



HAL
open science

Implication de l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) dans les mécanismes de prionisation & identification de nouvelles molécules antiprion

Phuhai Nguyen

► **To cite this version:**

Phuhai Nguyen. Implication de l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) dans les mécanismes de prionisation & identification de nouvelles molécules antiprion. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0026 . tel-01434507

HAL Id: tel-01434507

<https://theses.hal.science/tel-01434507>

Submitted on 13 Jan 2017

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.

THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'université européenne de Bretagne

Ecole Doctorale SICMA

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention : Biologie Cellulaire

**Implication de l'activité chaperon de protéines du
ribosome (PFAR) dans les mécanismes de
prionisation
&
Identification de nouvelles molécules antiprion**

Présentée par :
Phuhai NGUYEN

Dirigée par :
Cécile VOISSET
Marc BLONDEL

Le 11 Décembre 2013
Devant le jury composé de :

M. Reynald GILLET
M. Xavier LE GOFF
M. Hervé GALONS
M. Frédéric BIHEL
Mme. Cécile VOISSET
M. Marc BLONDEL

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, j'exprime ma gratitude aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de prendre du temps pour évaluer mon travail de thèse. Merci à Reynald Gillet et à Xavier Le Goff d'avoir accepté d'être rapporteurs. Merci à Hervé Galons et à Frédéric Bihel d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail.

Merci au jury de comité de thèse de 1^{ère} et 2^{ème} année d'avoir évalué mes travaux, merci à Reynald Gillet, Frédéric Bihel, Jean-Yves Thuret et Vincent Béringue.

Merci à Marc, Cécile et Olivier pour leur aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Une thèse est une aventure personnelle qui représente trois années, de difficultés, de satisfactions, de déceptions, de rencontres scientifiques, de discussions, de bonne ou de mauvaise humeur. Mais une thèse est également une aventure collective et humaine, si cette thèse est bien effectuée dans de bonnes conditions c'est grâce à toutes ces personnes que je voudrais remercier.

Je tiens à remercier sincèrement Marc Blondel, mon directeur de thèse pour avoir eu confiance en moi pendant ces 3 années. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel sujet intéressant. Il m'a impressionné par son savoir et sa personnalité. Durant ces 3 années, il m'a transmis son enthousiasme, sa curiosité et son amour pour la science et tant d'autres choses sur le plan humain. Ses conseils, discussions, interprétations et théories toujours passionnées m'ont permis de me construire et d'apprendre à gérer un projet.

Je tiens à remercier vivement Cécile Voisset, ma co-directrice de thèse, qui m'a encadré au quotidien. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir été patiente avec moi. Merci pour tout le temps qu'elle a consacré à m'encadrer et me corriger. Merci pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique. Merci d'avoir toujours dirigé mes recherches dans la bonne direction.

Mon travail de thèse a été très bien effectué dans cette merveilleuse équipe que je souhaite aussi remercier chaleureusement. Grâce à vous, le temps passé au labo est devenu des moments agréables. Merci Flavie pour toutes les formations en levure que tu m'as données. Merci Olivier pour tes travaux de stage formidable, d'avoir corrigé mon français. Merci Hélène, on peut toujours compter sur toi pour avoir des

bonnes conditions de travail. Merci Marie-Astrid et Justine qui m'entourent au bureau, merci de m'avoir supporté au quotidien. Merci Déborah et Gaëlle et Majo pour votre enthousiasme. Merci pour votre disponibilité, votre aide et surtout pour les bons moments que j'ai passé avec vous.

Un très grand merci à toute ma famille, particulièrement mes parents et mes sœurs qui croient toujours en moi et qui m'ont encouragé de poursuivre ma passion pour la biologie.

Enfin, merci ma chérie Minh Chi pour son soutien quotidien, pour tout ce qu'elle m'a donné.

Résumé

Les maladies à prion font partie des maladies neurodégénératives. L'agent responsable est la protéine prion PrP^{Sc}. La conversion de la forme cellulaire native PrP^C en forme pathologique PrP^{Sc} et son agrégation sous forme des fibres amyloïde constituent des éléments clés de la physiopathologie des maladies à prion. Pourtant, les mécanismes contrôlant/favorisant cette conversion sont très mal connus. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il n'existe pas d'homologue de la protéine PrP, mais des protéines se comportant comme des prions existent, telle que Sup35p qui est responsable du prion [PSI⁺] ou encore la protéine Ure2p qui est responsable du prion [URE3]. Lors d'études antérieures à cette thèse, le laboratoire a isolé la 6AP et le GA, des molécules actives contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3] et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} dans des tests cellulaires ainsi que *in vivo* dans un modèle murin pour les maladies à prion. Ces résultats démontrent au moins certains des mécanismes de prionisation sont conservés de la levure aux mammifères. L'équipe a ensuite montré que la 6AP et le GA étaient des inhibiteurs spécifiques et compétitifs de l'activité chaperon de protéines du ribosome (ou PFAR pour Protein Folding Activity of the Ribosome). Ces résultats suggéraient donc que l'activité PFAR représente un nouveau mécanisme de prionisation conservé de la levure aux mammifères. Par ailleurs, la 6AP et le GA s'étant révélées actives dans des modèles pour d'autres maladies neurodégénératives à fibres amyloïdes, l'activité PFAR pourrait également être un acteur physiopathologique majeur de ces protéinopathies. Ma thèse avait deux objets : tester l'implication de l'activité PFAR dans l'apparition et/ou la propagation des prions et enfin identifier de nouvelles molécules antiprion et comprendre leurs mécanismes d'action. Mes résultats montrent que l'activité PFAR joue bien un rôle dans la propagation des prions de levure. En effet, l'enrichissement en PFAR favorise l'apparition spontanée du prion [PSI⁺]. Il conduit également à une instabilité accrue de ce même prion. Ainsi, l'activité PFAR ressemble à celle du chaperon de protéine Hsp104p, une protéine indispensable au maintien et à la propagation de tous les prions de levure, mais qui n'a pas d'homologue chez les mammifères. Mes résultats suggèrent que les activités PFAR et Hsp104p sont partiellement redondantes pour le maintien des prions chez la levure et que, chez les mammifères, seule l'activité PFAR jouerait ce rôle. Parallèlement, nous avons identifié de nouvelles familles de molécules antiprion, actives tant contre les prions de levure que de mammifères. Ces molécules inhibent toutes l'activité PFAR. Nos résultats contribuent ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes de prionisation. Ils indiquent également que l'activité PFAR est une cible thérapeutique prometteuse pour les maladies à prion, mais aussi probablement pour d'autres protéinopathies beaucoup plus fréquentes.

Mots clés : prion, levure, ribosome, chaperon de protéines, Hsp104.

Abstract

Prion diseases are considered neurodegenerative diseases. The incriminated agent is the prion protein PrP^{Sc}. The conversion of PrP from its native conformation PrP^C to the pathologic form PrP^{Sc} is the major element of the pathogenesis of prion diseases. However, the mechanisms involved in this conversion are poorly understood. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, there is no counterpart of the PrP protein. However proteins acting as prion do exist in yeast, such as the Sup35 protein responsible for the prion [PSI⁺], or the Ure2 protein responsible for the prion [URE3]. In previous studies, our team isolated two compounds, 6AP and GA, which are active against the yeast prions [PSI⁺] and [URE3] and against the mammalian prion PrP^{Sc} in cell-based assays as well as *in vivo* in a mouse model for prion diseases. These results demonstrated that the prionisation mechanisms are at least partially conserved from yeast to mammals. 6AP and GA specific and competitive inhibitors of the Protein Folding Activity of the Ribosome (PFAR) thereby showing that the PFAR is one conserved mechanism of the prionisation. Moreover, 6AP and GA have been proven active against other amyloid diseases thus placing the PFAR as a key player in the pathophysiology of protein folding diseases. My thesis aims were to test the involvement of the PFAR in the initiation and / or propagation of prion, to identify new antiprion molecules and to understand their mechanisms of action. My results show that the PFAR plays a central role in the yeast prion propagation. Indeed, PFAR enrichment promotes the spontaneous appearance of the prion [PSI⁺] and at the same time leads to an increased instability of the same prion. Thus, PFAR activity resembles the yeast Hsp104p chaperone protein activity in the maintenance and propagation of all yeast prions. My results suggest that the PFAR and Hsp104p activity are partially redundant and that only the PFAR should play this role in mammals. Meanwhile, we have identified new antiprion drugs that are active against both yeast and mammal's prions. These compounds are all inhibitors of the PFAR. Our results contribute to a better understanding of the prionisation mechanisms and indicate that the PFAR is a promising therapeutic target for prion diseases and probably also for common protein folding diseases.

Keywords: prion, yeast, ribosome, protein chaperon, Hsp104.

PLAN DU MANUSCRIT

ABREVIATIONS	10
I. Le prion chez les mammifères	12
I.1 Prion : ni virus, ni bactérie, une nouvelle forme d'agent infectieux.....	15
I.2 Les ESST animales et humaines.....	15
I.2.1 Les ESST animales.....	18
I.2.1.1 La tremblante du mouton	18
I.2.1.2 L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB).....	19
I.2.2 Les ESST humaines.....	20
I.2.2.1 La forme sporadique	20
I.2.2.2 Transmission héréditaire	21
L'insomnie familiale fatale (IFF).....	22
Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS).....	23
I.2.2.3 Transmission iatrogène	24
I.3 La protéine PrP	25
I.3.1 Le gène PRNP code une protéine de 253 résidus qui est le précurseur de la PrP	25
I.3.2 La protéine PrP ^C	26
I.3.2.1 Structure de la PrP ^C	26
I.3.2.2 Localisation cellulaire de la PrP ^C	29
I.3.2.3 Recyclage et dégradation de la PrP ^C	30
I.3.2.4 Fonctions de la PrP ^C	31
(i) Fonction de la PrP ^C dans l'adhérence cellulaire	32
(ii) Fonction de la PrP ^C dans la survie cellulaire	33
Régulation du métabolisme du cuivre et protection contre le stress oxydatif	33
Protection contre l'apoptose.....	33
I.3.3 De PrP ^C à PrP ^{Sc} : un changement de conformation associé aux ESST	35
I.3.3.1 La conformation pathologique PrP ^{Sc}	35

