golgi dictyosome (white asterisk in B) in the somatic neuroplasm of a pyramidal neuron (Py) of the CA3 field of the hippocampus. In this neuron, lysosomes (arrowheads) and immunogold particles labeling Scrg1 surround a large autolysosome-like vacuole (black asterisk). C. Scrg1 immuno-fluorescent labeling of Purkinje cells (arrowheads) in the cerebellar cortex of a prion protein-deficient *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* mouse. IGL, internal granular layer; ML, molecular layer. Scale bars = 500 nm in A-B and 50  $\mu$ m in C.



**Figure 5. Neuronal autophagy in cerebellar neurons of a clinically ill 22L-scrapie-infected mouse.** **A.** Accumulation of autophagosomes (arrowheads) in a main dendrite of a Purkinje cell (PCD) in the cerebellar molecular layer. \*, parallel fibers. **B.** Autophagosomes (arrowheads) in presynaptic axon terminals (black asterisks) establishing synapses (arrows) on postsynaptic Purkinje cell dendritic spines (s). **C.** An intact parallel fiber bouton (black asterisk) makes a synapse (arrow) on a Purkinje cell spine (s) in the upper part of the picture and another parallel fiber bouton (black asterisk) containing an autophagosome (arrowhead) makes a synapse (arrow) on a putative interneuron dendrite (d) in the bottom of the picture. Scale bars = 500 nm.

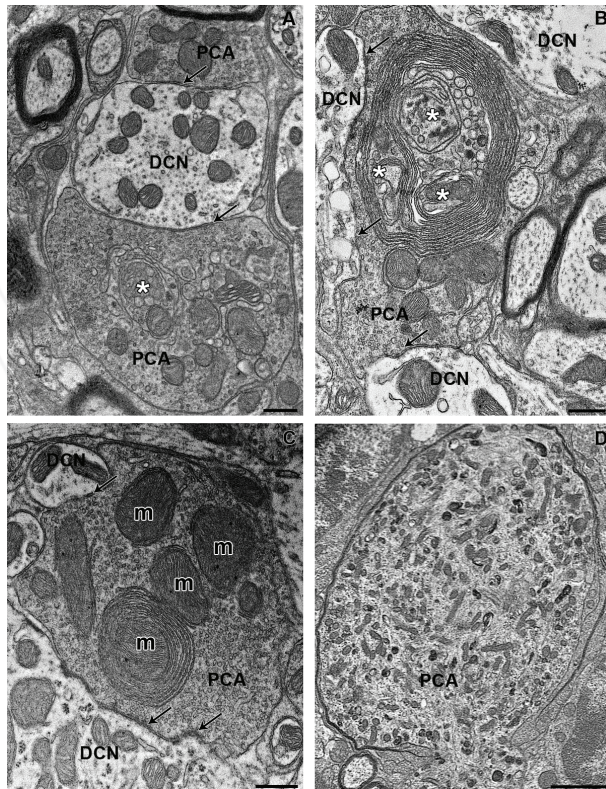
well as *Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup> granule cells, has recently been shown to be inhibited by BAX deficiency or pharmacologically blocking caspase-3 suggesting that it is mediated by Bax and caspase-3 [223]. These results further confirm *in vivo* data concerning the effects of Bax expression on PC survival in the cerebellum of the *Dpl*-overexpressing *Ngsk Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup> mouse that we reported several years ago [224]. In these mice, PC death is already significant as early as 6 months of age. During aging, quantification of PC populations shows that significantly more PCs survived in the *Ngsk Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup>:*Bax*<sup>-/-</sup> double mutant mice than in the *Ngsk Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup> mice. However, the number of surviving PCs is still lower than wild type levels and less than the number of surviving PCs in *Bax*<sup>-/-</sup> mutants. This suggests that neuronal expression of *Dpl* activates both BAX-dependent and BAX-independent pathways of cell death. Interestingly, a partial rescue of *Ngsk Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup> PCs is observed in *Ngsk Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup>:*Hu-bcl-2* double mutant mice, in a proportion similar to that found in *Ngsk Prn<sup>P</sup>*<sup>-/-</sup>:*Bax*<sup>-/-</sup> mice, strongly supporting the involvement of BCL-2-dependent apoptosis in *Dpl* neurotoxicity [225]. The capacity of BCL-2 to apparently compensate for the deficit in *PrP<sup>C</sup>* by partially rescuing PCs from *Dpl*-induced death suggests that the BCL-2-like property of *PrP<sup>C</sup>* may counteract *Dpl*-like neurotoxic pathway in wild-type neurons. Although not exactly identical to BCL-2, *PrP<sup>C</sup>* may functionally replace BCL-2 as it decreases in the aging brain [222]. The N-terminal domain of *PrP<sup>C</sup>* which is partially homologous to the BH2 domain of BCL-2 family of proteins [226, 227] is probably responsible for the

neuroprotective functions of PrP<sup>C</sup> because BAX-induced apoptosis cannot be counteracted by N-terminally truncated PrP. BCL-2 antagonizes the pro-apoptotic effect of BAX by interacting directly with this BH2 domain [228-230], and this domain is missing in both Dpl and the neurotoxic mutated forms of PrP: ΔPrP [208, 214, 231] and Tg(PG14)PrP [232]. Interestingly, expression of Dpl fused to a BH2-containing octapeptide repeat and the N-terminal half of the hydrophobic region of PrP<sup>C</sup> makes cells resistant to serum deprivation [233]. Furthermore, N-terminal deleted forms of PrP<sup>C</sup> have been reported to activate both BAX-dependant and BAX-independent apoptotic pathways [231].

#### 4.2.1. Autophagy in prion protein-deficient mice

The Dpl-activated, BAX-independent cell death mechanism may involve neuronal autophagy as we have detected the expression of Scrg1, a novel protein with a potential link to autophagy in the NgsK *Prn*<sup>P-/-</sup> PCs (Fig. 4C), [181]. Both neuronal Scrg1 mRNA and protein levels are increased in prion-diseased brains [179, 180], and Scrg1 is associated with dictyosomes of the Golgi apparatus and autophagic vacuoles in degenerating neurons of scrapie-infected Scrg1-overexpressing transgenic and WT mice (Fig. 4A, B), [181, 182]. Both before and during PC loss, protein levels of Scrg1 and the autophagic markers LC3-II and p62 are increased in NgsK *Prn*<sup>P-/-</sup> PCs, whereas their mRNA expression is stable, suggesting that the degradation of autophagic products is impaired in these neurons [234, 235]. Autophagic profiles collect in somato-dendritic and axonal compartments of NgsK *Prn*<sup>P-/-</sup> (Figs. 2B, 6), but not wild-type PCs. The most robust autophagy occurs in dystrophic profiles of the PC axons in the cerebellar cortex (Fig. 6D) and at their preterminal and terminal levels in the deep cerebellar nuclei (Fig. 6A-C) suggesting that it initiates in these axons. Taken together, these data indicate that Dpl triggers autophagy and apoptosis in NgsK *Prn*<sup>P-/-</sup> PCs. As reflected by the abundance of autophagosomes in the diseased NgsK PCs, Dpl neurotoxicity induces a progressive dysfunction of autophagy, as well as apoptosis. Whether this autophagy dysfunction triggers apoptotic cascades or provokes autophagic cell death independent of apoptosis remains to be resolved. In the NgsK *Prn*<sup>P-/-</sup> PCs, the increased expression of LC3-II and p62 at the protein level, without any change in mRNA levels, suggests that the ultimate steps of autophagic degradation are impaired. This is further confirmed by the prominence of autophagolysosomes in these neurons which indicate that the fusion of autophagosomes with lysosomes occurs normally, but downstream, the autophagic flux is blocked.

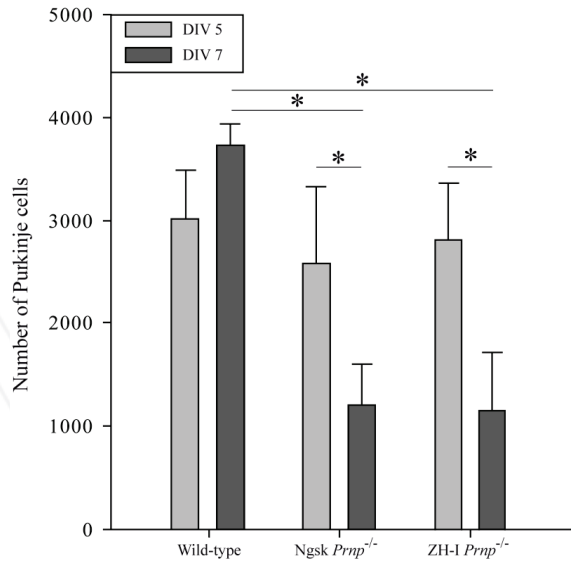
To further investigate the neurodegenerative mechanisms induced by Dpl in NgsK cerebellar PCs, we are using an organotypic cerebellar culture system which allows an easier way to approach mechanistic questions than in vivo models [236]. For this purpose, we have assessed the growth and viability of PCs in cerebellar organotypic cultures from NgsK and ZH-I *Prn*<sup>P-/-</sup> mice using morphometric methods to measure PC survival and development [237]. The timing and amplitude of PC growth impairment and neuronal death are similar in NgsK and ZH-I *Prn*<sup>P-/-</sup> cultures (Fig. 7). In addition, increased amounts of autophagic (LC3-II, Fig. 8) and apoptotic (caspase-3, Fig. 9) markers are detected in protein extracts from both cultures indicating that both apoptosis and autophagy (Fig. 2C, D) contribute to PC death in NgsK [235] and ZH-I cultures. This suggests that PrP<sup>C</sup>-deficiency, rather than Dpl expression, is respon-



**Figure 6. Neuronal autophagy in the cerebellar deep nuclei of a prion protein-deficient *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* mouse.** **A.** A presynaptic terminal of a Purkinje cell axon (PCA) establishes symmetric synapses on a postsynaptic dendrite from a neuron of the interpositus deep cerebellar nucleus (DCN) and contains an autophagosome (\*). **B.** A double membrane wrap sequesters autophagosomes (\*) in a Purkinje cell axon varicosity (PCA) symmetrically synapsing (arrows) on dendrites from neurons of the dentate deep cerebellar nucleus (DCN). **C.** Mitophagy by double membranes wrapping around mitochondria (m) in a Purkinje cell presynaptic axon terminal (PCA) making symmetric synapses (arrows) on postsynaptic dendrites from dentate deep nuclear neurons (DCN). **D.** Dystrophic Purkinje cell axon (PCA) filled with electron-dense autophagic profiles in the cerebellar internal granular layer. Scale bars = 500 nm in A-C, 2  $\mu$ m in D.

sible for the neuronal growth deficit and loss in these cultures. For presently unknown reasons, the neurotoxic properties of Dpl do not seem to contribute to the degeneration of *Ngsk* PCs in these organotypic cultures. As the neurotoxicity induced by Dpl takes about 6 months to develop *in vivo*, it is possible that organotypic cultures are not mature enough to model 6-month-old cerebellar tissue. Nevertheless, *ex vivo* cerebellar organotypic cultures do provide a suitable system for analyzing the mechanisms underlying the neurotoxic effects of PrP<sup>C</sup>-deficiency and prion infections [238] using pharmacological and siRNA-based approaches.

Our results have shown that PrP<sup>C</sup> has a neuroprotective role in cerebellar PCs. As PCs survive *in vivo* in the cerebellum of the ZH-I mouse, the death of the ZH-I PCs in the organotypic

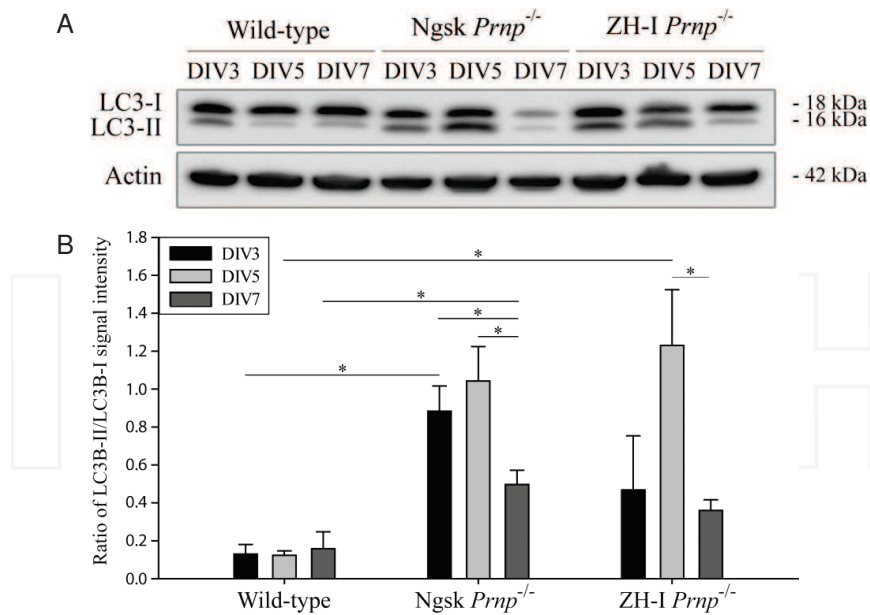


**Figure 7. Purkinje cell loss in cerebellar organotypic cultures from wild-type and *Prnp*-deficient mice.** PCs stained for calbindin by immuno-fluorescence were counted. This analysis reveals similar, significant reductions in the number of PCs between DIV5 and DIV7 for NgsK *Prnp*<sup>-/-</sup> (53.5%) and ZH-1 *Prnp*<sup>-/-</sup> (59%) cultures. During this period, the number of PCs in wild-type cultures is stable ( $p > 0.05$ ). Although the number of PCs is not significantly different between genotypes at DIV5, by DIV7 there are similar decreases in mutant organotypic cultures (NgsK: 67.8% and ZH-1: 69%) compared to wild-type cultures (two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test; \*  $p < 0.001$ ).

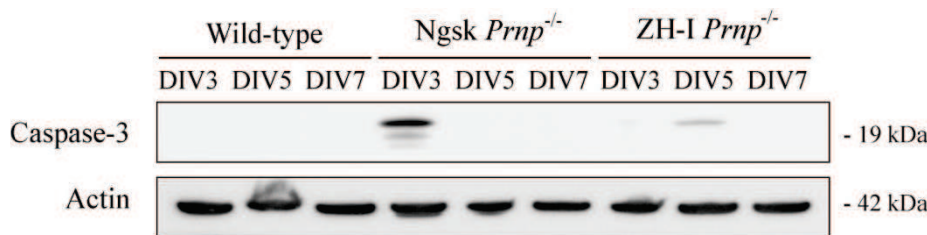
cultures is likely to stem from the inherent stress of the *ex vivo* conditions. As mentioned above, PrP<sup>C</sup> negatively regulates autophagy as demonstrated by the upregulation of autophagy following serum deprivation in *Prnp*<sup>-/-</sup> hippocampal neurons when compared to PrP<sup>C</sup>-expressing neurons [187]. Recent results suggest that PrP<sup>C</sup> can directly modulate autophagic cell death. Using antisense oligonucleotides targeting the *Prnp* transcript, the downregulation of PrP<sup>C</sup> expression in glial and non-glial tumor cells induces autophagy-dependent, apoptosis-independent cell death [239]. Previous data have shown that PrP<sup>C</sup> acts as a SOD [240] and modulates the activity of Cu/Zn SOD by binding 5 Cu<sup>++</sup> ions on its N-terminal octapeptide repeat domain [153, 157, 241]. A recent study of the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on hippocampal neurons expressing PrP<sup>C</sup> or deficient in PrP<sup>C</sup> provides further support for the protective role of PrP<sup>C</sup> against oxidative stress [242]. Although autophagy and apoptosis occur in both lines, the *Prnp*<sup>-/-</sup> neurons are less resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress than the *Prnp*<sup>+/+</sup> neurons confirming the anti-oxidant activity of PrP<sup>C</sup>.