(i)	Structure de la PrP ^{Sc}	35
(ii)	Propriétés physico-chimiques de la PrP ^{Sc}	36
I.3.3.2	Lieux possibles de la conversion de PrP ^C en PrP ^{Sc}	38
I.3.3.3	Mécanismes moléculaires de la conversion de PrP ^C en PrP ^{Sc}	40
(i)	Modèle de conversion imposée par la matrice (figure 10A)	40
(ii)	Modèle de nucléation-polymérisation (figure 10B).....	40
(iii)	Modèle de nucléation assistée (figure 10C).....	40
II.	Autres prions	43
II.1	La protéine CPEB	43
II.2	TIA1	44
III.	Les prions de champignons	45
III.1	La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , un modèle simple pour l'étude des prions	45
III.2	Les prions de la levure <i>S. cerevisiae</i>	46
III.2.1	Le phénotype prion [<i>PSI+</i>] et la protéine Sup35	48
III.2.1.1	Structure de la protéine Sup35.....	48
III.2.1.2	Système rapporteur pour la visualisation de l'état prion [<i>PSI+</i>] de Sup35p	50
III.2.2	Le phénotype prion [<i>URE3</i>] et la protéine Ure2p	52
	Système rapporteur pour la visualisation de l'état prion [<i>URE3</i>] de Ure2p.....	54
III.2.3	Autres prions de <i>S. cerevisiae</i>	55
	Le phénotype [<i>PIN+</i>]	55
	Autres prions.....	56
III.3	Le prion [<i>Het-s</i>] de <i>Podospora anserina</i>	57
III.4	Propagation des prions de levure	59
III.5	Les facteurs interférant avec l'apparition et la propagation des prions de levure	61
III.5.1	Rôle du domaine prion	61
III.5.2	Les facteurs protéiques	63
III.5.2.1	Hsp104p : un facteur de tolérance aux stress.....	63
	Hsp104 : un facteur essentiel à la propagation des prions de levure	65
	Le cas particulier du chlorure de Guanidium (GuHCl).....	66
III.5.2.2	Rôle des autres chaperons de protéines	67

III.5.2.3	Btn2p et Cur1p.....	69
III.6	La prionisation, un moyen de contrôle épigénétique d'un gène qui peut être bénéfique	71
III.7	Utilisation du modèle levure pour identifier des composés antiprion.....	72
III.8	Mise en évidence de l'activité antiprion de la 6AP et du GA	75
III.8.1	La 6AP et le GA sont actifs contre les prions de levure et de mammifère.....	75
III.8.2	Identification des cibles cellulaires de la 6AP et du GA	77
III.8.3	Le ribosome est la cible des molécules antiprion 6AP et GA.....	78
III.8.3.1	Le ribosome : structure et fonctions.....	78
(i)	L'activité traductionnelle du ribosome.....	80
(ii)	L'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR).....	80
III.8.3.2	La 6AP et le GA ciblent spécifiquement la PFAR	82
IV.	Objectifs du projet de thèse	85
V.	Résultats	86
V.1	Implication de l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) dans les mécanismes de prionisation	88
V.1.1	Les preuves directes	88
V.1.2	Les preuves indirectes	89
V.1.2.1	Surexpression de l'ARNr 25S.....	89
V.1.2.2	L'enrichissement en PFAR par modification du ratio de grandes/petites sous-unités 60S/40S du ribosome	90
V.1.3	La PFAR et Hsp104p : un rôle similaire dans la propagation du prion [PS/+] ? ..	93
	La PFAR et l'activité chaperon d'Hsp104p sont partiellement redondantes	94
(i)	L'enrichissement en PFAR compense l'inhibition d'Hsp104p	95
(ii)	La surproduction d'Hsp104p compense l'inhibition de la PFAR.....	97
V.1.4	Rôle de PFAR dans le repliement des protéines lors d'un choc thermique.....	98
V.2	Identification de nouveaux composés antiprion et de leurs cibles cellulaires	116
V.2.1	Imiquimod, un agoniste du récepteur Toll-like 7, est actif contre les prions	118
	L'activité antiprion de l'IQ n'est pas due à son activité d'agoniste de TLR7	120
	L'IQ et ses dérivés inhibent spécifiquement l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR)	120
V.2.2	La Flunarizine possède une activité antiprion.....	134

(i)	La Flunarizine est active contre les prions de levure et de mammifère.....	134
(ii)	La Flunarizine et ses dérivés inhibent la PFAR	136
(iii)	L'activité antiprion de la Flunarizine est parallèle avec son activité antihistaminique	138
V.2.3	Identification de nouvelles molécules antiprion à partir de chimiothèques de composés originaux	141
V.2.3.1	Chimiothèque SYN.....	141
V.2.3.2	Chimiothèques de Strasbourg (RFM1/2 et CNS).....	142
(i)	La chimiothèque RFM1	142
(ii)	La chimiothèque RFM2	143
(iii)	La chimiothèque CNS	144
V.2.3.3	Les tests complémentaires dans la recherche des molécules agissant sur des cibles cellulaires, autres que la PFAR	148
V.3	Etudes de relations structure-activité (RSA) des molécules antiprion.....	151
V.3.1	Etude de la relation structure-activité autour du Guanabenz	151
	Contrairement au GA, le PSI 452 ne possède pas d'activité agoniste des récepteurs $\alpha 2$ adrénergiques.....	158
V.3.2	RSA autour de la 6-Amino phénanthridine (6AP)	160
VI	Discussions et perspectives	163
VI.1	La PFAR est réellement impliquée dans les mécanismes de prionisation	163
VI.2	La PFAR et les maladies du mauvais repliement des protéines	166
(i)	La maladie d'Alzheimer	166
(ii)	La maladie d'Huntington.....	167
(iii)	La maladie de Parkinson.....	167
(iv)	La sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	167
	La PFAR pourrait être impliquée dans les maladies associées à un mauvais repliement des protéines	168
	Le rôle de la PFAR en général ?	170
VI.3	Identification de nouvelles molécules antiprion et caractérisation de nouveaux acteurs cellulaires impliqués dans les mécanismes de prionisation.....	171
VII	Conclusion	174
	BIBLIOGRAPHIE	175

ABREVIATIONS

6AP	6-aminophenanthridine
6APi	Dérivé inactif de la 6AP
ACh	Anhydrase carbonique humaine
ADN	Acide déoxyribonucléique
AIR	5-aminoimidazole ribonucléotide
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATNC	Agent transmissible non conventionnel
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
CNS	Chimiothèque Nationale de Strasbourg
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DRM	Detergent resistant membranes
Dpl	Protéine Doppel
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
ESST	Encéphalopathies subaigües spongiformes transmissibles
GA	Guanabenz
GAi	Dérivé inactif du GA
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
GSS	Syndrome de Gerstmann-Straussler-Sheinker
GuHCl	Chlorure de Guanidine
Hsp	Heat shock protein
Htt	Huntingtin
IFF	Insomnie familiale fatale
IMAC	Chromatographie d'affinité avec des ions métalliques immobilisés
IQ	Imiquimod
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
fMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale
iMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène
sMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
vMCJ	Variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
NBD	Nucleotide binding domain
NCAM	Neural cell adhesion molecule
OR	Octapeptide repeat
PFAR	Protein folding activity of the ribosome
PK	Protéinase K
PolyQ	Polyglutamine
Prion	Proteinaceous infectious particule

Prnd	Gène codant la protéine Doppel
PRNP	Gène codant la protéine PrP
PrP	Protéine prion
CtmPrP	La protéine prion dont le domaine C-terminal est réticulaire et le domaine N-terminal cytosolique
NtmPrP	La protéine prion dont le domaine N-terminal est réticulaire et le domaine C-terminal cytosolique
PrP^C	Protéine prion cellulaire normale sensible aux protéases
PrP^{Sc} et PrP^{res}	Protéine prion scrapie infectieuse et résistante aux protéases
PTC	Peptidyl transferase center
RSA	Relation structure-activité
RE	Réticulum endoplasmique
RFM	Chimiothèque des molécules de la famille de l'arginine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
S	Sveldberg
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dimustase
STE	Stop transfer effector
STI	Stress protein Inducible
tgOv	Souris transgéniques exprimant la protéine PrP ovine
TLR	Toll-like receptor
USA	Ureidosuccinate
YPD	Yeast Peptone Dextrose (milieu riche pour les levures)

I. Le prion chez les mammifères

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) encore appelées maladies à prion, constituent une énigme biologique et l'unique exemple d'une maladie transmissible dont l'origine est encore inconnue. Il faut remonter le temps vers le 18^{ème} siècle pour trouver les premières observations cliniques décrites.

Elle a été appelée « Scrapie » ou « rubber» en Angleterre, « cuddi trot» en Ecosse, « der Trab » en Allemagne ou encore « tremblante du mouton ». Cette maladie a été diagnostiquée pour la première fois en 1730 dans une ferme du Lincolnshire en Angleterre et puis dans le reste de l'Europe en 1773. C'est une maladie mortelle qui se caractérise par l'apparition de troubles du comportement liés à une atteinte du système nerveux central. Par la suite, cette maladie a également été identifiée chez d'autres animaux tels que les chats, les cervidés, les visons, les vaches... (Collinge 2001; Prusiner 2001).

Dans les années 1920, deux neurologues allemands, Hans Creutzfeldt et Alfons Jakob identifiaient une nouvelle maladie neurodégénérative fatale chez l'homme qui portera leur nom : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Le terme de « maladie de Creutzfeldt-Jakob » a été introduit en 1922 par Spielmeyer pour décrire une maladie humaine caractérisée par une ataxie et une démence sans réponse immunitaire des patients atteints par cette maladie. Pendant les années suivantes, des nouveaux cas de MCJ ont été signalés dans des familles différentes (Prusiner 2010).

En 1959, Igor Klatzo, Carleton Gajdusek et Vincent Zigas ont réalisé une observation importante chez les populations de Papouasie-Nouvelle-Guinée qui pratiquent des rites de cannibalisme. Ils ont remarqué que la neuropathologie de la maladie du Kuru ressemble à celle de la MCJ (Klatzo, Gajdusek et al. 1959). Cette même année, le vétérinaire William Hadlow a souligné la ressemblance entre le Kuru et la tremblante du mouton (Prusiner 2010). Hadlow suppose que le Kuru pourrait être une maladie transmissible comme la tremblante du mouton. Il a également démontré la transmissibilité de la maladie du Kuru en injectant intracérébrale à des chimpanzés des tissus de cerveau issus de patients décédés de la maladie du Kuru. Neuf ans

plus tard, Gibbs, Gajdusek et leurs collègues ont rapporté la transmission de la MCJ aux chimpanzés suite à une inoculation intracérébrale (Gibbs, Gajdusek et al. 1968). Ces observations ont permis de regrouper toutes ces maladies humaines ou animales dans la même famille des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST).

L'identification de l'agent du scrapie responsable des ESST était un objectif primordial pour les chercheurs à cette époque. Plusieurs tentatives pour purifier l'agent du scrapie ou pour identifier les bio-marqueurs associés aux ESST ont échoué. Les caractéristiques non conventionnelles de cet agent du scrapie posaient beaucoup de difficultés pour les chercheurs (Prusiner 2010) :

- Le système immunitaire reste silencieux et les mécanismes de surveillance ne détectent pas l'infection.
- L'agent infectieux est extrêmement résistant aux radiations ionisantes et aux rayonnements ultra-violet (Gibbs, Gajdusek et al. 1978).

Les données sur la résistance aux radiations de l'agent du scrapie ont fait émerger plusieurs hypothèses sur la composition de cet agent dont la nature restait à déterminer (ADN viral, polysaccharides ou protéines). Dans les années 1970, le group d'Alan Dickinson a émis l'idée qu'un virus était responsable de ces ESST. Cependant, les procédés d'inactivation physico-chimiques de ces agents par la chaleur et les radiations étaient inefficaces, ce qui a remis en cause l'hypothèse virale (Rohwer 1991). De plus, les données concernant la présence d'acides nucléiques sont très ambiguës : certaines n'ont pas réussi à identifier un acide nucléique de la taille d'un génome potentiel (Kellings, Prusiner et al. 1994). Enfin, l'absence de réaction immunitaire, contrairement à ce qui est observé dans une infection virale conventionnelle humaine ou animale, ne soutient pas non plus cette théorie. Ce même groupe a également proposé l'hypothèse qu'un virino était responsable de ces ESST. Un virino est une structure hybride comprenant un très petit acide nucléique infectieux, non enveloppé, qui ne code pour aucune protéine virale reconnue par le système immunitaire. Il pourrait cependant se lier à des protéines de l'hôte pour former une coque, ce qui permettrait une protection en

échappant à la reconnaissance du système immunitaire (Dickinson, Meikle et al. 1968). Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée.

En 1967, Griffith a émis l'hypothèse de « la protéine seule » (ou « *protein only* ») selon laquelle l'agent infectieux responsable de la tremblante pourrait être une protéine ayant adopté un repliement alternatif. Cette protéine serait capable d'imposer sa conformation alternative à la protéine de l'hôte, ce qui constituerait le mode de propagation de cet agent (Prusiner 2010; Griffith 1967). Cette hypothèse s'est avérée correcte et elle a été confirmée par les travaux de S. Prusiner.

En 1982, Prusiner a publié une étude systématique portant sur l'inactivation de l'agent de la tremblante après transmission au hamster syrien. Il a montré que tous les traitements physico-chimiques détruisant les acides nucléiques étaient incapables d'inactiver cet agent infectieux. À l'inverse, tous les procédés chimiques et physiques qui détruisent ou détériorent les protéines entraînent une inactivation importante de l'agent infectieux. Lorsqu'un extrait de cerveau infecté était exposé à des protéases, l'agent infectieux était partiellement résistant. S. Prusiner a proposé d'introduire un nouveau terme pour désigner ce nouveau type d'agent infectieux vraisemblablement dépourvu d'acide nucléique et de nature essentiellement protéique : « prion » pour « proteinaceous infectious particle » (Prusiner 1982). Cette hypothèse est désormais admise par la communauté scientifique. Pour ces travaux remarquables, Stanley B. Prusiner a été récompensé par le prix Nobel en 1997.

Il est à noter que si Gajdusek a aussi reçu le prix de Nobel (1976) pour ses travaux sur le Kuru, Tikvah Alper et John Stanley Griffith qui sont à l'origine de l'hypothèse protéine seule, n'ont pas été récompensés.

I.1 Prion : ni virus, ni bactérie, une nouvelle forme d'agent infectieux

L'agent responsable des maladies à prions est donc un agent transmissible non conventionnel (ATNC). Son spectre de résistance aux rayonnements est plus proche de celui des protéines que de celui des acides nucléiques (Alper, Cramp et al. 1967). Les travaux de deux équipes Bruce Chesebro et Bruno Oesch, basés sur la purification de fractions infectieuses à partir de cerveaux de hamsters infectés, ont permis la découverte de la protéine prion PrP (prion protein) : La protéine PrP^C (prion protein cellular) est localisée à la surface des cellules nerveuses saines. Chez les animaux malades, cette protéine existe à la fois sous sa forme native et sous une forme alternative, pathologique appelée PrP^{Sc} (Sc vient de scrapie) ou PrP^{res} (pour résistante), qui n'est pas dégradée par les protéases et s'accumule dans le cerveau, entraînant une encéphalopathie (Oesch et al. 1985 ; Chesebro, Race et al. 1985). De nature protéique, les prions sont caractérisés par la capacité de transmettre les propriétés de l'isoforme pathogénique PrP^{Sc} à l'isoforme cellulaire PrP^C via des interactions protéine-protéine. Cette caractéristique serait responsable de l'infectiosité et conduirait à une destruction sélective des cellules nerveuse chez les mammifères.

Cette hypothèse protéique permettrait d'expliquer le caractère héréditaire et transmissible des ESST. De plus, l'impossibilité de transmettre la maladie chez des souris délétées du gène *PRNP* codant la protéine prion cellulaire renforce cette hypothèse protéique. La présence de PrP^C est donc indispensable à l'infection (Bueller, Aguzzi et al. 1993).

I.2 Les ESST animales et humaines

Aujourd'hui, un grand nombre de maladies à prion a été décrit chez les animaux et chez l'homme. Elles présentent une grande variété de signes cliniques tels que des troubles cognitifs, un dysfonctionnement moteur, une ataxie. Mais elles ont des caractéristiques communes comme leur durée d'incubation, leur profil lésionnel et leur signature biochimique :

- Toutes les ESST sont des maladies progressives, irréversibles et fatales.
- Elles présentent toutes une longue phase d'incubation asymptomatique qui peut aller jusqu'à 40 ans (Collinge, Whitfield et al. 2006), alors que la phase clinique est relativement courte (quelque semaines à quelques mois).
- Elles présentent toutes une dégénérescence du SNC due à l'accumulation de PrP^{Sc} : perte de coordination motrice, tremblements, démence et atteintes rétiniennes (Hortells, Monzon et al. 2006).
- Dans tous les cas d'ESST, des lésions de type spongiforme par vacuolisation au niveau des corps cellulaires neuronaux peuvent être révélées par un examen histologique post-mortem du tissu cérébral (figure 1A-E). Pour certaines ESST, des plaques amyloïdes constituées de dépôts protéiques amorphes sont observées (figure 1F).
- Il n'y a pas de réponse immunitaire spécifique cellulaire ou humorale chez les sujets atteints.
- Les ESST sont transmissibles à d'autres individus au sein d'une même espèce ou à d'autres espèces.

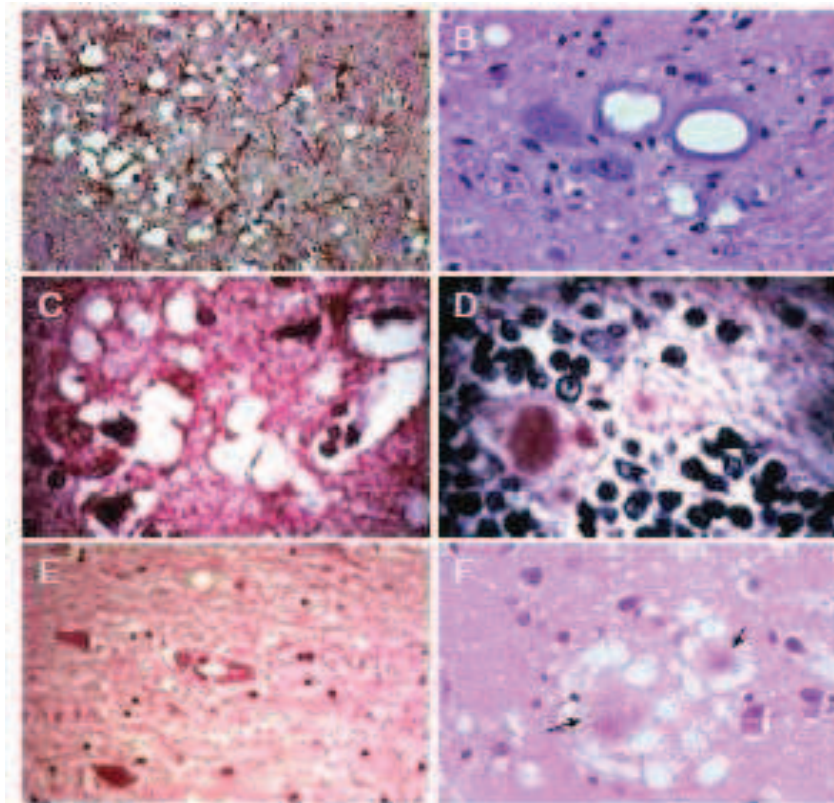


Figure 1. Coupes histologiques de cerveau de mouton. (A et B) atteint de tremblante ; (C et D) de cerveau humain atteint de maladie de Kuru; (E) de maladie de Creutzfeldt-Jakob ; (F) de variant de MCJ. Ces coupes mettent en évidence un phénomène de vacuolisation des corps neuronaux et des dépôts amyloïdes indiqués par les flèches noires (d'après Budka 2000 et www.inra.fr).

De plus, le profil électrophorétique de la protéine prion après digestion par la protéinase K (PK) diffère selon l'origine de la maladie à prion. Les trois formes glycosylée de la PrP, leur ratio, ainsi que la taille des fragments générés par la PK constituent une signature biochimique des différentes ESST (figure 2) (Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007).