Furthermore, autophagy is more enhanced in *Prnp*<sup>-/-</sup> neurons than in *Prnp*<sup>+/+</sup> neurons. In the latter, this is due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced enhancement of autophagic flux, and in the former due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced impairment of autophagic flux. Similarly, experiments using Atg7 siRNA to inhibit autophagy have revealed that the increased autophagic flux in *Prnp*<sup>+/+</sup> neurons protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity. Thus a deficiency in *Prnp* may impair autophagic flux via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-





**Figure 8. A.** Western blot of the autophagic marker LC3B-II, in extracts prepared from organotypic cultures from wild-type, Ngsk and ZH-I *Prnp*<sup>-/-</sup> mouse cerebellum at DIV3, 5 and 7. Actin was used as a loading control. **B.** Autophagy was measured by quantifying the ratio of the band intensities of LC3B-II and LC3B-I ( $n \geq 3$  mice) which reflects the amount of autophagosomes. Compared to wild-type cultures, this ratio increases in mutant cultures at DIV5 suggesting enhanced autophagy and then decreases at DIV7 probably as a result of either autophagic degradation or PC death (Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Tukey test; \*  $p < 0.05$ ).



**Figure 9. Western blot of the pro-apoptotic activated caspase-3.** Activated caspase-3 is detected in extracts of organotypic cultures from Ngsk and ZH-I *Prnp*<sup>-/-</sup> mouse cerebellum, but not from wild-type mouse cerebellum. Actin serves as a loading control.

induced oxidative stress contributing to autophagic cell death [242]. Since autophagic flux is apparently normal in both *Prnp*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>-/-</sup> neurons in the absence of stress, the lack of PrP<sup>C</sup> only seems to contribute to autophagy impairment under stress-induced conditions, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment [242], stress-inducing *in vitro* conditions, as well as Dpl-induced toxicity.

#### 4.2.2. Prion protein PrP-doppel Dpl chimeras

When overexpressed ectopically in neurons, mutations within the central region of PrP<sup>C</sup> are associated with severe neurotoxic activity, similar to that of Dpl [231, 243]. The absence of these segments, called central domains (CD) is believed to be responsible for neurodegeneration and ataxia. To understand the dual neurotoxicity *vs.* neuroprotective roles of PrP<sup>C</sup>, transgenic mice expressing a fusion protein made of the CD of PrP<sup>C</sup> inserted within the Dpl sequence have been generated [244]. These mice failed to develop typical Dpl-mediated neurological disorder indicating that this N-terminal portion of PrP<sup>C</sup> reduces Dpl toxicity. To further investigate Dpl-like neurotoxicity, Lemaire-Vieille *et al.* recently generated lines of transgenic mice expressing three different chimeric PrP-Dpl proteins [245]. Chi1 (Dpl 1-57 replaced with PrP 1-125) and Chi2 (Dpl 1-66 replaced with PrP1-134) abrogates the pathogenicity of Dpl confirming the neuroprotective role of the PrP 23-134 N-terminal domain against Dpl toxicity. However, when Dpl 1-24 were replaced with PrP 1-124, these Chi3 transgenic mice that express a very low level of the chimeric protein develop ataxia, as early as 5 weeks of age. This phenotype is only rescued by overexpressing PrP<sup>C</sup>, and not by a single copy of full-length PrP<sup>C</sup>, indicating the strong toxicity of the chimeric protein Chi3. The Chi3 mice exhibit severe cerebellar atrophy with significant granule cell loss and prominent signs of autophagy in PCs (Fig. 2E). We conclude that the first 33 amino acids of Dpl, that are absent in Chi1 and Chi2 constructs, confer toxicity to the protein. This is confirmed *in vitro* by the highly neurotoxic effect of the 25-57 Dpl peptide on mouse embryo cortical neurons. Since this chimeric transgene is not expressed by PCs in the transgenic mice expressing Chi3, the signs of autophagy displayed by these neurons *in vitro* could result from the neurotoxic effect of the exogenous Chi3 chimeric protein, as well as the deleterious effect of losing their primary afferents (*i.e.* the granule cells).

## 5. Perspectives

The beneficial effects that autophagy has on prion infections is currently supported by a growing bulk of evidence from *in vivo* and *ex vivo* data and is strongly promising for future mid-term therapeutic approaches. To further understand the fascinating interplay between autophagy and PrDs, further investigations are necessary to decipher their molecular interactions. Important issues remain. How are the different phases of prion infection physiopathology *i.e.* propagation, trafficking, recycling and clearance connected with autophagy? Which autophagic pathways are activated by prions - the mTOR-dependent, mTOR-independent or both? The biological function of autophagy *per se* in prion infection is obscure as the cellular levels of autophagy can apparently modify cell susceptibility to prion infection, although changes in autophagy may be a pre-requisite or a consequence of a prion infection.

Overall, the results point to a need to counteract cell stress and to eliminate toxic aggregate-prone proteins that eventually saturate the usual degradation pathways, including autophagy. These are common features of prion disease and most of the other neurodegenerative diseases described in this review. Saturation of the autophagic machinery, loss or imbalance of autophagic flux is believed to lead to neurodegeneration. Understanding how autophagy

relates to these diseases is a first step for developing autophagy modulation-based therapies for treating neurological disorders. This implies therapeutic consideration for each type of autophagic default at a precise step of the neurodegenerative disease concerned.

## Acknowledgements

The authors are greatly indebted to Dr. Anne-Marie Haeberlé (CNRS UPR3212, Strasbourg) for excellent assistance in transmission electron microscopy and prion-infected tissue handling as well as to Dr. Catherine Vidal (Institut Pasteur, Paris) for intra-cerebellar inoculation of mice with 22L scrapie. A. R. is supported by a doctoral grant from the French Minister of Research and Technology and A. G. is supported by a grant from the French Centre National de la Recherche Scientifique and the AgroParisTech High School.

## Author details

Audrey Ragagnin<sup>1</sup>, Aurélie Guillemain<sup>1</sup>, Nancy J. Grant<sup>2</sup> and Yannick J. R. Bailly<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cytologie & Cytopathologie Neuronales, INCI CNRS UPR3212, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Trafic Membranaire Dans les Cellules Neurosécrétrices et Neuroimmunitaires, INCI CNRS UPR3212, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

## References

- [1] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* (2011) 147:728-41.
- [2] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* (2007) 7(10):767-77.
- [3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* (2008) 132:27-42.
- [4] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* (2008) 451:1069-75.
- [5] Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* (1990) 181:195-213.
- [6] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008) 9:1004-10.

- [7] Novikoff AB, Beaufay H, De Duve C. Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* (1956) 2:S179-84.
- [8] De Duve C. The significance of lysosomes in pathology and medicine. *Proc Inst Med Chic* (1966) 26:73-6.
- [9] Dixon JS. "Phagocytic" lysosomes in chromatolytic neurones. *Nature* (1967) 215:657-658.
- [10] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* (2004) 15:1101-11.
- [11] Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* (2006) 441:885-9.
- [12] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* (2006) 441:880-4.
- [13] Liang CC, Wang C, Peng X, Gan B, Guan JL. Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J Biol Chem* (2010) 285:3499-509.
- [14] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* (2007) 9:1102-9.
- [15] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* (2009) 43:67-93.
- [16] Lee J-A. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? *Exp Neurobiol* (2012) 21:1-8.
- [17] Klionsky D, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* (2012) 8:445-544.
- [18] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2011) 27:107-32.
- [19] Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* (2007) 17:1561-1567.
- [20] Yue Z, Friedman L, Komatsu M, Tanaka K. The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1793:1496-507.
- [21] Hollenbeck PJ. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol* (1993) 121:305-15.

- [22] Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* (2012) 196:407-17.
- [23] Dunn WA Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* (1990) 110:1923-33.
- [24] Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* (2008) 182:685-701.
- [25] Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* (2009) 11:1433-7.
- [26] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* (2009) 5:1180-5.
- [27] Simonsen A & Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* (2009) 186:773-82.
- [28] Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* (2010) 12:831-5.
- [29] Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* (2010) 141:656-67.
- [30] Van der Vaart A, Reggiori F. The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes. *Autophagy* (2010) 6:800-1.
- [31] Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, Richardson BC, Li Z, Hughson FM, Baba M, Klionsky DJ. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J Cell Biol* (2010) 188:101-14.
- [32] Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12:747-57. Erratum in: *Nat Cell Biol* (2010) 12:1021.
- [33] Novikoff PM, Novikoff AB, Quintana N, Hauw JJ. Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J Cell Biol* (1971) 50:859-86.
- [34] Broadwell RD, Cataldo AM. The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals. *J Comp Neurol* (1984) 230:231-48.

- [35] Matthews MR, Raisman G. A light and electron microscopic study of the cellular response to axonal injury in the superior cervical ganglion of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* (1972) 181:43-79.
- [36] Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* (2006) 26:8057-68.
- [37] Yue Z. Regulation of neuronal autophagy in axon. Implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy* (2007) 3:139-141.
- [38] Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin-1. *Nature* (1999) 402:672-6.
- [39] Selimi F, Lohof AM, Heitz S, Lalouette A, Jarvis CI, Bailly Y, Mariani J. Lurcher GRID2-induced death and depolarization can be dissociated in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* (2003) 37:813-9.
- [40] Yue Z, Horton A, Bravin M, DeJager PL, Selimi F, Heintz N. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* (2002) 35:921-33.
- [41] Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson DW, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA. Therapeutic effects of remediating autophagy failure in a mouse model of Alzheimer disease by enhancing lysosomal proteolysis. *Autophagy* (2011) 7:788-9.
- [42] Jarheiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* (2008) 9:574-587.
- [43] Halpain J, Dehmelt L. The MAP1 family of microtubule-associated proteins *Genome biology* (2006) 7:224-230.
- [44] Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* (2006) 7:129-45.
- [45] Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem* (2006) 281:36303-16.
- [46] Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J. Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J Neurobiol* (2004) 58:48-59.
- [47] Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* (2005) 64:113-22.

- [48] Boland B & Nixon RA. Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. *Mol Aspects Med* (2006) 27:503-19.
- [49] Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* (2008) 28:6926-37.
- [50] Lee S, Sato Y, Nixon RA. Primary lysosomal dysfunction causes cargo-specific deficits of axonal transport leading to Alzheimer-like neuritic dystrophy. *Autophagy* (2011a) 7:1562-1563.
- [51] Sigmond T, Fehér J, Baksa A, Pásti G, Pálfi Z, Takács-Vellai K, Kovács J, Vellai T, Kovács AL. Qualitative and quantitative characterization of autophagy in *Caenorhabditis elegans* by electron microscopy. *Methods Enzymol* (2008) 451:467-91.
- [52] Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M. Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res* (2000) 85:1-12.
- [53] Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL Jr, Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007a) 104:14489-94.
- [54] Nishiyama J, Miura E, Mizushima N, Watanabe M, Yuzaki M. Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* (2007) 3:591-6.
- [55] Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* (2007b) 131:1149-63.
- [56] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* (2007) 282:24131-45.
- [57] Zhou X, Babu JR, da Silva S, Shu Q, Graef IA, Oliver T, Tomoda T, Tani T, Wooten M, Wang F. Unc-51-like kinase 1/2-mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104:5842-7.
- [58] Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* (2005) 6:889-98.
- [59] Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* (2002) 296:868-71.

- [60] Yang Y, Fukui K, Koike T, Zheng X. Induction of autophagy in neurite degeneration of mouse superior cervical ganglion neurons. *Eur J Neurosci* (2007) 26:2979-2988.
- [61] Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Ohkawa N, Inokuchi K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci* (2012) 32:10413-22.
- [62] Gordon PB, Seglen PO. Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* (1988) 151:40-7.
- [63] Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D, Stenmark H. ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* (2007) 17:1817-25.
- [64] Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* (2007) 179:485-500.
- [65] Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D. Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci* (2002) 22:8951-60.
- [66] Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* (2002) 11:1107-17.
- [67] Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* (2006) 443:780-6.
- [68] Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* (2007) 6:304-12.
- [69] Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, Finley K, Gaumer S, Contamine D, Rusten TE, Stenmark H, Brech A. Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol* (2008) 180:1065-71.
- [70] Collins CA, Wairkar YP, Johnson SL, DiAntonio A. Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* (2006) 51:57-69.
- [71] Shen W, Ganetzky B. Autophagy promotes synapse development in *Drosophila*. *J Cell Biol* (2009) 187:71-9.
- [72] Wan HI, DiAntonio A, Fetter RD, Bergstrom K, Strauss R, Goodman CS. Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* (2000) 26:313-29.
- [73] Rowland AM, Richmond JE, Olsen JG, Hall DH, Bamber BA. Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABAA receptors in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* (2006) 26:1711-20.



- [74] Zhang XD, Wang Y, Wang Y, Zhang X, Han R, Wu JC, Liang ZQ, Gu ZL, Han F, Fukunaga K, Qin ZH. p53 mediates mitochondria dysfunction-triggered autophagy activation and cell death in rat striatum. *Autophagy* (2009) 5:339-50.
- [75] Wairkar YP, Toda H, Mochizuki H, Furukubo-Tokunaga K, Tomoda T, Diantonio A. Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling. *J Neurosci* (2009) 29:517-28.
- [76] Hernandez D, Torres CA, Setlik W, Cebrián C, Mosharov EV, Tang G, Cheng HC, Kholodilov N, Yarygina O, Burke RE, Gershon M, Sulzer D. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron* (2012) 74:277-284.
- [77] Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, Ohsumi Y. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* (2010) 30:1049-58.
- [78] Huang J & Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* (2009) 37:217-22.
- [79] Long X, Müller F, Avruch J. TOR action in mammalian cells and in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Top Microbiol Immunol* (2004) 279:115-38.
- [80] Richter JD, Klann E. Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes Dev* (2009) 23:1-11.
- [81] Hu JY, Chen Y, Schacher S. Protein kinase C regulates local synthesis and secretion of a neuropeptide required for activity-dependent long-term synaptic plasticity. *J Neurosci* (2007) 27:8927-8939.
- [82] Weragoda RM, Walters ET. Serotonin induces memory-like, rapamycin-sensitive hyperexcitability in sensory axons of aplysia that contributes to injury responses. *J Neurophysiol* (2007) 98:1231-9.
- [83] Lee S, Sato Y, Nixon RA. Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci* (2011) 31(21):7817-30.
- [84] Bunge MB. Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* (1973) 56:713-35.
- [85] Zanjani SH, Selimi F, Vogel MW, Haeberlé AM, Boeuf J, Mariani J, Bailly YJ. Survival of interneurons and parallel fiber synapses in a cerebellar cortex deprived of Purkinje cells: studies in the double mutant mouse *Grid2Lc/+;Bax(-/-)*. *J Comp Neurol* (2006) 497:622-35.
- [86] Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* (2005) 1:1-10.
- [87] Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* (2007) 27:19-40.

- [88] Ramesh Babu J, Lamar Seibenhener M, Peng J, Strom AL, Kemppainen R, Cox N, Zhu H, Wooten MC, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MW. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J Neurochem* (2008) 106:107-20.
- [89] Jiang J, Parameshwaran K, Seibenhener ML, Kang MG, Suppiramaniam V, Huganir RL, Diaz-Meco MT, Wooten MW. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity require SQSTM1/p62. *Hippocampus* (2009) 19:392-406.
- [90] Jobim PF, Pedrosa TR, Werenicz A, Christoff RR, Maurmann N, Reolon GK, Schröder N, Roesler R. Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behav Brain Res* (2012) 228:151-8.
- [91] Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* (2006) 312:927-30.
- [92] Young JE, La Spada AR. Development of selective nutrient deprivation as a system to study autophagy induction and regulation in neurons. *Autophagy* (2009) 5:555-7.
- [93] Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ* (2009) 16(1):46-56.
- [94] Du L, Hickey RW, Bayir H, Watkins SC, Tyurin VA, Guo F, Kochanek PM, Jenkins LW, Ren J, Gibson G, Chu CT, Kagan VE, Clark RS. Starving neurons show sex difference in autophagy. *J Biol Chem* (2009) 284:2383-96.
- [95] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* (2008) 172:454-69.
- [96] Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, Dunn RS, Vorhees CV, Wills-Karp M, Degen JL, Davis RJ, Mizushima N, Rakic P, Dardzinski BJ, Holland SK, Sharp FR, Kuan CY. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol* (2006) 169:566-83.
- [97] Borsello T, Croquelois K, Hornung JP, Clarke PG. N-methyl-D-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur J Neurosci* (2003) 18:473-485.
- [98] Wang Y, Han R, Liang ZQ, Wu JC, Zhang XD, Gu ZI, Qin ZH. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy* (2008) 4:214-226.
- [99] Høyer-Hansen M, Jäätelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* (2007) 14:1576-82.