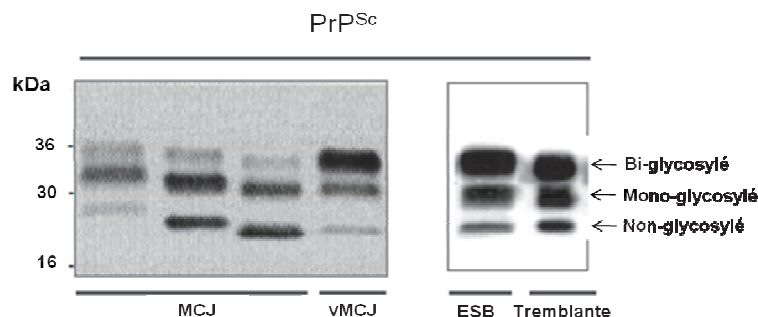


Figure 2. Signature biochimique de PrP^{Sc} (d'après Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007).

Le profil électrophorétique de PrP^{Sc} permet de caractériser les différentes souches de maladie à prion : MCJ, variant de MCJ (vMCJ), ESB (Encéphalopathie spongiforme bovin) et la tremblante.

I.2.1 Les ESST animales

Les ESST touchent plusieurs espèces animales telles que les chèvres, les visons, les cervidés, les félins mais les plus connues sont la tremblante du mouton (encore appelée scrapie) et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (tableau 1).

Tableau 1. Les maladies à prion chez les animaux.

Maladies	Espèces atteintes	Cause	Première observation
Tremblante	Ovins, chèvres	Lignées génétiquement sensibles par contact entre individus	Milieu de 18 ^{ème} siècle
Encéphalopathie transmissible du vison (ETV)	Visons	Infection par le prion de mouton	1947
Syndrome de dégénérescence chronique (CWD)	Cervidés nord-américains	Infection par un prion d'origine inconnue	1967
Encéphalopathie spongiforme Bovine (ESB)	Bovins, ruminants de zoo	Infection à partir de farines animales contaminées	1986
Encéphalopathie spongiforme féline (EFS)	Félins domestiques ou de zoo	Infection par des aliments d'origine animale	1990

I.2.1.1 La tremblante du mouton

La tremblante du mouton se caractérise par deux phases cliniques : (i) une atteinte nerveuse caractérisée par une hyperexcitabilité accompagnée de tremblements et (ii) un prurit invasif qui entraîne une disparition progressive de la toison et des lésions étendues liées au grattage (Deslys, Lasmezas et al. 2001). La tremblante touche les ovins mâles ou femelles âgés de 2 à 5 ans. Les premiers signes de la maladie apparaissent en moyenne vers 3,5 ans. Les ovins atteints survivent de un à six mois après les premiers signes cliniques, mais l'issue irrémédiablement est fatale. Les symptômes de la tremblante du mouton peuvent varier considérablement selon les animaux et les races d'ovins, mais, dans la plupart des cas, il s'agit d'une maladie neurologique à évolution lente. La maladie débute par de légers changements de comportement ou de tempérament ; viennent ensuite d'autres signes tels que des

tremblements de la tête ou du cou, une incoordination locomotrice, des démangeaisons, un amaigrissement etc. Les modes de transmission naturelle de la maladie n'ont pas encore tous été définis. Il y aurait probablement une transmission maternelle de la maladie à la descendance mais aussi aux autres agneaux se trouvant à proximité immédiate lors de la mise bas. La tremblante du mouton peut également être transmissible par le placenta, pâturage et par voie aérosol (Aguzzi, Nuvolone et al. 2013). Cette pathologie touche également la chèvre dont la période d'incubation peut atteindre 2 à 3 années (Deslys, Lasmezas et al. 2001)

I.2.1.2 L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

L'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), encore appelée maladie de la vache folle, est apparue en 1986 et est liée à la consommation par les bovins de farines animales préparées à partir de carcasses de moutons atteints de tremblante. Les individus atteints perdent fréquemment l'équilibre sans parvenir à se relever. La période d'incubation de l'ESB dure de 4 à 5 ans après la contamination. L'ESB affecte le cerveau et la moelle épinière des bovins. Elle provoque des lésions cérébrales qui se caractérisent par des altérations à allure spongieuse visibles au microscope optique, correspondant à des neurones qui se sont vacuolisés. Il y a une perte de neurones plus ou moins importante, et une multiplication des astrocytes et des cellules immunitaires cérébrales. Les agents pathogènes s'amassent pour former des plaques amyloïdes caractéristiques.

Dans les années 1990, l'ESB a été à l'origine de la plus grave crise qu'ait jamais connue l'élevage européen. Il s'agit de la crise de la vache folle : embargo sur le bœuf britannique, inquiétude voire panique des consommateurs, effondrement des cours, chute des revenus de toute une filière agricole, affrontements économiques et dissensions politiques. Diverses mesures ont été prises pour enrayer l'épidémie et préserver la santé humaine, comme l'interdiction d'utiliser les farines animales dans l'alimentation du bétail et des animaux d'élevage, le retrait de la consommation des produits considérés à risque, le dépistage de la maladie en abattoir et l'abattage systématique des troupeaux où un animal malade a été observé etc. Aujourd'hui, l'épidémie est presque complètement enrayerée, malgré 28 cas bovins encore

diagnostiqués dans 27 pays membres de l'Union européenne en 2011 (source commission européenne).

I.2.2 Les ESST humaines

Il existe trois types d'origine des maladies à prion chez l'homme : sporadique, héréditaire, et infectieuse (tableau 2).

Tableau 2. Les maladies à prion chez l'homme.

Maladies	Cause	Première observation
Kuru	Consommation rituelle de cerveau de cadavre lors de rites de cannibalisme mortuaire chez les Fores de Papouasie Nouvelle-Guinée	1957
Maladie de Creutzfeldt-Jakob		
• Sporadique (sMCJ)	Conversion spontanée de PrP ^C en PrP ^{Sc} ou mutation somatique	1920
• Héréditaire (fMCJ)	Mutation héréditaire du gène <i>PRNP</i> codant la protéine prion	1924
• Acquisée ou iatrogène (iMCJ)	Contamination due à des actes médicaux ou chirurgicaux : transplantation de cornées, greffe de dure-mère (méninge) ; injection d'hormones de croissance humaines extraites d'hypophyses de cadavres atteints de MCJ	1974
• Variant (vMCJ)	Contamination due à la consommation de matériel bovin atteint d'ESB	
Syndrome de Gerstmann-Strausler-Sheinker (GSS)	Mutation héréditaire du gène <i>PRNP</i> (P102L, P105L et A117V)	1936
Insomnie familiale fatale (IFF)	Mutation héréditaire du gène <i>PRNP</i> (D178N, M129)	1986
Insomnie fatale sporadique (FSI)	Conversion spontanée de PrP ^C en PrP ^{Sc} ou mutation somatique	1999
VPSPr	Conversion spontanée de PrP ^C en PrP ^{Sc} ou mutation somatique	2008

I.2.2.1 La forme sporadique

La forme sporadique de la MCJ (sMCJ) est la plus fréquente. Elle représente 85% des cas de MCJ avec une incidence de 1-2 cas/million au sein de la population. Elle touche les hommes autant que les femmes à un âge moyen de 62 ans. C'est une maladie d'incubation longue et silencieuse, évoluant toujours vers le décès. Elle entraîne une dégénérescence du système nerveux central, sans réaction

inflammatoire ou immunitaire, avec accumulation de l'isoforme prion (PrP^{Sc}) de la protéine PrP. La sMCJ débute vers 60 ans, et évolue en moyenne en 6 mois. C'est une démence avec des anomalies neurologiques (myoclonies, signes cérébelleux et visuels...). La cause de la MCJ sporadique est inconnue. Aucune mutation n'est observée au niveau du gène *PRNP* codant la PrP mais le génotype homozygote (méthionine/méthionine) au niveau du codon 129 de *PRNP* constitue un facteur de risque de la maladie.

En 2008, une nouvelle maladie à prion sporadique a été décrite, il s'agit de la VPSPr (Variably protease sensitive prionopathy) qui a des similitudes avec la MCJ mais la protéine sous forme pathologique PrP^{Sc} est moins résistante à la digestion par les protéases, d'où le nom VPSPr (Head, Yull et al. 2013). Les patients présentent des symptômes psychiatriques, des déficits de la parole (aphasie et/ou dysarthrie), et aussi des déficiences cognitives. Cette maladie est très rare avec une incidence variant de 2 à 3 pour 100 millions de personnes. L'âge moyen des patients est de 70 ans et la durée de survie est de 24 mois.

I.2.2.2 Transmission héréditaire

Les formes familiales ont un mode de transmission de type autosomal dominant, c'est-à-dire que le gène responsable de la maladie est situé sur un chromosome non sexuel et qu'un seul allèle muté suffit à l'expression d'un phénotype pathologique. C'est une mutation du gène *PRNP*, codant la protéine PrP, qui est à l'origine des formes héréditaires de la MCJ. Ce mode de transmission est à l'origine de 10 à 15% des cas de maladies à prion. A l'heure actuelle, environ 40 mutations ponctuelles du gène *PRNP* ont été décrites et certaines sont connues pour être responsables des maladies à prions héréditaires tels que le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker (GSS), la maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (fMCJ) et l'insomnie familiale fatale (IFF).

Chez l'homme, un grand nombre de polymorphismes et de mutations du gène *PRNP* codant la protéine prion, qui sont liés avec les maladies à prion, ont été décrits. La plupart des mutations de *PRNP* décrites se situent dans la région C-terminale de la

protéine, notamment au niveau des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Quelques mutations se trouvent dans la région N-terminale. C'est également dans cette région que l'on trouve les cas d'insertion d'octapeptides supplémentaires dans la région OR (Octapeptide Repeat) de la protéine impliqués dans les maladies (figure 3). La protéine normale en contient 5 copies alors que la plupart des protéines codées par des gènes portant une mutation insertionnelle en possèdent 9. Une augmentation du nombre de répétition est corrélée avec une formation spontanée beaucoup plus rapide d'amyloïde PrP^{res} due à une plus grande capacité de liaison de cette dernière avec d'autres molécules PrP (Moore, Herzog et al. 2006).

Le polymorphisme le plus connu se situe au niveau du codon 129 (M129V) qui est associé à la pathologie. En effet, l'homozygotie pour la méthionine au niveau du codon 129 représente 83% des cas de fMCJ (Hauw, Sazdovitch et al. 2000) (figure 3).

Chez les juifs d'origine libyenne, l'incidence de la maladie est 100 fois plus élevée que la moyenne. Chez ceux d'origine tunisienne, elle est 4 à 5 fois plus importante. Les descendants des familles porteuses de la mutation ont une chance sur deux de développer une MCJ. La mutation E200K du gène *PRNP* codant la protéine prion est à l'origine de cette importante incidence (Gabizon, Rosenmann et al. 1993). La même mutation a également été observée chez des patients d'Orava en Slovénie et également au Chili (Goldfarb, Brown et al. 1990; Goldfarb, Mitrova et al. 1990).

Bien que les mutations associées à des maladies à prion chez l'homme soient bien établies, les effets directs de ces mutations sur la protéine restent obscurs.

L'insomnie familiale fatale (IFF)

L'IFF a été décrite pour la première fois en 1986. C'est une encéphalopathie spongiforme transmissible humaine caractérisée par des troubles végétatifs (disparition des rythmes circadiens, hyperactivité sympathique, troubles sphinctériens), des difficultés motrices et une démence qui peut être tardive. L'âge de début moyen est de 51 ans. La maladie évolue vers une issue fatale en 6 à 32

mois (Imran and Mahmood 2011). L'IFF elle est liée à une mutation ponctuelle du codon 178 (D178N) associée, sur le même allèle, à un codon 129 codant une méthionine.

Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS)

Le Syndrome de GSS est caractérisé par une ataxie cérébelleuse, des troubles de la déglutition et de la parole. Elle évolue vers un état de démence. La durée totale d'incubation de la maladie peut excéder 50 mois. Sur le plan anatomopathologique, la maladie se caractérise par les signes neurologiques habituels des ESSTs associés à la présence de plaques multicentriques d'amyloïdes. Cette maladie est transmissible à la souris et au chimpanzé par inoculation intracérébrale d'extraits de cerveau de patients atteints du syndrome de GSS (Imran and Mahmood 2011). Les mutations dans la région N-terminale : P102L, P105L et A117V qui sont à l'origine de GSS (Hsiao, Baker et al. 1989; Kretschmar, Honold et al. 1991; Rosenmann, Vardi et al. 1998).

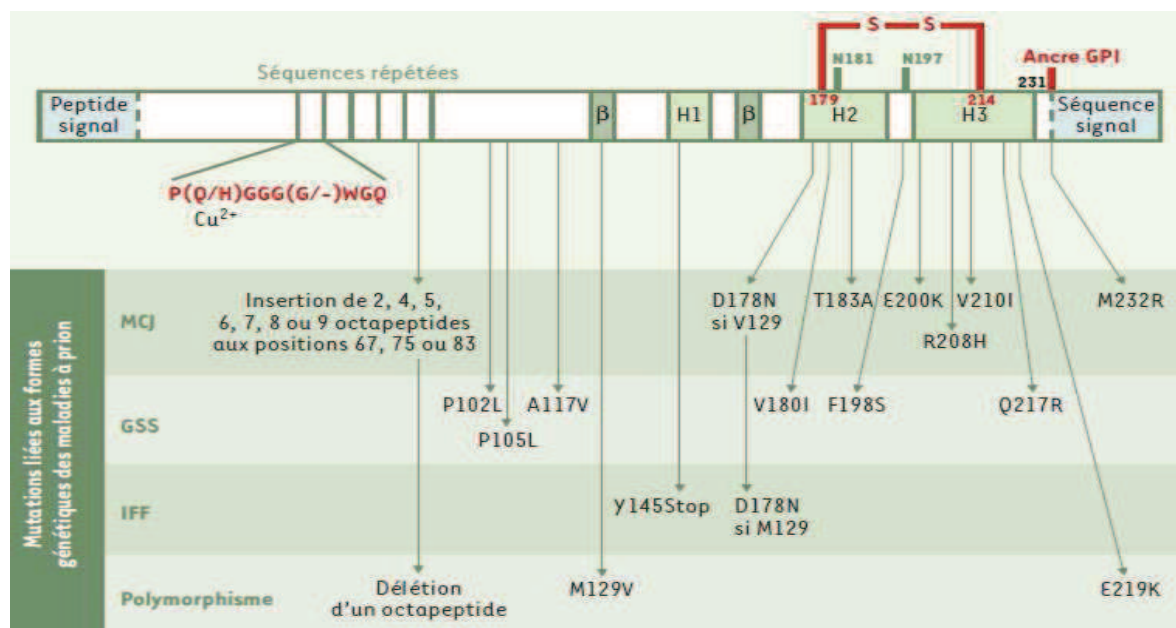


Figure 3. Mutations et polymorphismes du gène *PRNP* humain (d'après Liautard et al. 2002).

La majorité des mutations à l'origine des formes génétiques des maladies à prion humaines (maladie de Creutzfeldt-Jakob, syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker et insomnie fatale familiale) se situe au niveau des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Quelques mutations dans la région N-terminale ont été également décrites. Le polymorphisme M129V est le plus connu.

I.2.2.3 Transmission iatrogène

Les formes iatrogènes de la MCJ (iMCJ) sont les plus rares (5% de cas). Ces formes comprennent le Kuru, que le cannibalisme tribal a propagé en Nouvelle-Guinée au cours des années 1950 à 1970 ; mais aussi les iMCJ dont la cause principale est l'utilisation d'implants (dure-mère, cornée) ou de produits d'origine humaine (hormones de croissance) provenant de donneurs atteints de MCJ non identifiés.

En 1996, des chercheurs britanniques ont décrit une nouvelle forme atypique de la MCJ nommé le nouveau variant de la MCJ (vMCJ). En septembre 1998, 28 cas de vMCJ (27 en Grande-Bretagne et 1 en France) ont été recensés et confirmés par autopsie. Tous les malades dont le diagnostic a été confirmé présentent des symptômes et des lésions semblables. Le nouveau variant de la maladie de MCJ serait dû à la consommation de viande bovine infectée par l'agent de l'ESB. Le vMCJ peut être accidentellement transmis par transfusion sanguine (Lefrere and Hewitt 2009).

La prédiction du nombre total de cas de vMCJ est difficile à estimer car la période d'incubation, les doses reçues ainsi que la fréquence d'exposition ne sont absolument pas connues. Il est également possible que des personnes développent des formes asymptomatiques de l'infection. Le nombre de personnes ayant été exposées à l'agent de l'ESB est sans doute beaucoup plus important que celui des personnes décédées ou actuellement atteintes. Ces personnes posent un véritable problème de santé publique pour de futures transmissions sanguines, dons d'organes etc.

I.3 La protéine PrP

Les maladies à prion sont associées avec la protéine prion sous sa conformation pathologique PrP^{Sc} qui représente le seul marqueur moléculaire détectable de ces maladies. Les conformations cellulaire PrP^C et pathologique PrP^{Sc} de la protéine PrP partagent une même séquence primaire qui est codée par le gène *PRNP*.

I.3.1 Le gène PRNP code une protéine de 253 résidus qui est le précurseur de la PrP

Dans les années 1970, A. Dickinson a mis en évidence que la pathologie ne peut se développer qu'après l'expression d'un gène *SINC* (Scrapie incubation period) (Dickinson, Meikle et al. 1968). En 1985, le gène codant la PrP est identifié et baptisé *PRNP* (Oesch, Westaway et al. 1985). Les travaux de RC. Moore ont démontré que *SINC* et *PRNP* ne sont qu'un seul et même gène (Moore, Hope et al. 1998).

La protéine PrP est une protéine endogène présente naturellement chez les mammifères. Des protéines de même famille ont été trouvées chez les oiseaux, les tortues et aussi chez les poissons (Harrison, Khachane et al. 2010). Le gène *PRNP* est très conservé chez les mammifères, ce qui suggère que la protéine PrP pourrait avoir une fonction importante (Westaway and Prusiner 1986). *PRNP* appartient à la famille *PRN* dans laquelle se trouvent également le gène *Prnd* codant la protéine Doppel (Dpl) (acronyme de downstream prion protein-like gene) (Moore, Hope et al. 1998; Moore, Lee et al. 1999) et le gène *Sprn* codant la protéine Shadoo (prion-like protein) (Watts and Westaway 2007). Les séquences des protéines Dpl et PrP ont environ 25% d'homologie mais leurs structures sont très conservées.

Le gène *PRNP* est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme, sur le chromosome 2 chez la souris (Sparkes, Simon et al. 1986), et sur le chromosome 13 chez le bovin et le mouton (Lee, Westaway et al. 1998). Chez l'homme, le gène *PRNP* possède 2 exons séparés par un intron de 10 kb tandis que chez les souris et les moutons, il contient 3 exons (figure 4). Mais la PrP est codée par un seul de ces exons (exon 2

chez l'homme et exon 3 chez la souris, le bovin et le mouton) ce qui exclut toute possibilité que la forme pathologique de la protéine prion PrP^{Sc} soit issue d'un épissage alternatif (Basler, Oesch et al. 1986; Westaway and Prusiner 1986; Westaway, Miranda et al. 1991). La région promotrice de *PRNP* présente des répétitions de GC mais est dépourvue de TATA box. Cette région riche en GC est utilisée comme motif de fixation du facteur de transcription Sp1 (McKnight and Tjian 1986).

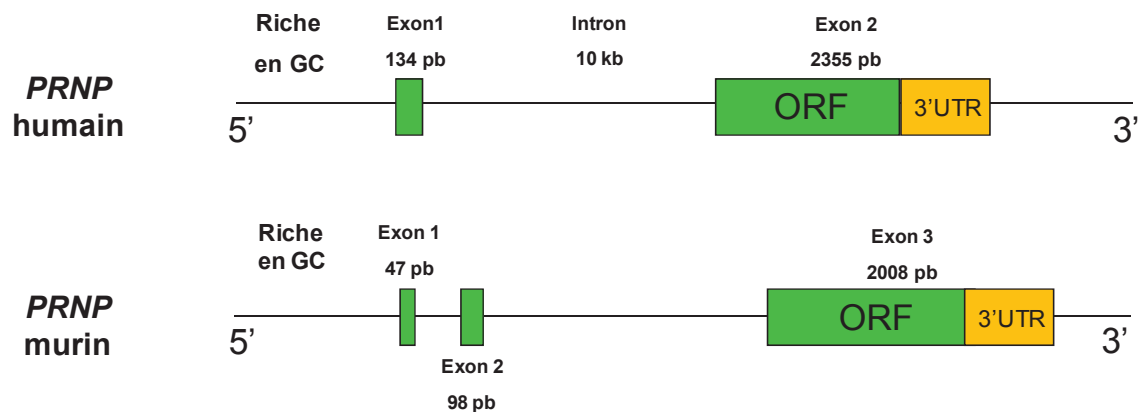


Figure 4. Organisation des gènes *PRNP* humain et murin qui sont respectivement composés de 2 et 3 exons (d'après Heaton et al. 2003).