- [100] Castino R, Lazzeri G, Lenzi P, Bellio N, Follo C, Ferrucci M, Fornai F, Isidoro C. Suppression of autophagy precipitates neuronal cell death following low doses of methamphetamine. *J Neurochem* (2008) 106:1426-39.
- [101] Zhu JH, Horbinsky C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol* (2007) 170:75-86.
- [102] Ding Q, Dimayuga E, Martin S, Bruce-Keller AJ, Nukala V, Cuervo AM, Keller JN. Characterization of chronic low-level proteasome inhibition on neural homeostasis. *J Neurochem* (2003) 86:489-97.
- [103] Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH, Taylor JP. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* (2007) 447:859-63.
- [104] Bedford L, Hay D, Devoy A, Paine S, Powe DG, Seth R, Gray T, Topham I, Fone K, Rezvani N, Mee M, Soane T, Layfield R, Sheppard PW, Ebendal T, Usoskin D, Lowe J, Mayer RJ. Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci* (2008) 28:8189-98.
- [105] Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* (2005) 167:1713-28.
- [106] Liao G, Yao Y, Liu J, Yu Z, Cheung S, Xie A, Liang X, Bi X. Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in *Npc1*<sup>-/-</sup> mouse brain. *Am J Pathol* (2007) 171:962-75.
- [107] Pacheco CD, Lieberman AP. Lipid trafficking defects increase Beclin-1 and activate autophagy in Niemann-Pick type C disease. *Autophagy* (2007) 3:487-9.
- [108] Vergarajauregui S, Connelly PS, Daniels MP, Puertollano R. Autophagic dysfunction in mucopolipidosis type IV patients. *Hum Mol Genet* (2008) 17:2723-2737.
- [109] Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, Øvervatn A, Stenmark H, Bjørkøy G, Simonsen A, Johansen T. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* (2010) 6:330-44.
- [110] Knaevelsrud H, Simonsen A. Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. *FEBS Lett* (2010) 584:2635-45.
- [111] Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* (2003) 278:25009-25013.

- [112] Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci* (2003) 23:10672-80.
- [113] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* (2005) 171:603-14.
- [114] Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem* (2006) 281:30524-33.
- [115] Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, Schmitt I, Wullner U, Evert BO, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* (2006) 15:433-42.
- [116] Petersén A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D. Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* (2001) 10:1243-54.
- [117] Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* (2005) 1:11-22.
- [118] Ventruti A, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2007) 7:443-51.
- [119] Nixon RA, Yang DS, Lee JH. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* (2008) 4:590-9.
- [120] Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* (2010) 141:1146-1158.
- [121] Mariño G, Madeo F, Kroemer G. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol* (2011) 23:198-206.
- [122] Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* (2001) 292:1552-5.
- [123] Fleming A, Noda T, Yoshimori T, Rubinsztein DC. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol* (2011) 7:9-17.
- [124] Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* (2007) 120:4081-91.
- [125] Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits

- and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* (2010) 5:e9979.
- [126] Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schatzl HM. Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem* (2009) 109:25-34.
- [127] Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA. Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *J Neurosci* (2012) 32:12396-12405.
- [128] Massey AC, Kaushik S, Cuervo AM. Lysosomal chat maintains the balance. *Autophagy* (2006) 2:325-7.
- [129] Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* (2005) 280:40282-40292.
- [130] Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* (2007) 6:352-61.
- [131] Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* (2004) 6:1221-8.
- [132] Veneault-Fourrey C, Talbot NJ. Autophagic cell death and its importance for fungal developmental biology and pathogenesis. *Autophagy*(2007) 3:126-7.
- [133] Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA. Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* (2004) 36:2531-40.
- [134] Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103:4952-7.
- [135] Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* (2007) 17:1-11.
- [136] Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* (2006) 124:471-84.
- [137] Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* (2001) 276:35243-6.
- [138] Jin S. Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy* (2006) 2:80-4.

- [139] Martin DN, Baehrecke EH. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* (2004) 131:275-84.
- [140] Chu CT. Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol* (2006) 65:423-32.
- [141] Alirezaei M, Jelodar G, Niknam P, Ghayemi Z, Nazifi S. Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. *J Physiol Biochem* (2011) 67:605-12.
- [142] Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:13363-13383.
- [143] Weissmann C. The state of prion. *Nat Rev Microbiol* (2004) 2:861-871.
- [144] Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* (2004) 116:313-327.
- [145] Collinge J. Molecular neurology of prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2005) 76:906-919.
- [146] Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* (1982) 216:136-144.
- [147] Aguzzi A, Haass C. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* (2003) 302:814-818.
- [148] Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blättler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein (PrP<sup>C</sup>) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:13148-51.
- [149] Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* (1993) 73:1339-47.
- [150] Radford HE, Mallucci GR. The role of GPI-anchored PrP(C) in mediating the neurotoxic effect of scrapie prions in neurons. *Curr Issues Mol Biol* (2010) 12:119-128.
- [151] Harris DA, True HL. New insights into prion structure and toxicity. *Neuron* (2006) 50:353-7.
- [152] Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* (2008) 27:336-49.
- [153] 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. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* (1997) 390:684-7.
- [154] Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmézas CI, Weiss S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* (2001) 20:5863-75.

- [155] Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* (2001) 314:1209-25.
- [156] Loubet D, Dakowski C, Pietri M, Pradines E, Bernard S, Callebert J, Ardila-Osorio H, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B. Neuritogenesis: the prion protein controls b1 integrin signaling activity. *FASEB J* (2012) 26:678-90.
- [157] Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* (1997) 146:104-12.
- [158] Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* (1999) 400:225-6.
- [159] Milhavel O, Lehmann S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* (2002) 38:328-39.
- [160] Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* (2005) 20:442-449.
- [161] Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bähr M. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* (2006) 37:1296-300.
- [162] Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmansperger V, Nölting S, Hamann GF, Kretzschmar HA. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* (2007) 17:174-83.
- [163] Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* (2002) 21:3307-16.
- [164] Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O. NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100:13326-31.
- [165] Pradines E, Loubet D, Schneider B, Launay JM, Kellermann O, Mouillet-Richard S. CREB-dependent gene regulation by prion protein: impact on MMP-9 and beta-dystroglycan. *Cell Signal* (2008) 20:2050-2058.
- [166] Pradines E, Loubet D, Mouillet-Richard S, Manivet P, Launay JM, Kellermann O, Schneider B. Cellular prion protein coupling to TACE-dependent TNF-alpha shed-

- ding controls neurotransmitter catabolism in neuronal cells. *J Neurochem* (2009) 110:912-23.
- [167] Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* (2008) 88:673-728.
- [168] Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortori CA, Barrett DA, Tsaytler P, Bertolotti A, Willis AE, Bushell M, Mallucci GR. Sustained translational repression by eIF2 $\alpha$ -P mediates prion neurodegeneration. *Nature* (2012) 485:507-511.
- [169] Ashe KH, Aguzzi A. Prions, prionoids and pathogenic proteins in Alzheimer disease. *Prion* (2013) 7: in press.
- [170] Kristiansen M, Deriziotis P, Dimcheff DE, Jackson GS, Ovaa H, Naumann H, Clarke AR, van Leeuwen FW, Menéndez-Benito V, Dantuma NP, Portis JL, Collinge J, Tabrizi SJ. Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* (2007) 26:175-88.
- [171] Pietri M, Caprini A, Mouillet-Richard S, Pradines E, Ermonval M, Grassi J, Kellermann O, Schneider B. Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. *J Biol Chem* (2006) 281:28470-9.
- [172] Heiseke A, Aguib Y, Schatzl HM. Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol* (2010) 12:87-98.
- [173] Sikorska B, Liberski PP, Giraud P, Kopp N, Brown P. Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol* (2004) 36:2563-73.
- [174] Liberski PP, Brown DR, Sikorska B, Caughey B, Brown P. Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol* (2008) 46:1-25.
- [175] Boellaard JW, Schlote W, Tateishi J. Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol* (1989) 78:410-418.
- [176] Boellaard JW, Kao M, Schlote W, Diringier H. Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol* (1991) 82:225-228.
- [177] Schätzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tadzelt J, DeArmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB. A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* (1997) 71:8821-8831.
- [178] Dron M, Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Haw J-J, Lebon P, Dormont D, Tovey MG. Characterization of the human analogue of a scrapie-responsive gene. *J Biol Chem* (1998) 273:18015-18018.
- [179] Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Deslys J-P, Lasmézas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M. Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive



- gene and the identification of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem* (1998) 273:7691-7697.
- [180] Dandoy-Dron F, Benboudjema L, Guillo F, Jaegly A, Jasmin C, Dormont D, Tovey MG, Dron M. Enhanced levels of scrapie responsive gene mRNA in BSE-infected mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* (2000) 76:173-179.
- [181] Dron M, Bailly Y, Beringue V, Haeberlé A-M, Griffond B, Risold P-Y, Tovey MG, Laude H, Dandoy-Dron F. Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *Eur J Neurosci* (2005) 22:133-146.
- [182] Dron M, Bailly Y, Beringue V, Haeberlé A-M, Griffond B, Risold P-Y, Tovey MG, Laude H, Dandoy-Dron F. SCRG1, a potential marker of autophagy in transmissible spongiform encephalopathies. *Autophagy* (2006) 2:58-60.
- [183] Xu Y, Tian C, Wang SB, Xie WL, Guo Y, Zhang J, Shi Q, Chen C, Dong XP. Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy* (2012) 8 (in press).
- [184] Hung SY, Huang WP, Liou HC, Fu WM. Autophagy protects neurons from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy* (2009) 5:502-510.
- [185] Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* (2000) 74:4894-4897.
- [186] Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, Stein-Gerlach M, Klein MA, Schätzl HM. The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPsc in prion-infected cells. *J Biol Chem* (2004) 279:41918-41927.
- [187] Oh JM, Shin HY, Park SJ, Kim BH, Choi JK, Choi EK, Carp RI, Kim YS. The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* (2008) 39:238-47.
- [188] Mok SW, Riemer C, Madela K, Hsu DK, Liu FT, Gültner S, Heise I, Baier M. Role of galectin-3 in prion infections of the CNS. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 359:672-8.
- [189] Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsässer HP, Schätzl HM. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* (2007) 21:936-942.
- [190] Yun SW, Ertmer A, Flechsig E, Gilch S, Riederer P, Gerlach M, Schätzl HM, Klein MA. The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate delays prion neuroinvasion by inhibiting prion propagation in the periphery. *J Neurovirol* (2007) 13:328-337.
- [191] Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* (2005) 170:1101-11.

- [192] Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* (2007) 282:5641-5652.
- [193] Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Schätzl HM, Ertmer A. Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy* (2009) 5:361-9.
- [194] Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* (2003) 22:3591-3601.
- [195] Marella M, Lehmann S, Grassi J, Chabry J. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem* (2002) 277:25457-25464.
- [196] Parkin ET, Watt NT, Turner AJ, Hooper NM. Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein. *J Biol Chem* (2004) 279:11170-11178.
- [197] Aguib Y, Gilch S, Krammer C, Ertmer A, Groschup MH, Schätzl HM. Neuroendocrine cultured cells counteract persistent prion infection by downregulation of PrPc. *Mol Cell Neurosci* (2008) 38:98-109.
- [198] Heiseke A, Schöbel S, Lichtenthaler SF, Vorberg I, Groschup MH, Kretzschmar H, Schätzl HM, Nunziante M. The novel sorting nexin SNX33 interferes with cellular PrP formation by modulation of PrP shedding. *Traffic* (2008) 9:1116-1129.
- [199] Seo JS, Moon MH, Jeong JK, Seol JW, Lee YJ, Park BH, Park SY. SIRT1, a histone deacetylase, regulates prion protein-induced neuronal cell death. *Neurobiol Aging* (2012) 33:1110-1120.
- [200] Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Autophagy induced by the class III histone deacetylase Sirt1 prevents prion peptide neurotoxicity. *Neurobiol Aging* (2013) 34:146-156.
- [201] Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2052-7. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:16404-7.
- [202] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* (2004) 36:585-95.
- [203] Williams A, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol* (2006) 76:89-101.
- [204] 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. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* (1996) 380:528-531.
- [205] Moore RC, Redhead NJ, Selfridge J, Hope J, Manson JC, Melton DW. Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations. *Biotechnology* (1995) 13:999-1004.
- [206] Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C. Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J* (2001) 20:694-702.
- [207] Yokoyama T, Kimura KM, Ushiki Y, Yamada S, Morooka A, Nakashiba T, Sassa T, Itohara S. In vivo conversion of cellular prion protein to pathogenic isoforms, as monitored by conformation-specific antibodies. *J Biol Chem* (2001) 276:11265-71.
- [208] Flechsig E, Hegyi I, Leimeroth R, Zuniga A, Rossi D, Cozzio A, Schwarz P, Rulicke T, Götz J, Aguzzi A, Weissmann C. Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *EMBO J* (2003) 22:3095-3101.
- [209] Anderson L, Rossi D, Linehan J, Brandner S, Weissmann C. Transgene-driven expression of the Doppel protein in Purkinje cells causes Purkinje cell degeneration and motor impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101:3644-3649.
- [210] Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S. Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 319:1247-1252.
- [211] 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. A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* (1999) 79:689-697.
- [212] Cui T, Holme A, Sassoon J, Brown DR. Analysis of doppel protein toxicity. *Mol Cell Neurosci* (2003) 23:144-155.
- [213] Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S. Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* (2003) 278:28944-28949.
- [214] 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. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* (1998) 93:203-214.

- [215] Sakudo A, Lee DC, Nakamura I, Taniuchi Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Ikuta K, Onodera T. Cell-autonomous PrP-Doppel interaction regulates apoptosis in PrP gene-deficient neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 333:448-454.
- [216] Wong BS, Liu T, Paisley D, Li R, Pan T, Chen SG, Perry G, Petersen RB, Smith MA, Melton DW, Gambetti P, Brown DR, Sy MS. Induction of HO-1 and NOS in doppel-expressing mice devoid of PrP: implication for doppel function. *Mol Cell Neurosci* (2001) 17:768-775.
- [217] Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, Pinson X, Gaudin C, Pietu G, Pitaval A, Ripoché H, Eloit M, Dormont D, Chouaib S. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res* (2004) 64:719-727.
- [218] Paitel E, Sunyach C, Alves da Costa C, Bourdon JC, Vincent B, Checler F. Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* (2004) 279:612-618.
- [219] Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* (2004) 303:1514-1516.
- [220] Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* (2001) 276:39145-39149.
- [221] Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* (2003) 278:40877-40881.
- [222] Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, LeBlanc A. Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* (2005) 12:783-795.
- [223] Didonna A, Sussman J, Benetti F, Legname G. The role of Bax and caspase-3 in doppel-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Prion* (2012) 6:309-316.
- [224] Heitz S, Lutz Y, Rodeau J-L, Zanjani H, Gautheron V, Bombarde G, Richard F, Fuchs J-P, Vogel MW, Mariani J, Bailly Y. BAX contributes to Doppel-induced apoptosis of prion-deficient Purkinje cells. *Dev Neurobiol* (2007) 67:670-686.
- [225] Heitz S, Gautheron V, Lutz Y, Rodeau J-L, Zanjani H, Sugihara I, Bombarde G, Richard F, Fuchs J-P, Vogel MW, Mariani J, Bailly Y. BCL-2 counteracts Doppel-induced apoptosis of prion protein-deficient Purkinje cells in the *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* mouse. *Dev Neurobiol* (2008) 68:332-348.
- [226] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerisation with Bax. *Nature* (1994) 369:321-323.