I.3.2 La protéine PrP^C

I.3.2.1 Structure de la PrP^C

Le produit initial de la traduction du gène *PRNP* humain est une pré-protéine de 253 acides aminés. La séquence complète de la pré-protéine PrP est composée de différents domaines (figure 5A) :

- Un peptide signal de 22 résidus (1-22) est localisé à l'extrémité N-terminale de PrP^C.

- La région N-terminale (23-120) de PrP^C contient des répétitions de 8 acides aminés riches en glycine P(H/Q)GGGWQG, d'où son nom d'octapeptide (OR Octapeptide repeat). Le nombre de répétitions varie en fonction des espèces et au sein d'une même espèce. Il y a normalement 5 répétitions chez l'homme mais ce chiffre peut varier, un grand nombre d'OR pouvant être à l'origine de l'ESST (Mead 2006). Les histidines de ces OR ont une forte affinité pour les ions métalliques, notamment pour les ions Cu²⁺. Cette forte affinité pour les ions métalliques facilite la purification de la PrP par chromatographie d'affinité avec des ions métalliques immobilisés (IMAC) (Pan, Stahl et al. 1992).
- La région centrale (120-231) de PrP^C contient deux sites de N-glycosylation sur les résidus asparagine 181 et 197, sur lesquels différents N-glycanes peuvent se fixer, qui sont responsables des trois états de glycosylation de la protéine (non glycosylée, mono et bi-glycosylée). Cette région possède également deux cystéines (positions 179 et 214) permettant la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Enfin, la sérine 231 correspond au point de fixation d'une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) qui permet l'ancrage de la PrP au niveau du feuillet extracellulaire de la membrane plasmique (Stahl, Borchelt et al. 1987), et qui est requise pour la toxicité de la protéine PrP^{Sc} (Chesebro, Trifilo et al. 2005).
- L'extrémité C-terminale (232-253) de PrP^C est constituée d'une séquence hydrophobe clivée lors de la maturation de la protéine, ce qui permet l'ajout de l'ancre GPI sur la sérine 231 (figure 5C).

Après la traduction, le précurseur de PrP^C est dirigé vers le réticulum endoplasmique (RE) où il subit des modifications post-traductionnelles telles que le clivage du peptide signal, l'addition optionnelle de deux chaînes d'oligosaccharide sur les deux sites potentiels de N-glycosylation, la substitution de l'extrémité C-terminale (232-253) par l'ancre GPI et la création d'un pont disulfure (Haraguchi, Fisher et al. 1989; Turk,

Teplow et al. 1988). La PrP^C mature transite par l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane plasmique.

Ainsi, la protéine PrP^C est constituée de 209 acides aminés. Grâce à la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN), la structure tridimensionnelle de la PrP recombinante sans son ancre GPI a été résolue. La partie C-terminale de la PrP forme un domaine globulaire très structuré composé de 3 hélices α situées entre les résidus 144-154 (hélice α_1), 173 -194 (hélice α_2) et 200-228 (hélice α_3), et 2 feuillets β antiparallèles (β_1 : 128-131 et β_2 : 161-164) (Riek, Hornemann et al. 1997 ; Zahn, Liu et al. 2000) (figure 5B). Les hélices α_2 et α_3 sont connectées par un pont disulfure. En accord avec les résultats obtenus par dichroïsme circulaire, la PrP contient une majorité d'hélices α (43%) et une faible proportion de feuillet β (3%) (Safar, Roller et al. 1993). La partie N-terminale de PrP^C est flexible et mobile : aucune structure secondaire n'a encore été identifiée (Donne, Viles et al. 1997; Riek, Hornemann et al. 1996; Riek, Hornemann et al. 1997).

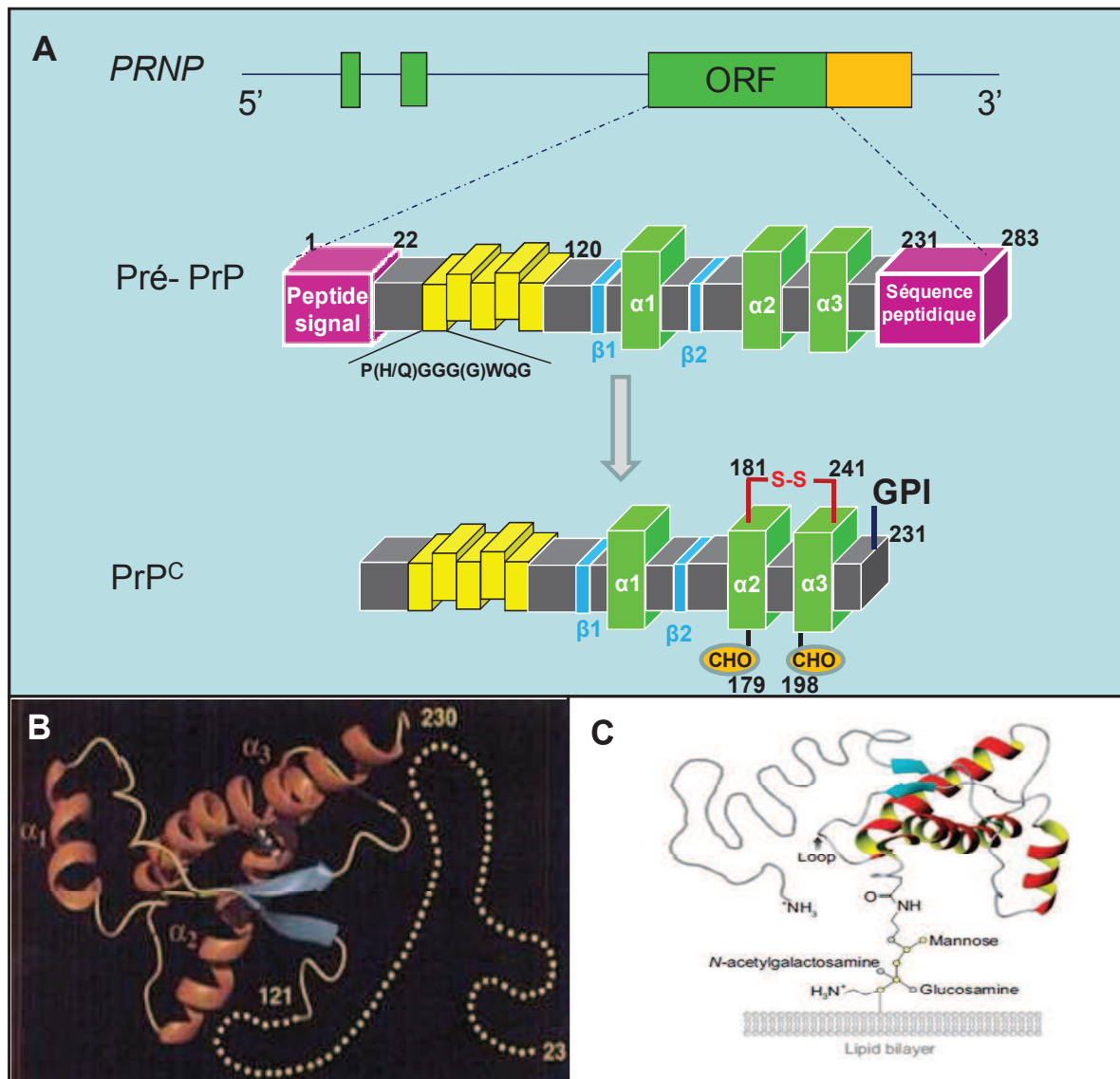


Figure 5. Structure de la protéine prion PrP^C (d'après Riek et al. 1997 ; Zahn et al. 2000, Liautard et al. 2002).

- (A) La PrP^C est codée par le gène *PRNP*. Après sa maturation, PrP^C est constituée de 209 acides aminés. PrP^C possède des répétitions de 8 acides aminés riches en Glycine, un pont disulfure entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$, 2 groupements d'oligosaccharides et une ancre de GPI.
- (B) Modèle tridimensionnel de la PrP^C qui contient 3 hélices α et 2 feuillets β antiparallèles. La partie N-terminale est flexible et ne présente aucune structure secondaire.
- (C) La PrP^C est ancrée à la membrane plasmique *via* une ancre GPI.

I.3.2.2 Localisation cellulaire de la PrP^C

Des expériences de « pulse chase » ont permis d'estimer que la demi-vie de PrP^C est de 3 à 6 heures dans les cellules de neuroblastomes (Caughey, Race et al. 1989). Au sein de la membrane plasmique, une partie de la fraction glycosylée de la PrP^C est localisée au niveau des microdomaines enrichis en cholestérol et en

sphingolipides, qui sont résistants à l'action des détergents, nommés rafts ou DRM (Detergent Resistant Membranes) (Pike 2006) (figure 6). Ces domaines sont décrits comme étant le lieu de conversion de la PrP^C en PrP^{res} (Taraboulos, Scott et al. 1995; Kaneko, Vey et al. 1997). Par ailleurs, il existe aussi des formes transmembranaires de la PrP^C, dues à l'existence d'une séquence hydrophile (résidus 107-112) nommée STE (Stop Transfer Effector) qui permet d'arrêter la translocation de la protéine immature. Ces deux formes transmembranaires sont CtmPrP (le domaine C-terminal est réticulaire et le domaine N-terminal cytosolique) et NtmPrP (le domaine N-terminal est réticulaire et le domaine C-terminal cytosolique) (Hegde, Mastrianni et al. 1998).

La PrP^C est ubiquitaire, mais se trouve majoritairement dans les cellules neuronales et dans le cerveau (Manson, West et al. 1992). Les travaux de MJ. Ford et de ses collègues ont montré une discordance entre les taux d'expression des ARN messagers et la présence de PrP^C dans le système nerveux central (SNC). Les neurones GABAergiques concentrent plus de PrP^C que les neurones cholinergiques dans lesquels elle est faiblement détectable, alors que dans les neurones dopaminergiques, malgré le fort taux de transcrits, la présence de PrP^C n'est pas mise en évidence. Dans les cellules granulaires du cervelet où l'expression du messenger est relativement forte, de faibles quantités de PrP^C sont détectées (Ford, Burton et al. 2002). Au contraire des cellules du SNC, une bonne corrélation entre la répartition des ARNm et la quantité de protéines PrP^C a été observée dans les neurones périphériques et les tissus non-nerveux (Ford, Burton et al. 2002). La PrP^C a été également détectée dans le cœur, les poumons et la rate en faible quantité (Oesch, Westaway et al. 1985).

1.3.2.3 Recyclage et dégradation de la PrP^C

Plusieurs études ont également mis en évidence un recyclage de la PrP^C vers un compartiment d'endocytose, soit via les vésicules de clathrine (Harris 2003), soit par l'intermédiaire de cavéoles en présence de cuivre (Peters, Mironov et al. 2003). Elle subit ainsi plusieurs cycles d'endocytose, au cours desquels elle est majoritairement réorientée vers la membrane plasmique (Shyng, Huber et al. 1993) (figure 6). Seuls

10% des PrP^C endocytées sont dégradées après chaque cycle d'endocytose (Lehmann, Milhavel et al. 1999).

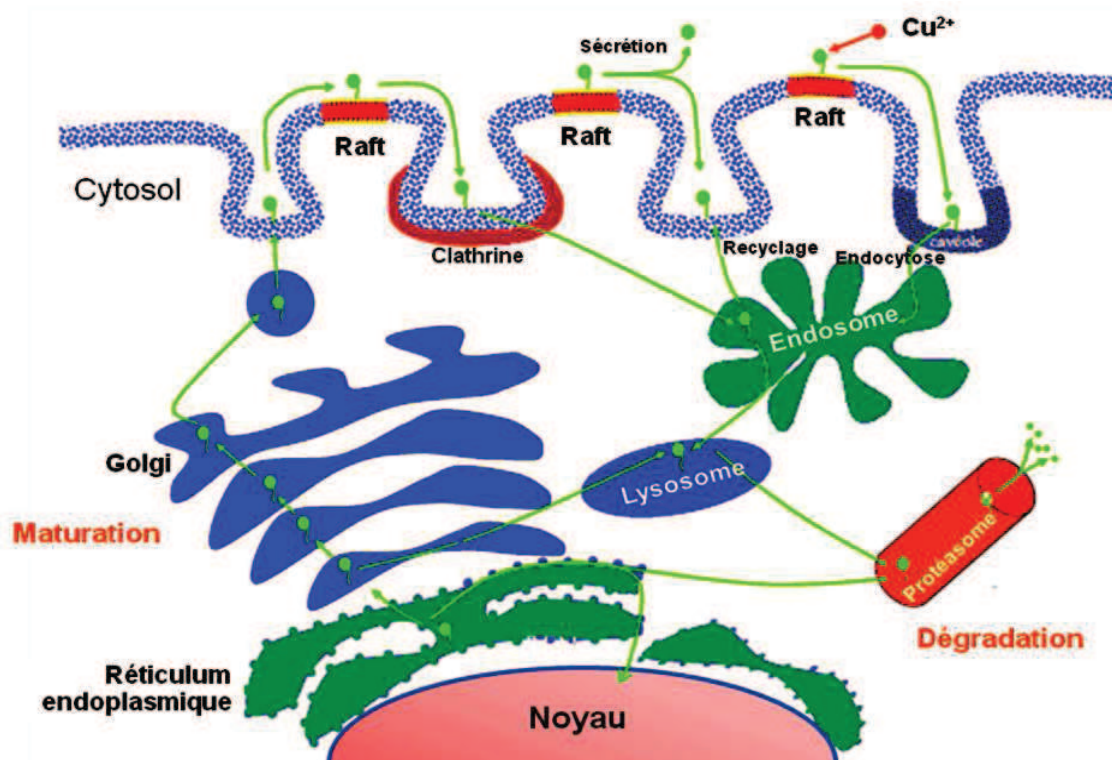


Figure 6. Illustration du trafic intracellulaire de PrP^C (d'après Mallucci et al. 2005).

La protéine PrP^C (en vert) est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG). Elle poursuit sa maturation dans l'appareil de Golgi, puis est excrétée vers la membrane où elle se localise dans les rafts. Elle subit ensuite des cycles d'endocytose par différentes voies (clathrine ou cavéole en présence de Cu²⁺). 10% des PrP^C endocytées sont dégradées par le protéasome, le reste est recyclé et regagne la membrane plasmique.

I.3.2.4 Fonctions de la PrP^C

La question majeure qui se pose encore à l'heure actuelle est celle de la fonction de cette protéine cellulaire. Une bonne conservation de la PrP au sein des espèces, particulièrement chez les mammifères, suggère qu'elle joue un rôle important. La fonction de la PrP^C est très difficile à établir. L'absence de boîte TATA dans le promoteur du gène *PRNP* codant la PrP et son expression dans tous les types cellulaires la rapproche des protéines de « ménage ». Sa localisation à la surface cellulaire pourrait évoquer un rôle dans l'adhésion cellulaire, la signalisation ou encore la liaison avec un ligand extracellulaire. Des travaux récents ont également montré un rôle protecteur de la PrP^C dans la survie cellulaire telle que l'activité contre le stress oxydant, l'activité anti-apoptose. De nombreuses études ont été consacrées

à l'identification de la fonction de la PrP^C et ont permis d'établir son rôle dans différents domaines. Toutefois, il n'agit pas d'un gène essentiel chez les mammifères. En effet, des souris *prnp*^{-/-} sont viables et insensibles aux prions infectieux (Weissmann and Flechsig 2003).

(i) Fonction de la PrP^C dans l'adhérence cellulaire

La PrP^C est localisée au niveau de microdomaines lipidiques. Cette localisation particulière suggère un rôle dans les voies de signalisation de PrP^C. Plusieurs études ont montré le couplage fonctionnel entre la PrP^C et des voies de signalisation intracellulaire. Ce couplage ne peut pas être direct car la PrP^C ne possède pas de domaine transmembranaire. Parmi les partenaires connus de la PrP^C figurent plusieurs récepteurs transmembranaires impliqués dans l'adhérence cellulaire :

- La PrP^C est tout d'abord un récepteur à forte affinité pour la laminine. L'interaction directe de la PrP^C avec la lamine est essentielle à la formation des neurites par des neurones d'hippocampe en culture cellulaire (Graner, Mercadante et al. 2000).
- L'interaction directe de la PrP^C avec NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) est également impliquée dans la neuritogenèse par l'activation de la protéine kinase p59Fyn (Santuccione, Sytnyk et al. 2005).
- La protéine STI-1 (Stress Inducible protein) est aussi un partenaire de la PrP^C, son activité neuroprotectrice passe par l'activation d'une protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), ce qui pourrait induire la croissance de neurites dans des cellules hippocampiques *via* l'activation de ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase).

Par ailleurs, le précurseur et différentes isoformes de la laminine LRP/LP (Laminin Receptor Precursor/ Laminin Preceptor) peuvent, eux aussi, se lier à la PrP^C, contribuant ainsi à la régulation de l'adhérence sur matrice de laminine. L'ensemble

de ces données révèle une implication de la PrP^C dans la neuritogenèse et sa contribution dans l'adhérence cellulaire.

(ii) **Fonction de la PrP^C dans la survie cellulaire**

La protéine PrP^C pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme du cuivre et la protection de la cellule contre le stress oxydatif et contre l'apoptose en interagissant avec différents partenaires cellulaires (tableau 3).

Régulation du métabolisme du cuivre et protection contre le stress oxydatif

La PrP^C pourrait interagir avec une faible affinité, de manière pH-dépendante, avec le cuivre *via* les résidus histidines présents dans la région octapeptide (OR) PHGGGWGQ répétée 5 fois (Viles, Cohen et al. 1999). Des études suggèrent que la PrP^C jouerait un rôle dans le métabolisme du cuivre en régulant sa concentration au niveau de la synapse. Chez les souris *prnp*^{-/-}, la concentration en cuivre diminue d'environ 50% dans les fractions synaptosomales et subcellulaires endosomales par comparaison avec des souris sauvages (Kretschmar, Tings et al. 2000). Le niveau d'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dépendante du cuivre et du zinc serait plus faible chez les souris dépourvues de PrP^C, ce qui les rendrait plus sensibles au stress oxydatif que les souris sauvages (Brown, Qin et al. 1997; Mabbott and Bruce 2001). De plus, une stimulation de l'endocytose de la PrP^C par le cuivre a également été observée dans les cellules de neuroblastome N2a surexprimant la PrP^C (Pauly and Harris 1998). Cependant, le rôle de PrP^C dans le métabolisme du cuivre reste encore à éclaircir.

Protection contre l'apoptose

Des expériences utilisant des neurones en culture provenant de souris *prnp*^{-/-} semblent indiquer que la PrP^C confère une résistance à l'apoptose. La PrP^C peut en effet se lier au facteur anti-apoptotique Bcl2 (Kurschner and Morgan 1995) et protéger des cultures primaires de neurones contre la mort cellulaire induite par Bax,

un régulateur de l'apoptose (Bounhar, Zhang et al. 2001). La PrP^C empêche les changements de conformation de Bax nécessaires à l'activation de l'apoptose (Saupe and Supattapone 2006). Une fonction anti-apoptotique de la PrP^C a été également suggérée lorsqu'elle interagit directement avec la protéine STI-1 (stress-inducible protein), qui exerce une activité neuroprotectrice en activant la protéine kinase dépendante de l'AMPc (Zanata, Lopes et al. 2002; Chiarini, Freitas et al. 2002). En revanche, des études réalisées sur des coupes tissulaires ont révélé que la liaison de la PrP^C par des anticorps spécifiques induit l'apoptose des neurones du cervelet et de l'hippocampe (Solfrosi, Criado et al. 2004). Il est actuellement impossible de dire si PrP^C se comporte comme une protéine pro- ou anti-apoptotique, son implication dans la survie cellulaire dépendant du type cellulaire et de la voie apoptotique impliquée.