- [227] Roucou X, Gains M, LeBlanc A. Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* (2004) 75:153-161.
- [228] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolg, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* (1993) 74:609-619.
- [229] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* (1999) 13:1899-1911.
- [230] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* (2001) 8:705-711.
- [231] Li A, Barmada S, Roth K, Harris D. N-terminally deleted forms of the prion protein activate both Bax-dependent and Bax-independent neurotoxic pathways. *J Neurosci* (2007) 27:852-859.
- [232] Chiesa R, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* (1998) 21:1339-1351.
- [233] Lee DC, Sakudo A, Kim CK, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Chen SG, Itohara S, Onodera T. Fusion of doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation. *Microbiol Immunol* (2006) 50:203-209.
- [234] Heitz S, Grant NJ, Bailly Y. Doppel induces autophagic stress in prion protein-deficient Purkinje cells. *Autophagy* (2009) 5:422-424.
- [235] Heitz S, Grant NJ, Leschiera R, Haeblerlé A-M, Demais V, Bombarde G, Bailly Y. Autophagy and cell death of Purkinje cells overexpressing Doppel in NgsK Prnp-deficient mice. *Brain Pathol* (2010) 20:119-132.
- [236] Dole S, Heitz S, Bombarde G, Haeblerlé A-M, Demais V, Grant NJ, Bailly Y. New insights into Doppel neurotoxicity using cerebellar organotypic cultures from prion-protein-deficient mice. *Prion* 2010. Medimond International Proceedings Eds. (2010) pp7-14.
- [237] Metzger F, Kapfhammer JP. Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum* (2003) 2:206-214.
- [238] Falsig J, Sonati T, Herrmann US, Saban D, Li B, Arroyo K, Ballmer B, Liberski PP, Aguzzi A. Prion pathogenesis is faithfully reproduced in cerebellar organotypic slice cultures. *PLoS Pathog* (2012) 8:e1002985.
- [239] Barbieri G, Palumbo S, Gabrusiewicz K, Azzalin A, Marchesi N, Spedito A, Biggio M, Sbalchiero E, Mazzini G, Miracco C, Pirtoli L, Kaminska B, Comincini S. Silencing of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy* (2011) 7:840-853.

- [240] Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* (1999) 345:1-5.
- [241] Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* (1998) 334:423-429.
- [242] Oh JM, Choi EK, Carp RI, Kim YS. Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy* (2012) 8:1448-1461.
- [243] Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A. Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo J* (2007) 26:538-547.
- [244] Baumann F, Pahnke J, Radovanovic I, Rulicke T, Bremer J, Tolnay M, Aguzzi A. Functionally relevant domains of the prion protein identified in vivo. *PLoS One* (2009) 4:e6707.
- [245] Lemaire-Vieille C, Bailly Y, Erlich P, Loeuillet C, Brocard J, Haeblerlé A-M, Bombarde G, Rak C, Demais V, Dumestre-Pérard C, Gagnon J, Cesbron J-Y. Ataxia with cerebellar lesions in mice expressing chimeric PrP-Dpl protein. *J Neurosci* (2013) (in press).

INTECH

**Publication 2**

Pietri M., Dakowski C., Hannaoui S., Alleaume-Butaux A., Hernandez-Rapp J., Ragagnin A., Mouillet-Richard S., Haik S., Bailly Y., Peyrin J-M., Launay J-M., Kellermann O., Schneider B. (2013) PDK1-dependent switch-off of TACE shedding activity in prion and Alzheimer's diseases. *Nat. Med.* 19 (9): 1124-31.

# PDK1 decreases TACE-mediated $\alpha$ -secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases

Mathéa Pietri<sup>1,2</sup>, Caroline Dakowski<sup>1,2</sup>, Samia Hannaoui<sup>3–5</sup>, Aurélie Alleaume-Butaux<sup>1,2</sup>, Julia Hernandez-Rapp<sup>1,2,6</sup>, Audrey Ragagnin<sup>7</sup>, Sophie Mouillet-Richard<sup>1,2</sup>, Stéphane Haik<sup>3–5</sup>, Yannick Bailly<sup>7</sup>, Jean-Michel Peyrin<sup>8</sup>, Jean-Marie Launay<sup>9,10</sup>, Odile Kellermann<sup>1,2</sup> & Benoit Schneider<sup>1,2</sup>

$\alpha$ -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein (APP) precludes formation of neurotoxic amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides, and  $\alpha$ -cleavage of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) prevents its conversion into misfolded, pathogenic prions (PrP<sup>Sc</sup>). The mechanisms leading to decreased  $\alpha$ -secretase activity in Alzheimer's and prion disease remain unclear. Here, we find that tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE)-mediated  $\alpha$ -secretase activity is impaired at the surface of neurons infected with PrP<sup>Sc</sup> or isolated from APP-transgenic mice with amyloid pathology. 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) activity is increased in neurons infected with prions or affected by A $\beta$  deposition and in the brains of individuals with Alzheimer's disease. PDK1 induces phosphorylation and caveolin-1-mediated internalization of TACE. This dysregulation of TACE increases PrP<sup>Sc</sup> and A $\beta$  accumulation and reduces shedding of TNF- $\alpha$  receptor type 1 (TNFR1). Inhibition of PDK1 promotes localization of TACE to the plasma membrane, restores TACE-dependent  $\alpha$ -secretase activity and cleavage of APP, PrP<sup>C</sup> and TNFR1, and attenuates PrP<sup>Sc</sup>- and A $\beta$ -induced neurotoxicity. In mice, inhibition or siRNA-mediated silencing of PDK1 extends survival and reduces motor impairment following PrP<sup>Sc</sup> infection and in APP-transgenic mice reduces Alzheimer's disease-like pathology and memory impairment.

Prion and Alzheimer's disease are neurodegenerative disorders characterized by the accumulation of plaques containing misfolded PrP<sup>Sc</sup> and A $\beta$ , respectively<sup>1,2</sup>. Neurotoxic and aggregation-prone A $\beta$  peptides (A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub>) are generated by cleavage of APP by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase<sup>3</sup>. In contrast, the  $\alpha$ -secretase-mediated cleavage of APP between residues 687 and 688 within its A $\beta$  domain releases the soluble neuroprotective fragment sAPP $\alpha$  and precludes formation and deposition of A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> (refs. 4,5). Regarding prions, conversion of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup> causes prion disease.  $\alpha$ -secretase-mediated cleavage of PrP<sup>C</sup> between residues 111 and 112 generates an N-terminally truncated form of PrP<sup>C</sup> that cannot be converted into PrP<sup>Sc</sup> and exerts a dominant-negative effect on PrP<sup>Sc</sup> replication<sup>6</sup>.

$\alpha$ -secretases belong to the a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family involved in ectodomain shedding of growth factors, cytokines, receptors and adhesion molecules<sup>7</sup>. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme (TACE, or ADAM17), which is primarily known for its role in mediating the shedding of cell surface-bound TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptors<sup>8</sup>, contributes to constitutive

and/or stimulated  $\alpha$ -secretase-mediated cleavage of both PrP<sup>C</sup> and APP<sup>3,9,10</sup>. In individuals with Alzheimer's disease, low amounts of sAPP $\alpha$  in the cerebrospinal fluid (CSF) suggest that TACE-dependent  $\alpha$ -secretase activity is reduced<sup>11</sup>. In prion diseases, reduced TACE-mediated  $\alpha$ -secretase cleavage of PrP<sup>C</sup> is thought to occur during the course of the illness, as shown by the progressive decrease in N-terminally truncated PrP<sup>C</sup> in the brain of infected mice<sup>6,12</sup>.

The sheddase activity of TACE depends on its localization at the plasma membrane<sup>7,8</sup>, but the precise mechanisms governing TACE trafficking and activity remain poorly understood. Interaction of TACE with rhomboids<sup>13</sup> or post-translational modifications of TACE by glycosylation, phosphorylation or both<sup>8</sup> promote its localization to lipid rafts at the plasma membrane<sup>14</sup>. Reactive oxygen species have also been shown to stimulate TACE activity<sup>15,16</sup>. However, the direct mechanisms underlying reduced TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity in prion and Alzheimer's disease remain unclear.

Here we show in both PrP<sup>Sc</sup>-infected and Alzheimer's disease neurons that activation of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) reduces cell surface TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity by triggering

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 747, Paris, France. <sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 747, Paris, France. <sup>3</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, UMR-S 975, Equipe "Alzheimer's and Prion diseases," Paris, France. <sup>4</sup>INSERM, UMR-S 975, Paris, France. <sup>5</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7225, Paris, France. <sup>6</sup>Université Paris Sud 11, ED419 Biosigne, Orsay, France. <sup>7</sup>Cytologie et Cytopathologie Neuronales, Institut des Neurosciences Cellulaires & Intégratives, CNRS UPR 3212, Strasbourg, France. <sup>8</sup>Neurobiologie des Processus Adaptatifs, CNRS UMR 7102, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France. <sup>9</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Biochimie, INSERM UMR-S 942, Hôpital Lariboisière, Paris, France. <sup>10</sup>Pharma Research Department, Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland. Correspondence should be addressed to B.S. (benoit.schneider@parisdescartes.fr) or J.-M.L. (jean-marie.launay@lrp.aphp.fr).

Received 2 May; accepted 16 July; published online 18 August 2013; doi:10.1038/nm.3302



internalization of TACE. We also provide evidence that PDK1 inhibition attenuates prion and Alzheimer's disease progression.

## RESULTS

### Prion infection impairs TACE-dependent TNFR1 shedding

To investigate whether prion infection modulates TACE activity, we used 1C11 mouse neuroectodermal stem cells, serotonergic 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells, primary cultures of mouse cerebellar granule neurons (CGNs) and brain samples from C57BL/6J mice infected with mouse-adapted prions derived from a human familial prion disease (Fukuoka-1, Fk), scrapie (22L) or bovine spongiform encephalopathy (6PB1)<sup>17–19</sup> (Supplementary Fig. 1). Using TNFR1 shedding as a readout of TACE activity<sup>7</sup>, we found that prion infection triggered an approximately three- to four-fold increase in the amount of trimeric TNFR1 (ref. 20) at the cell surface (Fig. 1a). This increase in cell surface TNFR1 staining was associated with a 90% reduction in the concentration of soluble monomeric TNFR1 (sTNFR1) in the culture medium of infected cells as compared to uninfected cells (Fig. 1b). This increase in TNFR1 at the cell surface rendered prion-infected cells highly vulnerable to soluble TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ )-associated toxicity. The doses of sTNF- $\alpha$  inducing 50% cell death (LD<sub>50</sub><sup>sTNF- $\alpha$</sup> ) of infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells or causing 50% early neuronal dysfunction, that is, dendritic fragmentation, in infected CGNs were reduced by approximately 50–97% as compared to the doses achieving similar effects in their uninfected counterparts (Fig. 1c and Supplementary Table 1). The increased sensitivity of infected cells to sTNF- $\alpha$  was associated with increased sTNF- $\alpha$ -mediated caspase-3 activation (Supplementary Fig. 2), a downstream effector of TNFR1 signaling.

TNFR1 staining was increased in the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei of prion-infected mice killed just before the symptomatic phase as compared to mock-inoculated (sham) mice (Supplementary Fig. 3). The concentration of sTNFR1 in the CSF of 22L-infected mice ( $11.9 \pm 2.4$  pg ml<sup>-1</sup>,  $n = 10$ ) was reduced by

approximately 60% ( $P < 0.005$ ) as compared to uninfected mice ( $27.5 \pm 5.1$  pg ml<sup>-1</sup>,  $n = 10$ ). Taken together, these results suggest that prion infection reduces TACE-mediated shedding of TNFR1.

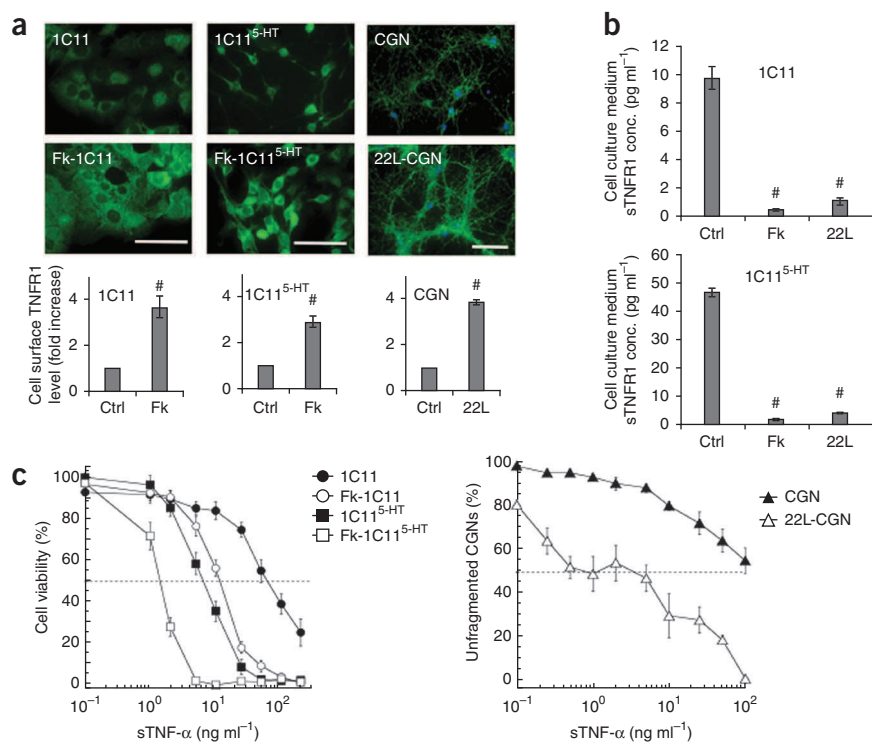
### Prion infection promotes TACE internalization

Whereas TACE was normally present at the cell surface of uninfected cells, it was almost undetectable at the plasma membrane of prion-infected cells and found intracellularly (Supplementary Fig. 4a,e). We next analyzed TACE localization by detergent-free sucrose gradient membrane fractionation of cell extracts followed by western blotting or TACE immunoprecipitation of biotinylated plasma membrane proteins. We showed that TACE co-distributed with focal adhesion kinase (FAK) at the plasma membrane of uninfected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (Supplementary Fig. 4a–c,e), whereas it co-distributed with caveolin-1 (Cav-1) in Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (Supplementary Fig. 4b). Duolink proximity ligation analysis, which detects two proteins located within a radius of <40 nm of each other, suggests that internalized TACE colocalizes with Cav-1 in Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (Fig. 2a). Immunogold labeling revealed that TACE was associated with Cav-1-enriched microvesicles in infected neurons (Fig. 2b). Thus, prion infection promotes internalization of TACE through mechanisms that probably involve Cav-1-enriched microvesicles. Accordingly, bombardment of Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells with tungsten microprojectiles coated with Cav-1-specific antibodies<sup>21</sup> increased TACE trafficking to the plasma membrane (Supplementary Fig. 4b).

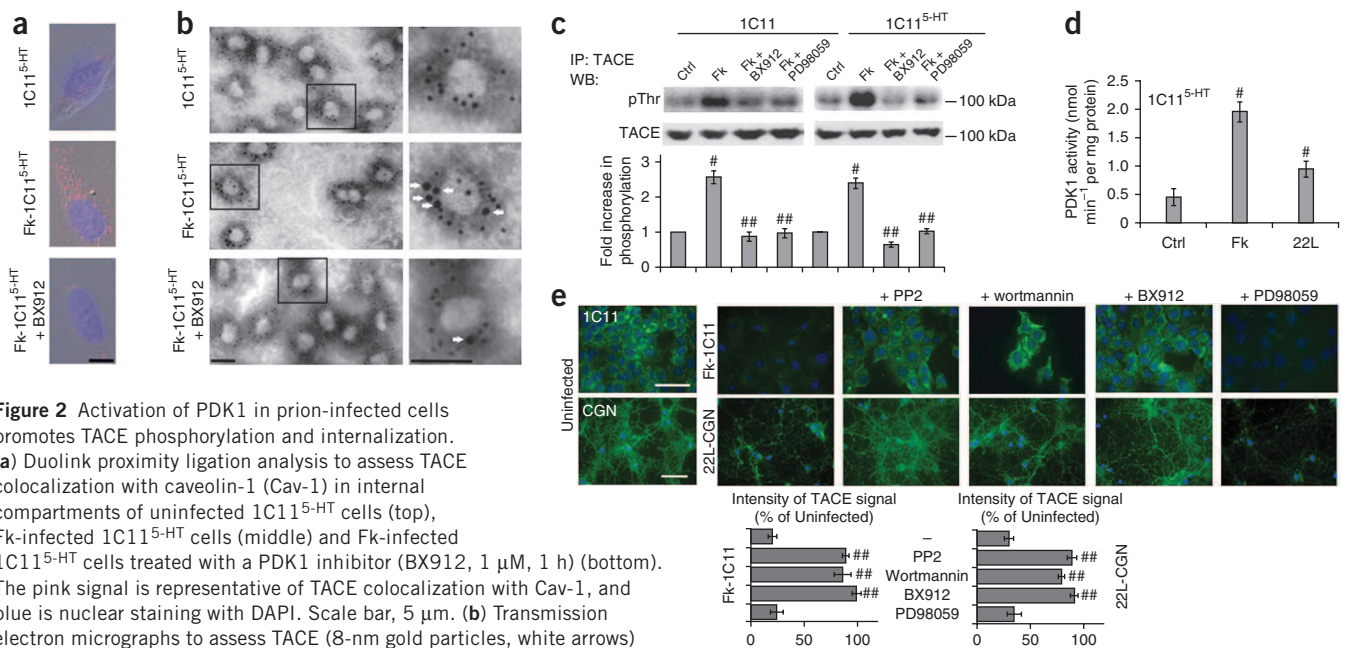
Phosphorylation of the C-terminal cytoplasmic tail of TACE alters TACE trafficking and internalization<sup>7,8,22</sup>. The TACE C-terminal domain contains at least four putative phosphorylation sites, including the single known phosphorylatable residue, Thr735 (refs. 7,8). Using two-dimensional gel electrophoresis (Supplementary Fig. 4d) and immunoprecipitation (Fig. 2c), we found that phosphorylation of TACE at Thr735 was increased in Fk-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells as compared to uninfected cells.

### Prion infection-mediated PDK1 activation reduces TACE activity

The Src kinase–phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–PDK1 signaling cascade and the



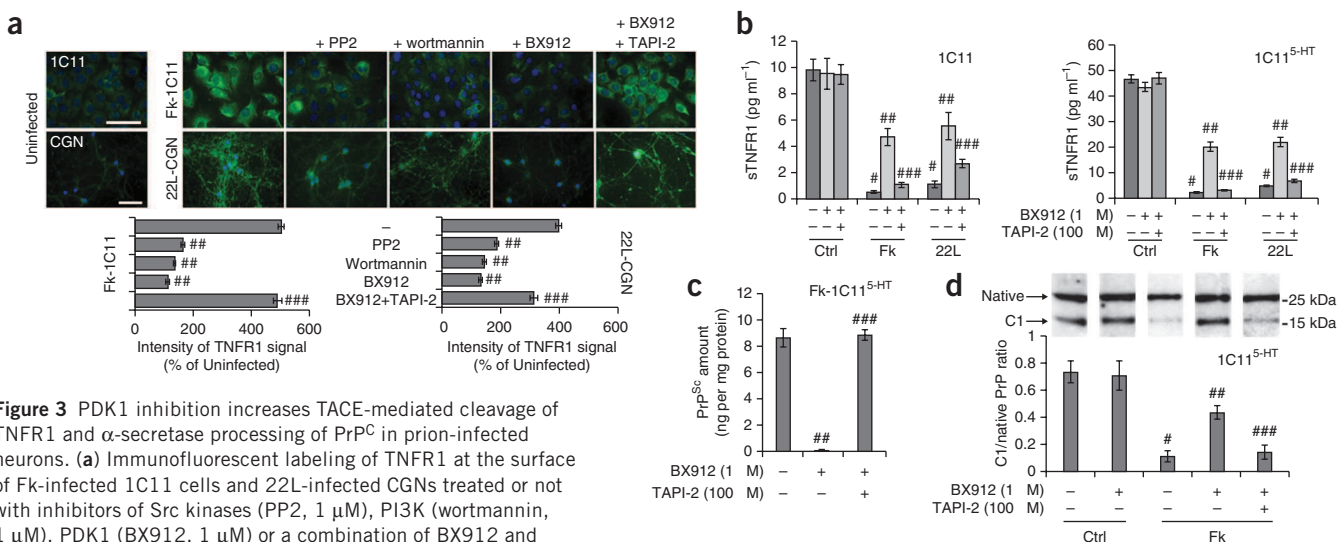
**Figure 1** Prion infection reduces TNFR1 shedding and increases cellular sensitivity to sTNF- $\alpha$  toxicity. (a) Immunofluorescent labeling of TNFR1 at the surface of Fk-infected 1C11 precursors, 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells and 22L-infected CGNs as compared to their uninfected counterparts (Ctrl). Scale bars, 50  $\mu$ m. (b) Concentration of sTNFR1 in the culture medium of Fk- and 22L-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells as compared to uninfected cells. (c) Left, viability of Fk-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells after exposure to increasing concentrations of sTNF- $\alpha$  for 72 h as compared to uninfected cells. Right, dendritic fragmentation in 22L-infected CGNs after exposure to increasing sTNF- $\alpha$  concentrations for 72 h as compared to uninfected CGNs. LD<sub>50</sub><sup>sTNF- $\alpha$</sup>  values are indicated in Supplementary Table 1. Quantitative data are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. from three experiments performed in triplicate; #  $P < 0.005$  versus uninfected cells.



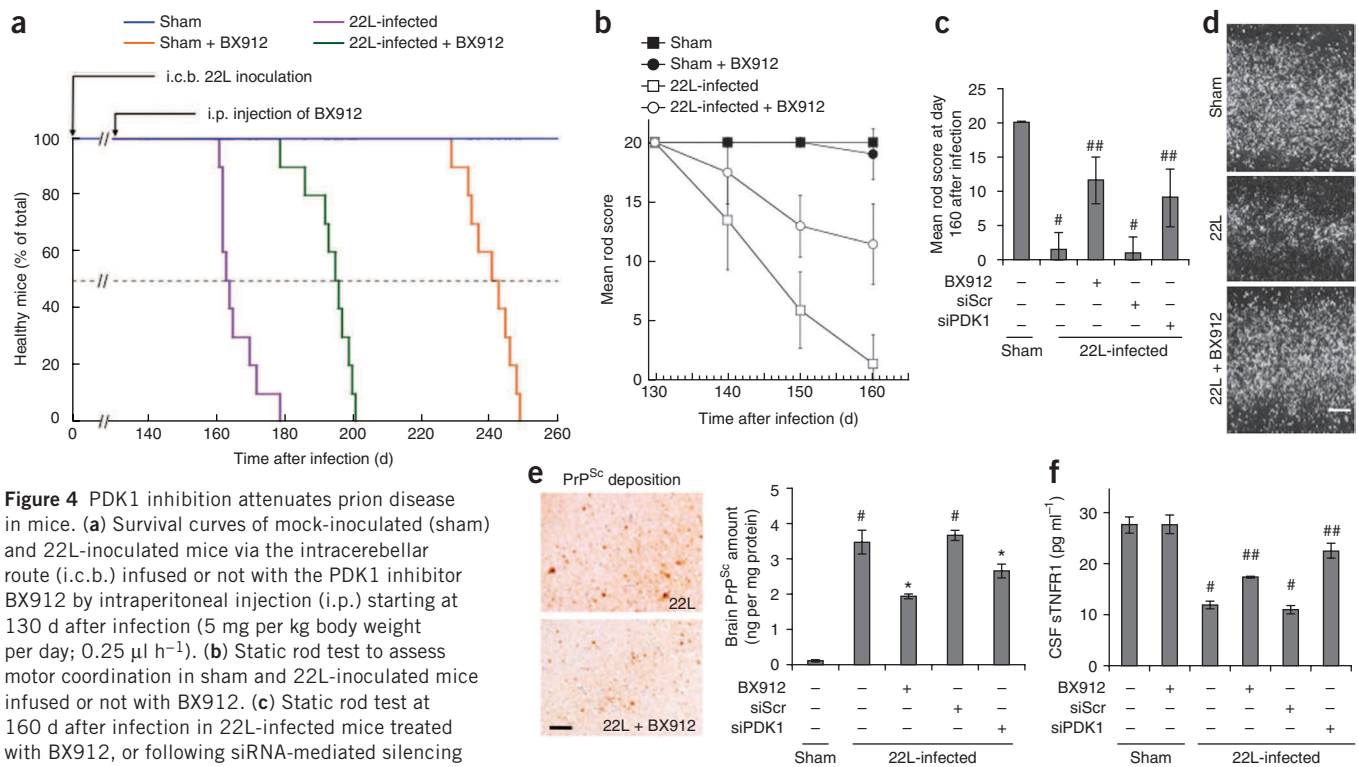
**Figure 2** Activation of PDK1 in prion-infected cells promotes TACE phosphorylation and internalization. (a) Duolink proximity ligation analysis to assess TACE colocalization with caveolin-1 (Cav-1) in internal compartments of uninfected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (top), Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (middle) and Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells treated with a PDK1 inhibitor (BX912, 1 μM, 1 h) (bottom). The pink signal is representative of TACE colocalization with Cav-1, and blue is nuclear staining with DAPI. Scale bar, 5 μm. (b) Transmission electron micrographs to assess TACE (8-nm gold particles, white arrows) association with Cav-1-enriched vesicles (labeled by 5-nm gold particles) in uninfected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (top), Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells (middle) and Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells exposed to BX912 (1 μM, 1 h) (bottom). Scale bars, 100 nm. (c) Immunoprecipitation of TACE and immunoblotting for phosphorylation level on threonine residues (pThr) using a pan-pThr antibody in Fk-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells treated or not with BX912 (1 μM, 1 h) or PD98059 (5 μM, 1 h) versus uninfected cells (Ctrl). IP, immunoprecipitation; WB, western blot. (d) PDK1 activity in 22L- and Fk-infected and uninfected (Ctrl) 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells. (e) Immunofluorescent labeling of TACE at the surface of Fk-infected 1C11 cells and 22L-infected CGNs treated or not with inhibitors of Src kinases (PP2, 1 μM), PI3K (wortmannin, 1 μM), PDK1 (BX912, 1 μM) or ERK1/2 (PD98059, 5 μM) for 1 h versus uninfected cells. Scale bars, 50 μm. All experiments were performed three times in triplicate. Values are the mean ± s.e.m. #*P* < 0.005 versus uninfected cells (Ctrl); ##*P* < 0.005 versus untreated infected cells.

protein kinase C-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway are both involved in the phosphorylation of the cytoplasmic tail of TACE in TACE-transfected cells<sup>8</sup>.

PDK1 activity was increased by approximately 100–300% in infected 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells as compared to their uninfected counterparts (Fig. 2d). Inhibition of PDK1 with BX912 in Fk-infected



**Figure 3** PDK1 inhibition increases TACE-mediated cleavage of TNFR1 and  $\alpha$ -secretase processing of PrP<sup>C</sup> in prion-infected neurons. (a) Immunofluorescent labeling of TNFR1 at the surface of Fk-infected 1C11 cells and 22L-infected CGNs treated or not with inhibitors of Src kinases (PP2, 1 μM), PI3K (wortmannin, 1 μM), PDK1 (BX912, 1 μM) or a combination of BX912 and the TACE inhibitor TAPI-2 (100 μM) for 1 h as compared to uninfected cells. Scale bars, 50 μm. (b) Concentration of sTNFR1 in the culture medium of Fk- and 22L-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells treated or not with BX912 (1 μM) or a combination of BX912 (1 μM) and TAPI-2 (100 μM) as compared to uninfected cells (Ctrl). (c) Amount of PrP<sup>Sc</sup> in Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells treated or not with BX912 (1 μM) or a combination of BX912 (1 μM) and TAPI-2 (100 μM) for 6 h, as assessed by ELISA. (d) Western blot analysis (top) of the C1 fragment of PrP (C1) and full-length PrP (native) in Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells treated or not with BX912 (1 μM) or a combination of BX912 (1 μM) and TAPI-2 (100 μM) for 6 h versus uninfected cells (Ctrl) and the ratio (bottom) of C1/native full-length PrP. All experiments were performed three times in triplicate. Values are the mean ± s.e.m. #*P* < 0.005 versus uninfected cells (Ctrl); ##*P* < 0.005 versus untreated Fk- or 22L-infected cells. ###*P* < 0.005 versus BX912-treated Fk- or 22L-infected cells.



**Figure 4** PDK1 inhibition attenuates prion disease in mice. **(a)** Survival curves of mock-inoculated (sham) and 22L-inoculated mice via the intracerebellar route (i.c.b.) infused or not with the PDK1 inhibitor BX912 by intraperitoneal injection (i.p.) starting at 130 d after infection (5 mg per kg body weight per day; 0.25  $\mu$ l h<sup>-1</sup>). **(b)** Static rod test to assess motor coordination in sham and 22L-inoculated mice infused or not with BX912. **(c)** Static rod test at 160 d after infection in 22L-infected mice treated with BX912, or following siRNA-mediated silencing of PDK1. Scramble siRNA (siScr) was used as control. **(d)** Nissl staining of viable PCNA-positive neurons in the internal granular layer of the cerebellum of sham mice (top), 22L-infected mice at 179 d after infection (middle) and 22L-infected mice at 201 d after infection infused with BX912 starting at 130 d (bottom). Scale bar, 300  $\mu$ m. **(e)** Left, cerebellar immunoperoxidase staining to visualize PrP<sup>Sc</sup> deposition in brains of 22L-infected mice infused or not with BX912. Scale bar, 100  $\mu$ m. Right, postmortem quantification of proteinase K-resistant PrP<sup>Sc</sup> in brains of 22L-infected mice treated with BX912 or following siRNA-mediated PDK1 silencing (siPDK1). SiScr was used as control. **(f)** Concentration of sTNFR1 in the CSF of 22L-infected mice infused with BX912 or treated with siPDK1 versus control mice (sham and siScr-treated 22L mice). Values are the mean  $\pm$  s.e.m. #*P* < 0.005 versus sham mice; ##*P* < 0.01 versus 22L-infected mice; \**P* < 0.005 versus 22L-infected mice. *n* = 10 mice per group.

1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells reversed prion-induced TACE phosphorylation (Fig. 2c and Supplementary Fig. 4d). Moreover, inhibition of Src kinases (PP2), PI3K (wortmannin) or PDK1 (BX912) promoted translocation of TACE back to the surface of infected cells (Fig. 2e and Supplementary Fig. 4e). The intensity of TACE immunoreactivity at the surface of inhibitor-treated infected cells was similar to that in uninfected cells (Fig. 2e). Cell surface biotinylation experiments at 4 °C further showed that BX912 treatment of Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells failed to promote trafficking of TACE to the plasma membrane (Supplementary Fig. 4c), whereas BX912 treatment at 37 °C induced displacement of TACE from Cav-1-enriched microvesicles (Fig. 2a,b) to FAK-positive membrane fractions (Supplementary Fig. 4b,c).

We recently reported that prion infection enhances ERK1/2 phosphorylation<sup>23</sup>. Here, we observed that ERK1/2 activation increased TACE phosphorylation at Thr735 in Fk-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells (Fig. 2c). However, inhibition of ERK1/2 activity with PD98059 in these infected cells did not promote trafficking of TACE to the plasma membrane (Fig. 2e and Supplementary Fig. 4e). To assess whether phosphorylation of TACE at residue Thr735 is sufficient to promote trafficking of TACE between the plasma membrane and Cav-1-enriched microvesicles, we transfected uninfected 1C11<sup>5-HT</sup> cells with a TACE mutant that mimics a constitutive phosphorylation (T735D) or dephosphorylation (T735A) state. Both mutated TACEs stayed at the plasma membrane of uninfected cells, suggesting phosphorylation at Thr735 may not be sufficient to promote TACE internalization (data not shown).

Exposure of Fk-infected 1C11 cells and 22L-infected CGNs to PP2, wortmannin or BX912 reduced the amount of TNFR1 at the plasma membrane as compared to untreated infected cells (Fig. 3a), which suggested that TACE activity at the cell surface had been recovered. In Fk- and 22L-infected 1C11 and 1C11<sup>5-HT</sup> cells, PDK1 inhibition increased the concentration of sTNFR1 in the cell medium by 60% as compared to untreated infected cells (Fig. 3b). Bombardment of infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells with tungsten microprojectiles coated with Cav-1-specific antibodies also increased TNFR1 shedding as compared to untreated infected cells (Supplementary Fig. 5a). Recovery of TNFR1 shedding by BX912 depended on TACE, as inhibition of TACE by incubation of cells with TNF- $\alpha$  processing inhibitor-2 (TAPI-2) abrogated the effects of BX912 on shedding of TNFR1 from the cell surface (Fig. 3a) into the culture medium (Fig. 3b). The increase in TNFR1 shedding upon PDK1 inhibition also decreased sTNF- $\alpha$ -induced activation of caspase-3 in infected cells (Supplementary Fig. 2).

TACE-mediated  $\alpha$ -secretase cleavage of PrP<sup>C</sup> between residues 111 and 112 generates an N-terminally truncated (that is, membrane C1) fragment that cannot be converted into PrP<sup>Sc</sup> (refs. 6,9). PDK1 inhibition with BX912 in Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells decreased the amount of PrP<sup>Sc</sup>, which was reversed by inhibition of TACE with TAPI-2 (Fig. 3c). Bombardment of infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells with tungsten microprojectiles coated with Cav-1-specific antibodies also reduced the amount of PrP<sup>Sc</sup> (Supplementary Fig. 5b). In Fk-infected 1C11<sup>5-HT</sup> cells, the ratio between PrP C1 fragment

**Figure 5** Increased PDK1 activity in hippocampal neurons from mice with Alzheimer's disease-like pathology impairs TACE activity. **(a)** PDK1 activity in primary hippocampal neurons derived from 275-day-old Tg2576 mice with A $\beta$  plaque deposits (TgA $\beta$ <sup>POS</sup>,  $n = 4$ ) and without A $\beta$  deposits (TgA $\beta$ <sup>NEG</sup>,  $n = 5$ ) as well as in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> and TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons in which PrP<sup>C</sup> expression was silenced with a siRNA against PrP (siPrP,  $n = 4$ ). **(b)** Concentration of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> in the culture medium of TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons as compared to those of TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons, TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons silenced for PrP<sup>C</sup> (siPrP) or PDK1 (siPDK1) expression, and TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons treated with BX912 (1  $\mu$ M) combined or not with TAPI-2 (100  $\mu$ M) for 1 h ( $n = 4$  for each group). **(c)** Immunoprecipitation experiments to assess TACE threonine phosphorylation in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> and TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons. Impact of PDK1 inhibition with BX912 (1  $\mu$ M, 1 h) or silencing of PrP (siPrP) on TACE threonine phosphorylation in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons ( $n = 3$  in triplicate) is also shown. Values are the mean  $\pm$  s.e.m. # $P < 0.05$  versus TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons; \* $P < 0.05$  versus untreated TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons; \*\* $P < 0.05$  versus TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons treated with BX912.

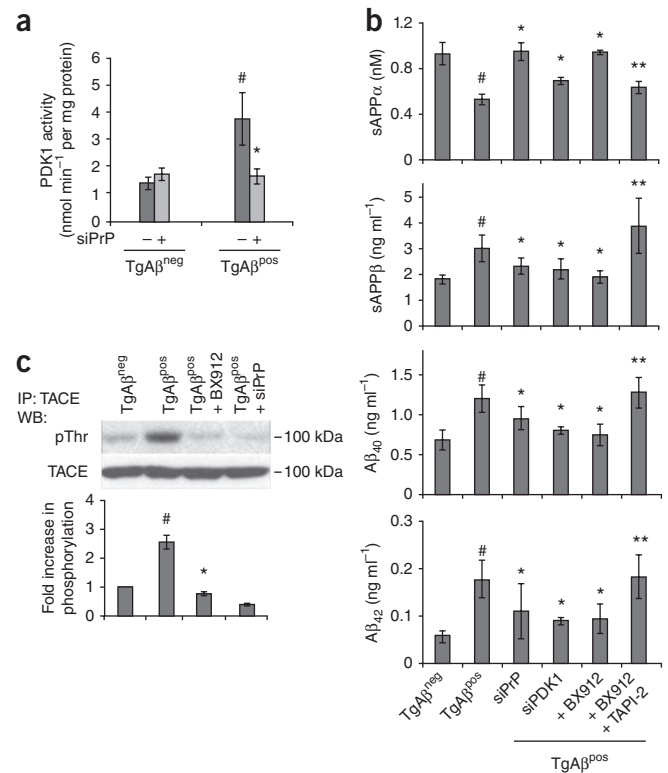
to full-length PrP (native) was reduced by approximately 85% as compared to that in uninfected cells (**Fig. 3d**). The C1/native ratio was increased by approximately 300% in BX912-treated Fk-1C11<sup>5-HT</sup> cells compared to untreated infected cells (**Fig. 3d**). This increase in  $\alpha$ -secretase cleavage of PrP<sup>C</sup> by BX912 depends on TACE, as inhibition of TACE with TAPI-2 counteracted the effects of BX912 on the C1/native PrP ratio (**Fig. 3d**).

### PDK1 inhibition improves prion disease in mice

To examine whether increasing TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity would attenuate prion disease in prion-infected mice, we chronically injected BX912 intraperitoneally (i.p.) starting 130 d after infection and before the onset of clinical signs (140 d). Inhibition of PDK1 with BX912 delayed mortality in 22L-infected mice as compared to untreated infected mice (193.8  $\pm$  2.1 d versus 166.0  $\pm$  1.8 d,  $n = 10$ ,  $P < 0.0001$ , **Fig. 4a**). In control experiments, because of BX912's toxicity<sup>24</sup>, mock-inoculated (sham) mice treated with BX912 died from 229 to 248 d (**Fig. 4a**). This mortality probably leads to an underestimation of the beneficial effect of PDK1 inhibition in infected mice. PDK1 inhibition also reduced prion infection-induced impairments in motor function (**Fig. 4b**). In 22L-infected mice, the mean static rod score dropped to 10 by 145 d, whereas in BX912-treated infected mice the mean static score did not drop below 10 until 160 d. In sham mice, motor coordination was unchanged by BX912 treatment (**Fig. 4b**). PDK1 siRNA-mediated silencing of PDK1 in the brain of 22L-infected mice also prevented prion-induced motor impairment (**Fig. 4c**). PDK1 inhibition with BX912 also attenuated prion-induced neuronal loss in the internal granular layer of the cerebellum, as assessed by staining of viable neurons (**Fig. 4d**). BX912 treatment or siRNA-mediated PDK1 silencing reduced the amount of PrP<sup>Sc</sup> deposited in the brains of 22L-infected mice (**Fig. 4e**). Finally, BX912 treatment or PDK1 silencing partly, but significantly, increased TACE-mediated shedding of TNFR1, as indicated by an increased concentration of sTNFR1 in the CSF of infected mice (**Fig. 4f**).

### A $\beta$ accumulation in Alzheimer's neurons overactivates PDK1

In Alzheimer's disease, decreased TACE-mediated  $\alpha$ -secretase cleavage of APP is believed to contribute to the accumulation of A $\beta$  peptides and to the progression of the disease<sup>11,25</sup>. Recent data suggest that PrP<sup>C</sup> is involved in A $\beta$  peptide neurotoxicity<sup>26,27</sup>. Our identification of a PDK1-dependent mechanism controlling the trafficking and  $\alpha$ -secretase activity of TACE in prion-infected cells prompted us to examine whether the accumulation of A $\beta$  peptide would increase PDK1 activity and whether this occurs through a PrP<sup>C</sup>-dependent



mechanism. Increased PDK1 activity would, in turn, affect TACE-dependent cleavage of TNFR1 and APP.

The Tg2576 APP (Swedish mutation K670N/M671L) mouse model of Alzheimer's disease<sup>28</sup> develops amyloid pathology and A $\beta$  plaque deposition in the brain as early as 8 months of age<sup>29</sup>. Tg2576 mice with (TgA $\beta$ <sup>POS</sup>) or without (TgA $\beta$ <sup>NEG</sup>) amyloid plaque deposits were identified by positron emission tomography (PET) imaging after Pittsburgh compound B injection<sup>30</sup>. PDK1 activity was increased by approximately 150% in primary cultures of hippocampal neurons derived from 275-day-old TgA $\beta$ <sup>POS</sup> mice as compared to TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> mice (**Fig. 5a**). siRNA-mediated silencing of PrP<sup>C</sup> (siPrP) in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> cultured hippocampal neurons reversed the increase in PDK1 activity (**Fig. 5a**), suggesting A $\beta$  peptide-induced increases in PDK1 activity depend on PrP<sup>C</sup>. In TgA $\beta$ <sup>POS</sup> cultured hippocampal neurons, the amount of TNFR1 at the cell surface was increased by approximately twofold (**Supplementary Fig. 6a**), and the concentration of sTNFR1 in the culture medium was decreased by approximately 50% (**Supplementary Fig. 6b**), as compared to TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons. In the culture medium of TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons, the concentration of sAPP $\alpha$  was reduced by 50%, whereas the concentrations of sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> were increased by 50–100%, as compared to TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons (**Fig. 5b**). As in prion-infected neurons, in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons TACE was enriched in Cav-1-positive vesicles, whereas in TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons it was enriched in the plasma membrane (that is, FAK-positive fractions) (**Supplementary Fig. 6c**). Phosphorylation of TACE at residue Thr735 was increased by 2.5-fold in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons as compared to TgA $\beta$ <sup>NEG</sup> neurons (**Fig. 5c**). In TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons, inhibition of PDK1 with BX912 decreased TACE phosphorylation (**Fig. 5c**) and promoted its trafficking to the plasma membrane (**Supplementary Fig. 6c**). PDK1 inhibition with BX912 or silencing with PDK1-directed siRNA in TgA $\beta$ <sup>POS</sup> neurons increased the concentrations of sTNFR1 and sAPP $\alpha$  and decreased the concentrations of sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> in the culture medium

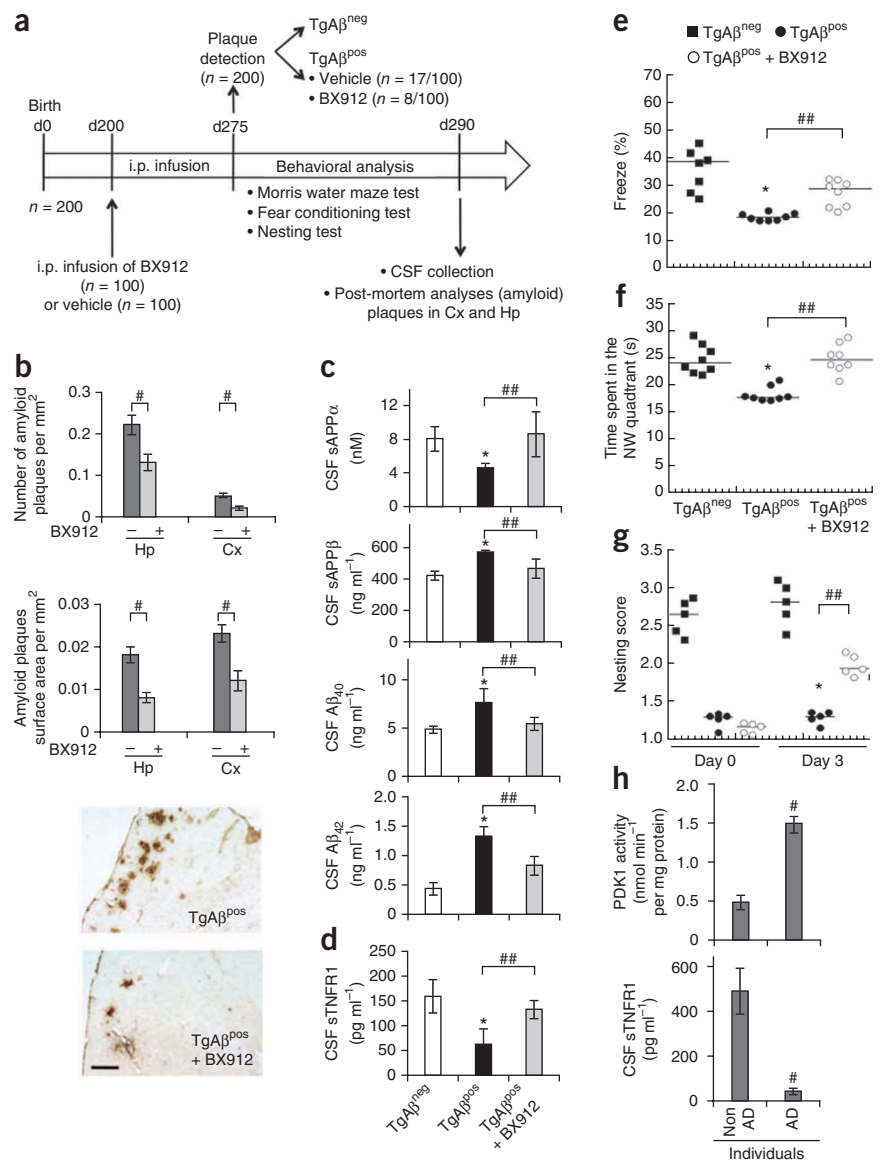
**Figure 6** PDK1 inhibition reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive and memory impairments in Tg2576 mice.

(a) Schematic of the experimental procedure with Tg2576 mice. (b) Number (top) and surface area (middle) of amyloid plaques in the hippocampus (Hp) and cortex (Cx) of TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice treated or not with BX912 ( $n = 8$ ). Values are means  $\pm$  s.e.m.  $\#P < 0.001$  versus untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice ( $n = 17$ ). Bottom, representative images of 4G8-positive A $\beta$  plaques in the cortex of TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice treated or not with BX912. Scale bar, 150  $\mu$ m. (c,d) Concentration of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> (c) and sTNFR1 (d) in the CSF of TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice infused with BX912 as compared to untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> and TgA $\beta$ <sup>neg</sup> mice ( $n = 4$  for each group). Values are means  $\pm$  s.e.m.  $*P < 0.01$  versus TgA $\beta$ <sup>neg</sup> mice;  $\#P < 0.01$  versus untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice. (e–g) Percentage time frozen recorded in the 5-min test trial (% freeze) of the contextual fear conditioning task (e), Morris water maze test (f) and nest construction (g) to assess the impact of BX912-mediated PDK1 inhibition (TgA $\beta$ <sup>pos</sup> + BX912) on Alzheimer's disease-associated memory impairment, as compared to untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> and TgA $\beta$ <sup>neg</sup> mice. For each group, individual values and median (line) are shown.  $*P < 0.01$  versus TgA $\beta$ <sup>neg</sup> mice;  $\#P < 0.01$  versus untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice. NW, northwest. (h) PDK1 activity in the brain and the concentration of sTNFR1 in the CSF of individuals with Alzheimer's disease ( $n = 6$ ). Values are means  $\pm$  s.e.m.  $\#P < 0.01$  versus subjects without Alzheimer's disease.

(Fig. 5b and Supplementary Fig. 6b). Increased  $\alpha$ -secretase-mediated APP processing depends on TACE, as TACE inhibition with TAPI-2 inhibited the effects of BX912 on release of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> (Fig. 5b). Finally, siRNA-mediated silencing of PrP<sup>C</sup> in TgA $\beta$ <sup>pos</sup> neurons triggered effects similar to those obtained upon inhibition or silencing of PDK1, which suggests PrP<sup>C</sup> may have a dominant role in reducing TACE activity (Fig. 5b,c). Inhibition of ERK1/2 activity with PD98059 in TgA $\beta$ <sup>pos</sup> neurons did not induce trafficking of TACE to the plasma membrane (Supplementary Fig. 6c).

### PDK1 inhibition attenuates Alzheimer's disease-like pathology

We next investigated whether inhibition of PDK1 would increase TACE-mediated  $\alpha$ -secretase processing of APP in Tg2576 mice and improve memory and cognitive impairments following the experimental schedule described in Figure 6a. Injection of BX912 i.p. into 200-day-old Tg2576 mice reduced the number of mice with amyloid plaque deposits at 275 d (BX912-treated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice) to 8 of 100, as compared to 17 of 100 untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice. The eight BX912-treated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice had reduced numbers of amyloid plaques and reduced total surface area occupied by plaques in both the hippocampus and cortex as compared to untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice (Fig. 6b). The concentrations of sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> decreased in the CSF of BX912-treated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice and were associated with increased concentration of sAPP $\alpha$  in the CSF as compared to untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup>



mice (Fig. 6c). The effects on amyloid pathology after BX912 treatment persisted until 330 d, after which BX912-treated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice were killed (Supplementary Fig. 7), indicating that PDK1 inhibition in Tg2576 mice stably increases TACE-mediated  $\alpha$ -secretase processing of APP and reduces A $\beta$  production. Furthermore, PDK1 inhibition increased TNFR1 shedding, as we measured an approximately 200% increase in the concentration of sTNFR1 in the CSF of BX912-treated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice as compared to untreated TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice (Fig. 6d). Nevertheless, BX912-treated Tg2576 mice started dying at 350 d because of BX912 toxicity<sup>24</sup>, thus limiting the beneficial effect of PDK1 inhibition in transgenic Alzheimer's disease mice.

Finally, BX912 treatment reduced memory and cognitive impairment in Tg2576 mice. PDK1 inhibition with BX912 improved performance in a contextual fear conditioning task, as the percentage of time frozen recorded in BX912-treated 275-day-old TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice was 50% longer as compared to that of untreated 275-day-old TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice (Fig. 6e). siRNA-mediated silencing of PDK1 in 275-day-old TgA $\beta$ <sup>pos</sup> mice for 7 d also improved performance in the contextual fear conditioning task (Supplementary Fig. 8). BX912 treatment

improved performance in the Morris water maze test, as the time spent in the northwest quadrant by BX912-treated TgA $\beta$ <sup>POS</sup> mice was 50% longer as compared to that of untreated 275-day-old TgA $\beta$ <sup>POS</sup> mice (Fig. 6f and Supplementary Fig. 9). Nest construction, an affiliative social behavior that is progressively impaired in Tg2576 mice<sup>31</sup>, was also partially, but significantly, increased in BX912-treated TgA $\beta$ <sup>POS</sup> mice (Fig. 6g). Notably, the beneficial effects on APP processing and memory impairment afforded by PDK1 inhibition with BX912 in Tg2576 mice were also seen in two other mouse models of Alzheimer's disease, 3xTg-AD (ref. 32) and 5xTg-AD (ref. 33) mice (Supplementary Figs. 10 and 11). The therapeutic relevance of targeting PDK1 in Alzheimer's disease is substantiated by an approximately 200% increase in PDK1 activity in human Alzheimer's disease whole brains and a 90% decrease in the concentration of sTNFR1 in the CSF of those individuals as compared to age-matched subjects without Alzheimer's disease (Fig. 6h).

## DISCUSSION

Our findings suggest that PDK1 activity is increased in neurons infected with prions or affected by A $\beta$  deposition. PDK1 inhibition lengthens the survival of PrP<sup>Sc</sup>-infected mice and mitigates brain pathology and memory impairment in mouse models of Alzheimer's disease.

Our data suggest that PDK1 activation is under the control of PrP<sup>C</sup> signaling. PrP<sup>C</sup> positively controls Src kinase and PI3K activities<sup>21,34</sup>. Interestingly, Src kinase-PI3K signaling increases PDK1 activity<sup>22</sup>. PrP<sup>Sc</sup> may be neurotoxic by stimulating PrP<sup>C</sup>-associated signaling molecules<sup>35,36</sup>, including Src kinases<sup>23,37</sup>. Inhibition of Src kinases, PI3K or PDK1 restores TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity at the plasma membrane of infected cells. Thus, chronic recruitment of PrP<sup>C</sup>-coupled Src kinases and PI3K by PrP<sup>Sc</sup> may promote increased PDK1 activity in infected neurons.

In Alzheimer's disease, A $\beta$  peptides appear to bind PrP<sup>C</sup> (refs. 26,27) and upon binding would increase PDK1 activity by promoting recruitment of PrP<sup>C</sup>-coupled Src kinases and PI3K<sup>38,39</sup>. In agreement with this, PDK1 activity in neurons with amyloid pathology returns to basal levels upon PrP<sup>C</sup> silencing.

Increased PDK1 activity decreases TACE-mediated  $\alpha$ -secretase processing of three major substrates involved in prion or Alzheimer neuropathogenesis, that is, PrP<sup>C</sup> (ref. 40), APP<sup>2</sup> and TNFR1 (refs. 41,42) (Supplementary Fig. 12). This results in the accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in prion disease, increased production of neurotoxic A $\beta$  peptides in Alzheimer's disease, and the enrichment of the plasma membrane with TNFR1 in both pathologies. PDK1 activation in prion-infected or Alzheimer's disease neurons promotes phosphorylation and Cav-1-mediated internalization of TACE, which in turn reduces TACE sheddase activity at the cell surface. PDK1 inhibition is sufficient to rescue TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity and to exert beneficial effects in prion and Alzheimer's diseases (Supplementary Fig. 12). Indeed, at the plasma membrane of BX912-treated prion-infected cells, TACE catalyzes the  $\alpha$ -secretase cleavage of PrP<sup>C</sup> (ref. 9) into an N-terminally truncated PrP<sup>C</sup> fragment that cannot convert into PrP<sup>Sc</sup> and exerts a dominant-negative effect toward prion replication<sup>6</sup>. This mechanism may account for the decreased amount of brain PrP<sup>Sc</sup>, the increased survival and the improved motor function in 22L-infected mice upon PDK1 inhibition.

In hippocampal neurons from mice with amyloid pathology, PDK1 inhibition increases TACE-mediated  $\alpha$ -secretase processing of APP and release of the neuroprotective sAPP $\alpha$  fragment<sup>4,5</sup>. This results in decreased production of A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub>, reduced plaque load in transgenic mice and improved performance in cognitive and

memory tasks. Increased amount of TNFR1 in the plasma membrane of prion-infected or Alzheimer's disease neurons is consistent with prior reports describing high expression of TNFR1 (observed by immunolabeling) in the brains of subjects with Alzheimer's disease<sup>41</sup> and prion-infected mice (Supplementary Fig. 3). Increased cleavage of TNFR1 and release of soluble TNFR1 upon PDK1 inhibition may reduce prion and Alzheimer's disease neurons from TNF- $\alpha$ -associated inflammatory damage arising from activated microglia<sup>43,44</sup>, systemic inflammation<sup>45,46</sup> or aging<sup>47</sup> in prion and Alzheimer's disease. Thus, PDK1 may be targeted in prion and Alzheimer's disease to rescue  $\alpha$ -secretase-mediated processing of PrP<sup>C</sup> and APP.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the [online version of the paper](#).*

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Bombarde, V. Mutel, F. d'Agostini, G. Zürcher, E. Borroni, J.G. Richards, Z. Lam, M. Bühler, N. Pierron and R. Hochköppler for skillful methodological assistance, C. Vidal for stereotaxic injection of prion strains in mice cerebella, H. Laude and V. Beringue for the use of P3 facilities and F. Brouillard for two-dimensional gel electrophoresis advice. We acknowledge S. Blanquet, M. Briley and A. Baudry for helpful discussions and critical reading of the manuscript. This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (Prions&SensITNF, 1312 01) and INSERM. M.P. is a postdoctoral fellow of French Agence Nationale pour la Recherche. A.A.B. is funded by Domaine d'Intérêt Majeur - Maladies Infectieuses - Région Ile-de-France.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.P., J.-M.L., O.K. and B.S. conceptualized the study. M.P., C.D., Y.B., J.-M.P., S.H., A.A.-B., J.H.-R., A.R., S.M.-R., S.H. and B.S. performed experiments, and all authors participated in designing experiments and in analyzing and interpreting data. M.P., O.K. and B.S. wrote the manuscript. J.M.L. and B.S. supervised the project.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Aguzzi, A., Baumann, F. & Bremer, J. The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 439–477 (2008).
2. Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y.W. & Xu, H. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **120** (suppl. 1), 9–21 (2012).
3. De Strooper, B., Vassar, R. & Golde, T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 99–107 (2010).
4. Barger, S.W. & Harmon, A.D. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* **388**, 878–881 (1997).
5. Meziane, H. *et al.* Memory-enhancing effects of secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12683–12688 (1998).
6. Westergaard, L., Turnbaugh, J.A. & Harris, D.A. A naturally occurring, C-terminal fragment of the prion protein delays disease and acts as a dominant negative inhibitor of PrP<sup>Sc</sup> formation. *J. Biol. Chem.* **286**, 44234–44242 (2011).
7. Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **29**, 258–289 (2008).
8. Gooz, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 146–169 (2010).
9. Vincent, B. *et al.* The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 37743–37746 (2001).
10. Buxbaum, J.D. *et al.* Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 27765–27767 (1998).
11. Sennvik, K. *et al.* Levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* **278**, 169–172 (2000).

12. Yadavalli, R. *et al.* Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrP<sup>Sc</sup> modulates scrapie prion propagation. *J. Biol. Chem.* **279**, 21948–21956 (2004).
13. Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N. & Freeman, M. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* **335**, 225–228 (2012).
14. D'Alessio, A. *et al.* Plasma membrane microdomains regulate TACE-dependent TNFR1 shedding in human endothelial cells. *J. Cell Mol. Med.* **16**, 627–636 (2012).
15. Wang, Y., Herrera, A.H., Li, Y., Belani, K.K. & Walcheck, B. Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. *J. Immunol.* **182**, 2449–2457 (2009).
16. Pradines, E. *et al.* Cellular prion protein coupling to TACE-dependent TNF- $\alpha$  shedding controls neurotransmitter catabolism in neuronal cells. *J. Neurochem.* **110**, 912–923 (2009).
17. Mouillet-Richard, S. *et al.* Regulation by neurotransmitter receptors of serotonergic or catecholaminergic neuronal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 9186–9192 (2000).
18. Mouillet-Richard, S. *et al.* Prions impair bioaminergic functions through serotonin- or catecholamine-derived neurotoxins in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 23782–23790 (2008).
19. Cronier, S., Beringue, V., Bellon, A., Peyrin, J.M. & Laude, H. Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures. *J. Virol.* **81**, 13794–13800 (2007).
20. MacEwan, D.J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* **14**, 477–492 (2002).
21. Mouillet-Richard, S. *et al.* Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925–1928 (2000).
22. Zhang, Q. *et al.* Phosphorylation of TNF- $\alpha$  converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6901–6906 (2006).
23. Pradines, E. *et al.* Pathogenic prions deviate PrP<sup>C</sup> signaling in neuronal cells and impair A- $\beta$  clearance. *Cell Death Dis.* **4**, e456 (2013).
24. Kloo, B. *et al.* Critical role of PI3K signaling for NF- $\kappa$ B-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 272–277 (2011).
25. Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J. & Hooper, N.M. ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases. *J. Neurosci. Res.* **74**, 342–352 (2003).
26. Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W. & Strittmatter, S.M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- $\beta$  oligomers. *Nature* **457**, 1128–1132 (2009).
27. Benilova, I. & De Strooper, B. Prion protein in Alzheimer's pathogenesis: a hot and controversial issue. *EMBO Mol. Med.* **2**, 289–290 (2010).
28. Hsiao, K. *et al.* Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99–102 (1996).
29. Kawarabayashi, T. *et al.* Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **21**, 372–381 (2001).
30. Manook, A. *et al.* Small-animal PET imaging of amyloid- $\beta$  plaques with [11C]PIB and its multi-modal validation in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **7**, e31310 (2012).
31. Wesson, D.W. & Wilson, D.A. Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice. *Behav. Brain Res.* **216**, 408–413 (2011).
32. Oddo, S. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409–421 (2003).
33. Oakley, H. *et al.* Intraneuronal  $\beta$ -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* **26**, 10129–10140 (2006).
34. Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn's'ka, I. & Schachner, M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* **169**, 341–354 (2005).
35. Winklhofer, K.F., Tatzelt, J. & Haass, C. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* **27**, 336–349 (2008).
36. Pietri, M. *et al.* Overstimulation of PrP<sup>C</sup> signaling pathways by prion peptide 106–126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 28470–28479 (2006).
37. Nixon, R.R. Prion-associated increases in Src-family kinases. *J. Biol. Chem.* **280**, 2455–2462 (2005).
38. Um, J.W. *et al.* Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat. Neurosci.* **15**, 1227–1235 (2012).
39. Larson, M. *et al.* The complex PrP<sup>C</sup>-Fyn couples human oligomeric A $\beta$  with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **32**, 16857–16871 (2012).
40. Mallucci, G. *et al.* Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**, 871–874 (2003).
41. Li, R. *et al.* Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid- $\beta$  protein-induced neuron death. *J. Neurosci.* **24**, 1760–1771 (2004).
42. He, P. *et al.* Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid  $\beta$  generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J. Cell Biol.* **178**, 829–841 (2007).
43. Williams, A., Van Dam, A.M., Ritchie, D., Eikelenboom, P. & Fraser, H. Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E<sub>2</sub> and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res.* **754**, 171–180 (1997).
44. Mehlhorn, G., Hollborn, M. & Schliebs, R. Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical  $\beta$ -amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 423–431 (2000).
45. Perry, V.H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav. Immun.* **18**, 407–413 (2004).
46. Holmes, C. *et al.* Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* **73**, 768–774 (2009).
47. Singh, T. & Newman, A.B. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res. Rev.* **10**, 319–329 (2011).

## ONLINE METHODS

**Antibodies.** The mouse monoclonal antibodies SAF32 (A03202), SAF61 (A03205) and SAF83 (A03207) (SPI-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France) were used to detect PrP. The rabbit polyclonal antibody to TNFR1 (JM-3125) was from MBL International (Woburn, MA, USA). Rabbit polyclonal antibodies to TACE (1131) and active caspase-3 (3015) were purchased from QED Bioscience (San Diego, CA, USA) and Biovision (Mountain View, CA, USA), respectively. The rabbit polyclonal antibody to MAP2 (AB5622) was from EMD Millipore (Darmstadt, Germany). The mouse monoclonal antibody to actin (NB600-535) was from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). Rabbit polyclonal antibodies to caveolin-1 (Cav-1) (610059) and focal adhesion kinase (FAK) (sc-932) were obtained from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), respectively. Specific rabbit antibody to phosphothreonine (71-8200) was from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Mouse monoclonal antibody to  $\beta$ -amyloid (4G8) (SIG-39220) was from Covance (Princeton, NJ, USA). When nonspecified, primary antibodies were used at 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for western blot experiments and at 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for immunofluorescence experiments.

**Human Alzheimer's disease samples.** CSF and frozen post-mortem temporal cortex samples were obtained from six patients and six age- and sex-matched controls (Supplementary Table 2) enrolled in a research project approved by the Ethics Committee of Bichat University Hospital (Paris, France). All patients or caregivers gave their written informed consent for CSF assessment and for using post-mortem tissues. The post-mortem intervals (PMIs) never exceeded 24 h. All these patients had a history of progressive dementia. Diagnoses were established by a multidisciplinary team of neurologists and neuropsychologists specialized in cognitive disorders. Diagnosis of Alzheimer's disease was made according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria<sup>48</sup>. Age-matched controls had no history of progressive dementia. They were dyspneic, gave informed consent and were recruited from the emergency and internal medicine departments of Lariboisière hospital (Paris, France).

**Mice.** Adult C57Bl/6J mice were bred and underwent experiments in level-3 biological risk containment, respecting European guidelines for the care and ethical use of laboratory animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). Mice were inoculated with the mouse-adapted 6PB1 bovine spongiform encephalopathy strain or with the cerebellotropic 22L scrapie strain<sup>49</sup> (CNRS Strasbourg, France). 200 Tg2576 (ref. 28) or 3xTg-AD<sup>32</sup> or 5xTg-AD<sup>33</sup> mice of both sexes (all from Hoffmann LaRoche, Basel, Switzerland) were used as models of Alzheimer's disease. CSF was collected from the cisterna magna under anesthesia with 3% isoflurane. All animal procedures were approved by the Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (France) and the Animal Care and Use Committee at Basel University (Switzerland).

**Chronic intraperitoneal injection of BX912 into mice.** Mice were fasted overnight but allowed water *ad libitum* before the experiment. They were then anesthetized with isoflurane inhalation, and a midline incision was performed to insert into the peritoneum the polyethylene catheter of an osmotic pump (Alzet, Cupertino, CA, USA). BX912 or vehicle (1% DMSO in sterile normal saline buffer) was administered at a flow rate of 0.25  $\mu\text{L per h}$ , which corresponded to 100  $\mu\text{g per mouse per day}$  (5  $\text{mg kg}^{-1}$  per day). Pumps were replaced every 4 weeks.

**In vivo siRNA-mediated silencing.** To decrease PDK1 expression *in vivo*, 2  $\mu\text{g}$  of siRNA directed against PDK1 (1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) was injected into the third ventricle three times at 36-h intervals<sup>50</sup> 7 d before behavioral and biochemical analyses. We considered that PDK1 was efficiently silenced when PDK1 activity measured in brain extracts of siRNA-injected mice was reduced by more than 60% as compared to that of siScr-injected mice.

**Behavioral testing.** Motor function in 22L-infected mice was assessed by the static rod test<sup>51</sup>. For Alzheimer's disease mouse models, contextual

fear conditioning<sup>52</sup>, Morris water maze task<sup>52</sup> and nest building<sup>31</sup> tests were performed as previously reported.

**Cell culture and prion infection.** 1C11 cells chronically infected or not by the mouse-adapted 22L or Fukuoka (Fk) strains<sup>18</sup> were grown and induced to differentiate along the serotonergic (1C11<sup>5-HT</sup>) pathway<sup>17</sup>. Primary CGNs were isolated from dissociated cerebella of 4- to 5-day-old C57Bl/6J mice and infected by the 22L/Fk strains<sup>19</sup>.

**Isolation and culture of Alzheimer's disease neurons.** Cultures of adult hippocampal AD neurons were established from Tg2576 mice as previously reported<sup>53</sup>.

**Cell viability assays.** The viability of  $\sim 1 \times 10^5$  infected or uninfected 1C11 or 1C11<sup>5-HT</sup> cells exposed to recombinant mouse sTNF- $\alpha$  (Biosource International, Camarillo, CA, USA) was evaluated by the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)<sup>36</sup>. Neuronal dysfunction in 22L-infected and uninfected CGNs was evaluated by sTNF- $\alpha$ -induced dendritic fragmentation. CGNs seeded (5.10<sup>5</sup> cells per well) in 12-well plates coated with poly-D-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were exposed to sTNF- $\alpha$ . Cells were then fixed and stained with an anti-MAP2 antibody. After imaging with a fluorescence microscope (Zeiss Leica), cells showing fragmented versus nonfragmented dendrites were counted using ImageJ software. Investigators were blinded to treatment conditions.

**Immunofluorescent labeling.** Immunofluorescent labeling of PrP<sup>C</sup>, TNFR1, TACE and MAP2 was performed using standard protocols as reported in refs. 19 and 54. Immunolabeling was analyzed using a Leica DMI6000 B microscope (Wetzlar, Germany) and subjected to image analysis with AQUA software<sup>55</sup>.

**Cell extract preparation, PNGase assay and western blot analyses.** Cells were washed in PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> and incubated for 30 min at 4 °C in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitors (Roche)). After centrifugation of the lysate (14,000g, 15 min), the protein concentration in the supernatant was measured with the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA). For the PNGase assay, protein extracts were incubated with 500 U N-glycosidase F (PNGase, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for 1 h at room temperature. Solubilized proteins (20  $\mu\text{g}$ ) were resolved by 10% SDS-PAGE. After transfer, blocked membranes were incubated with 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  SAF61 primary antibody. Bound antibodies were revealed by enhanced chemiluminescence detection (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). To standardize the results, membranes were rehybridized with an anti-actin antibody. The ratio between the truncated form of PrP (C1 fragment) and full-length PrP (Native)<sup>56</sup> was evaluated by densitometric analyses using ImageJ software.

**Soluble TNF- $\alpha$  receptor type 1 quantification.** The amount of sTNFR1 was measured in cell culture medium or CSF by ELISA using the Mouse/Rat TNF RI/TNFRSF1A Quantikine ELISA Kit (MRT10) according to the manufacturer's instructions (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

**TNFR1 expression and PrP<sup>Sc</sup> deposition in the brains of prion-infected mice.** Prion-infected ( $n = 3$  6PB1-inoculated and  $n = 3$  22L-inoculated) and control uninfected ( $n = 6$ ) mice were killed at 90 (6PB1) and 130 (22L) d after infection by cervical dislocation. Brains were removed and immersed for 24 h in Carnoy's fixative before being dehydrated and embedded in paraffin. Transverse sections (7  $\mu\text{m}$  thick) were cut, and immunoperoxidase staining protocols were used for the detection of PrP<sup>Sc</sup> and TNFR1 using SAF32 (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and anti-TNFR1 (2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) antibodies, respectively<sup>49,57,58</sup>. The specificity of PrP<sup>Sc</sup> immunodetection was achieved by denaturing the PrP<sup>C</sup> by incubation of the sections in proteinase K (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 10 min at 37 °C and subsequently in 3.4 M guanidine thiocyanate for 15 min. The PrP- and TNFR1-bound antibodies were visualized using HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA), respectively, and the Vectastain ABC kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA).



**PrP<sup>C</sup> or PDK1 silencing and enzyme inhibition.** Cells were transfected with siRNA against PrP<sup>C</sup> (refs. 16,36) or PDK1 (target sequence: AACUGGCCACUCCAGAGAAU) using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

TACE activity was inhibited with TNF- $\alpha$  processing inhibitor-2 (TAPI-2; Peptides International, Louisville, KY, USA). Src kinase, PI3K, PDK1 and MEK-ERK1/2 kinase activity were inhibited with 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine (PP2) (Calbiochem, San Diego, CA, USA), wortmannin (Calbiochem, San Diego, CA, USA), BX912 (Axon Medchem BV, Groningen, The Netherlands) and PD98059 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), respectively.

**TACE immunoprecipitation.** TACE immunoprecipitation was performed according to standard protocols by using protein A-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) coupled to anti-TACE antibody and 100  $\mu$ g of proteins of cell extracts. Immunoprecipitates were analyzed by western blotting using anti-TACE and specific anti-pan phosphothreonine (p-Thr) antibodies as described in ref. 54.

**Sucrose gradient fractionation of cell membranes.** TACE was detected by western blot analysis after sucrose gradient membrane fractionation of cell extracts performed under detergent-free conditions to isolate low buoyant fractions enriched in caveolin-1 proteins<sup>59</sup>. The cell surface biotinylation assay was performed with EZ-link sulfo-NHS-SS-biotin according to the manufacturer's instructions (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA). After sucrose gradient fractionation, biotinylated TACE was immunoprecipitated and detected by HRP-conjugated streptavidin. To detect PDK1-dependent TACE translocation back to plasma membrane, infected cells were treated for 1 h with BX912 (1  $\mu$ M) at 37 °C. Temperature block was performed at 4 °C. TACE was mutated at Thr735 into aspartic acid or alanine and these constructs were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) into uninfected 1C11<sup>5-HT</sup> neural cells<sup>60</sup>.

**Duolink proximity ligation assay.** Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and then washed with PBS. After permeabilization with 0.05% saponin, coverslips were blocked with PBS/3% ovalbumin for 30 min. Immunostaining was performed by simultaneous incubation of anti-TACE and anti-caveolin-1 antibodies. The Duolink proximity ligation assay was subsequently performed by J.M.L. (who was blinded to the treatment conditions) as instructed by the manufacturer (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden).

**Immuno-electron microscopy.** Cells, grown to ~80% confluency, were rinsed twice with PBS, collected in PBS and 10 mM EDTA, and rinsed twice with PBS. The cell pellet was fixed with 0.2% phosphate-buffered glutaraldehyde for 20–120 s and blocked with bovine albumin. Processing of cells for ultrathin cryosectioning and immunolabeling was performed indirectly<sup>61</sup>, with 5- or 8-nm gold particles conjugated with affinity-purified goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)<sup>62</sup>. The labeled specimens were negatively stained with sodium silicotungstate, and images were captured with a JEOL CX100 transmission electron microscope.

**Caveolin-1 immunosequestration.** Caveolin-1 immunosequestration was performed by cell bombardment with tungsten microprojectiles coated with antibody to Cav-1 (ref. 21).

**Two dimensional gel electrophoresis.** Two dimensional gel electrophoresis of TACE was performed according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with  $\sim 1 \times 10^6$  cells.

**Measurement of PDK1 activity.** PDK1 activity was measured in cell extracts using a fluorescently labeled PDK1 substrate (5FAM-ARKRERTYSFGHHA-COOH, Caliper Life Sciences, Hanover, MD, USA) as reported in ref. 63. The relative amounts of substrate peptide and product phospho-peptide were determined using a Caliper EZ-reader (Caliper Life Sciences, Hanover, MD, USA).

**PrP<sup>res</sup> quantification.** The amount of proteinase K-resistant PrP (PrP<sup>res</sup>) in infected cell extracts or brain extracts of 22L-infected mice treated or not with

BX912 were determined using a PrP-specific sandwich ELISA<sup>64</sup> after proteinase K digestion (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) for 1 h at 37 °C.

**Internal granular layer staining.** Brains were frozen in dry ice. Parasagittal tissue sections (12  $\mu$ m) were mounted on slides previously coated with 2% 3-aminopropyl-tri-ethoxysilane in acetone (EGA, Steinheim, Germany) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4 for 20 min, followed by three 5-min washing steps in PBS. Sections were air dried and stored at -20 °C until use. The sections were immunostained for PCNA<sup>65</sup>, and evaluation of viable cells performed with the <sup>131</sup>I-labeled staphylococcal protein A (SpA) binding test<sup>66</sup>. Nissl-counterstained sections were examined with bright-field and dark-field optics using a Zeiss Axiophot. The films were used as negatives to produce reverse images, that is, white areas revealing high levels of hybridization signal on a dark background.

**In vivo amyloid plaque detection.** Amyloid plaques in Tg2576, 3xTg-AD and 5xTg-AD mouse models were detected by PET imaging as reported in ref. 30 using a microPET FOCUS F120 scanner (Siemens Medical Solutions, Bern, Switzerland). The Pittsburgh B compound was from Scintomics (Fuerstenfeldbruck, Germany) and used at a concentration of 1.5 nmol l<sup>-1</sup>.

**A $\beta$  plaque staining and quantification.** Tg2576 mice were killed by cervical dislocation at 275 d. Detection of A $\beta$  plaques in the cortex and the hippocampus was performed by using 4G8 antibody (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) overnight at 4 °C. Tissue sections were next incubated with biotinylated anti-mouse secondary antibody (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and incubated for 30 min at room temperature. Then, samples were rinsed and incubated with the Vectastain ABC reagent (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min. Preparations were then covered with diaminobenzidine at room temperature, gently washed with water, covered with Mayer's hematoxylin, dehydrated with ethanol and xylene and mounted with Super Mount (Innogenex, San Ramon, CA, USA). Samples were analyzed using a Leica DMI6000 B microscope (Wetzlar, Germany) and subjected to image analysis with AQUA software. The number of A $\beta$  plaques was estimated by counting the number of 4G8-positive deposits per slice (expressed as number of A $\beta$  deposits per mm<sup>2</sup>). The load of amyloid was estimated by the area stained by 4G8 antibody in relation with the total area analyzed. The investigator was blinded to the treatment conditions.

**sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> quantification.** The analysis of the different APP cleavage products (sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub>) was performed using one- and two-dimensional gel electrophoresis, immunoblotting and mass spectrometry<sup>67</sup>. Quantifications were achieved by a stable-isotope dilution methodology in combination with LC-MS/MS<sup>68</sup>.

**Data analysis.** An analysis of variance of the cell/animal response group was performed using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA, USA). Values are given as means  $\pm$  s.e.m. Significant responses ( $P < 0.05$ ) are marked by symbols (\*,\*) and their corresponding  $P$  values are provided in figure legends. Survival times were analyzed by Kaplan-Meier survival analysis using a log-rank test for curve comparisons.

48. McKhann, G. *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939–944 (1984).
49. Vidal, C. *et al.* Early dysfunction of central 5-HT system in a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *Neuroscience* **160**, 731–743 (2009).
50. Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.M. & Kellermann, O. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* **329**, 1537–1541 (2010).
51. Kempster, S., Bate, C. & Williams, A. Simvastatin treatment prolongs the survival of scrapie-infected mice. *Neuroreport* **18**, 479–482 (2007).
52. Cramer, P.E. *et al.* ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **335**, 1503–1506 (2012).
53. Brewer, G.J. & Torricelli, J.R. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat. Protoc.* **2**, 1490–1498 (2007).
54. Loubet, D. *et al.* Neurogenesis: the prion protein controls  $\beta$ 1 integrin signaling activity. *Faseb J.* **26**, 678–690 (2012).
55. McCabe, A., Dolled-Filhart, M., Camp, R.L. & Rimm, D.L. Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1808–1815 (2005).

56. Mouillet-Richard, S., Laurendeau, I., Vidaud, M., Kellermann, O. & Laplanche, J.L. Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes Infect.* **1**, 969–976 (1999).
57. Bailly, Y. *et al.* 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**, 244–269 (2004).
58. Heitz, S. *et al.* BAX contributes to Doppel-induced apoptosis of prion-protein-deficient Purkinje cells. *Dev. Neurobiol.* **67**, 670–686 (2007).
59. Song, K.S. *et al.* Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* **271**, 9690–9697 (1996).
60. Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W.H. & Murphy, G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF- $\alpha$ -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J. Cell Sci.* **118**, 2371–2380 (2005).
61. Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., Lienhard, G.E. & James, D.E. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* **113**, 123–135 (1991).
62. Slot, J.W. & Geuze, H.J. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* **38**, 87–93 (1985).
63. Hofler, A. *et al.* Study of the PDK1/AKT signaling pathway using selective PDK1 inhibitors, HCS, and enhanced biochemical assays. *Anal. Biochem.* **414**, 179–186 (2011).
64. Bate, C., Langeveld, J. & Williams, A. Manipulation of PrPres production in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Methods* **138**, 217–223 (2004).
65. Raucci, F. *et al.* Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis. *J. Chem. Neuroanat.* **32**, 127–142 (2006).
66. Moss, T.J., Rosenblatt, H.M. & Seeger, R.C. Expression of a developmental stage-specific antigen by neuronal precursor cells of human fetal cerebellum. *J. Neuroimmunol.* **20**, 3–14 (1988).
67. Schieb, H. *et al.*  $\beta$ -amyloid peptide variants in brains and cerebrospinal fluid from amyloid precursor protein (APP) transgenic mice: comparison with human Alzheimer amyloid. *J. Biol. Chem.* **286**, 33747–33758 (2011).
68. Ciccimaro, E. & Blair, I.A. Stable-isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis. *Bioanalysis* **2**, 311–341 (2010).



Audrey RAGAGNIN

## Mort neuronale et maladies à prions



### Résumé

La conversion conformationnelle de la protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup> neuroprotectrice en protéine prion PrP<sup>Sc</sup> infectieuse et pathogène caractérise les maladies à prions. Dans le cerveau infecté par les prions, la perte de PrP<sup>C</sup>, le gain de PrP<sup>Sc</sup> neurotoxique et l'inflammation concourent à la mort neuronale par des mécanismes encore mal connus.

Ces travaux valident les cultures organotypiques de cervelet de souris comme système expérimental *ex vivo* favorable à l'étude de ces mécanismes et montrent que l'absence de PrP<sup>C</sup> aussi bien que PrP<sup>Sc</sup> activent des mécanismes apoptotiques et autophagiques qui conduisent à la mort des cellules de Purkinje du cervelet. Une deuxième étude *in situ* chez la souris montre que la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cervelet est un paramètre endogène de la pathogenèse des prions de tremblante 22L. Une troisième série d'expériences *in situ* montre que les prions provoquent l'augmentation du récepteur TNFR1 de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  à la membrane des astrocytes enveloppant les synapses excitatrices des cellules de Purkinje dans le cortex cérébelleux de souris infectées. Ceci implique une composante astrocytaire dans la réaction des complexes synaptiques aux prions.

### Abstract

The conversion of the protective cellular prion protein PrP<sup>C</sup> into an infectious, neurotoxic conformer PrP<sup>Sc</sup> is a feature of prion diseases. In the prion-diseased brain, the loss of PrP<sup>C</sup>, the production of pathogenic PrP<sup>Sc</sup> and inflammation contribute to neuronal death by still unknown mechanisms.

The present results validate cerebellar organotypic cultures as a valuable experimental system to study *ex vivo* these mechanisms and provide insight into the apoptotic and autophagic processes activated by the absence of PrP<sup>C</sup> in *Prnp*-deficient mice and by PrP<sup>Sc</sup> prions and lead to the death of the cerebellar Purkinje cells. A second line of research *in situ* showed that the anatomo-functional compartmentation of the mouse cerebellum is an endogenous parameter of the pathogenesis of the 22L scrapie prions. Finally, another *in situ* approach revealed that prions increase the levels of TNFR1, a receptor for the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , at the membrane of the astrocytes enveloping Purkinje cell excitatory synapses in the cerebellar cortex of infected mice. This implies that the response of synaptic complexes to prions involves a glial component.