Tableau 3. Rôle de la PrP^C dans la survie cellulaire des neurones.

Fonction	Mécanisme ou signalisation intracellulaire
Régulation la concentration de Cu ²⁺	Liaison du Cu ²⁺ Internalisation de PrP ^C -Cu ²⁺
Protection contre le stress oxydant	Activation de la Cu/Zn-Superoxide dimustase (SOD)
Survie cellulaire Prolifération	Couplage à la NADPH oxydase Activation de la voie ERK
Protection contre l'apoptose dépendante de Bax/Bcl2	Inhibition de Bax
Neuroprotection	Liaison de STI-1 Activation de PKA

I.3.3 De PrP^C à PrP^{Sc} : un changement de conformation associé aux ESST

La PrP^{Sc} est la conformation pathologique de la protéine PrP. Tous les cas d'ESST se caractérisent par la présence de la PrP^{Sc} dont l'accumulation sous forme agrégée dans le cerveau est corrélée avec la neuro-dégénérescence.

I.3.3.1 La conformation pathologique PrP^{Sc}

(i) Structure de la PrP^{Sc}

L'isoforme cellulaire PrP^C et l'isoforme pathologique PrP^{Sc} de la protéine prion partagent la même structure primaire. Elles subissent les mêmes modifications post-traductionnelles (Stahl, Baldwin et al. 1993). Cependant, ces deux isoformes diffèrent l'une de l'autre par leur structure tridimensionnelle. La PrP^C est majoritairement constituée d'hélices α et d'une faible proportion de feuillets β . La PrP^{Sc}, quant à elle, est enrichie en feuillets β et forme des agrégats. L'agrégation de l'isoforme PrP^{Sc} rend les études par RMN ou par diffraction des rayons X pratiquement impossibles. Néanmoins, des études de spectroscopie infrarouge montrent que les agrégats de PrP^{Sc} forment une structure très ordonnée, constituée de 34% de feuillets β et 20 % d'hélices α (Caughey, Dong et al. 1991). Les données obtenues par dichroïsme circulaire et par FTIR (Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy) indiquent que la PrP^{Sc} est constituée de 2 hélices α et de 4 feuillets β (Cohen, Pan et al. 1994 ; Huang, Prusiner et al. 1996) (figure 7). Les hélices α_2 et α_3 de la PrP^C restent inchangées dans l'isoforme PrP^{Sc} (Wille, Michelitsch et al. 2002). Plusieurs études ont également suggéré la formation de trimères conduisant à la formation de fibres par la présence d'hélice β -gauche (Govaerts, Wille et al. 2004).



Figure 7. Modèle représentant la protéine PrP (d'après Govaert, Wille et al. 2004).

La PrP^C est majoritairement constituée d'hélices α , et d'une faible proportion de feuillets β , tandis que la PrP^{Sc} est riche en feuillets β . La partie N-terminale de PrP^C, non structurée, n'est pas représentée.

(ii) Propriétés physico-chimiques de la PrP^{Sc}

Le changement de conformation de la protéine PrP modifie ses propriétés physico-chimiques. L'isoforme PrP^C est soluble dans les détergents, sensible à la digestion par la protéinase K (PK) et monomérique. PrP^{Sc} a des propriétés distinctes (tableau 4) :

- PrP^{Sc} est insoluble dans les détergents.
- Elle est partiellement résistante à la digestion de la protéinase K (d'où le nom PrP^{res}) dont la digestion ne clive qu'environ 70 acides aminés de son domaine N-terminal pour former la PrP^{res} 27-30 (sa taille moléculaire est comprise entre 27 et 30 kDa) (figure 8).
- Dans les cellules chroniquement infectées, elle a une demi-vie supérieure à 24 heures contre environ 6 heures pour la PrP^C (Caughey and Raymond 1991).
- Elle est capable de convertir les molécules PrP^C en molécules PrP^{Sc} pathologiques par un mécanisme d'autocatalyse, d'où le terme de « baiser de la mort » (Caughey, Raymond et al. 2001) ou « contagion de forme ».

Dans le mécanisme d'autocatalyse, la présence de la protéine PrP^C est indispensable pour la propagation de la forme prion PrP^{Sc}. Ceci est observé expérimentalement : des souris transgéniques dont le gène *PRNP* a été délété sont complètement insensibles à l'injection du prion infectieux en grande quantité (Bueler, Aguzzi et al. 1993; Sailer, Bueler et al. 1994). De même, la réintroduction du transgène *PRNP* dans ces souris restaure leur susceptibilité au prion. Ces observations démontrent que la protéine PrP^C est indispensable au processus de production de la protéine PrP^{res}.

Tableau 4. Comparaison des caractéristiques des protéines PrP^C et PrP^{Sc}.

	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Hélice α	42%	20%
Feuillet β	3%	34%
Sensibilité à la PK	Sensible	Partiellement résistante
Solubilité	Oui	Non
Structure	Monomérique	Fibres amyloïdes
Temps de demi-vie	3 à 6 heures	Plus de 24 heures

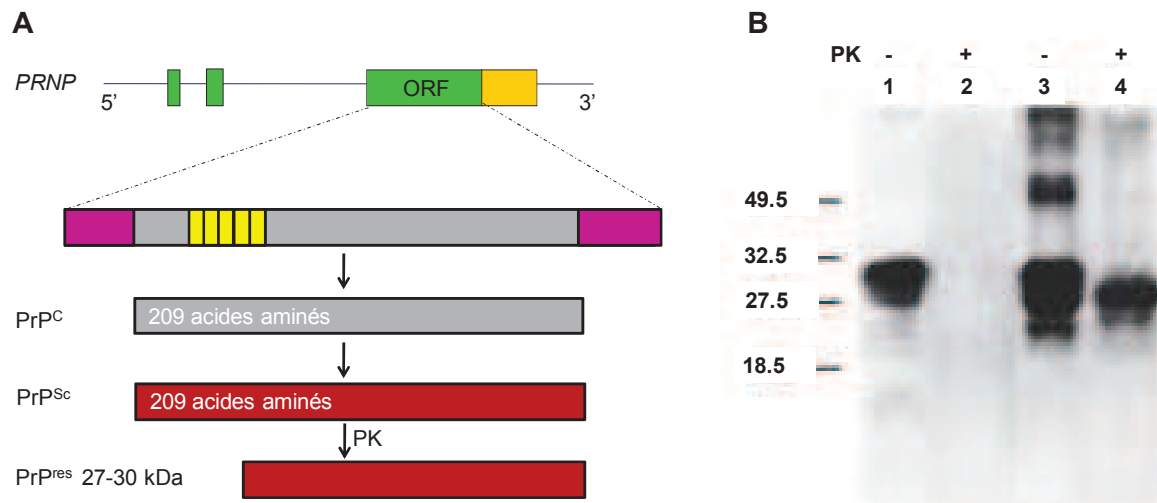


Figure 8. Les isoformes de la protéine PrP (d'après Colby and Prusiner 2011).

(A) Les isoformes (PrP^C et PrP^{Sc}) de la protéine PrP partagent la même séquence primaire.

(B) La PrP^C est sensible à la digestion par la protéinase K (PK). PrP^{Sc} est partiellement résistante et forme PrP^{res} 27-30 (sa taille moléculaire est entre 27 et 30 kDa) après digestion enzymatique. Pistes 1 et 2 : homogénats non infectés, pistes 3 et 4 : homogénats infectés de hamster syrien. Les échantillons présentés dans les pistes 2 et 4 ont été traités par la PK.

I.3.3.2 Lieux possibles de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}

La conversion de la protéine PrP^C en protéine PrP^{Sc} est considérée comme l'élément clef de la pathogenèse des ESST. L'hypothèse de la « protéine seule » suggère que l'agent infectieux PrP^{Sc} entre en contact avec la protéine PrP^C et lui impose sa conformation. Plusieurs sites potentiels de conversion ont été identifiés selon le trafic cellulaire de la protéine PrP^C (Moudjou, Frobert et al. 2001) (figure 9). Parmi eux, les DRM ou rafts, riches en cholestérol, semblent être le lieu idéal de cette conversion car PrP^C et PrP^{Sc} y sont simultanément présentes (Naslavsky, Stein et al. 1997). La déplétion en cholestérol, qui induit la destruction des rafts, inhibe la formation de PrP^{Sc} (Taraboulos, Scott et al. 1995). Les Statines qui diminuent la cholestérolémie, possède également une activité antiprion (Poncet-Montange, St Martin et al. 2011). Les travaux du groupe de G. Baron suggèrent que la PrP^C ne peut être transconformée en PrP^{Sc} que si toutes deux sont ancrées de façon contigüe dans une membrane (Baron, Wehrly et al. 2002). De plus, la forte densité de PrP au niveau des rafts crée un environnement favorable à la transconformation, ce qui faciliterait la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} en augmentant la probabilité de leur rencontre (Sarnataro, Paladino et al. 2002).

La conversion de PrP^C en PrP^{Sc} pourrait également avoir lieu dans le réticulum endoplasmique (Ivanova, Barmada et al. 2001) ou bien dans des voies d'endocytose (Arnold, Tipler et al. 1995). Le protéasome et le transport rétrograde de la PrP^C à travers le Golgi ont aussi été considérés comme des lieux de conversion possibles. Les protéines incorrectement assemblées sont en effet retenues au niveau de RE et dégradées par la voie ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) incluant une translocation à travers la membrane du RE vers le cytosol puis le protéasome (Yoshida 2007). Lorsque la fonction du protéasome est inhibée, la protéine PrP s'accumulent dans le cytosol et forme une structure mal repliée et résistante à la PK, qui pourrait promouvoir la transconformation des protéines PrP^C néo-synthétisées (Ma and Lindquist 2001; Yedidia, Horonchik et al. 2001).

Pourtant, ces mécanismes de conversion sont encore très mal connus. Plusieurs hypothèses ont été émises parmi lesquelles le modèle de conversion imposée par la

matrice et le modèle de nucléation sont actuellement les plus communément acceptés par la communauté scientifique.

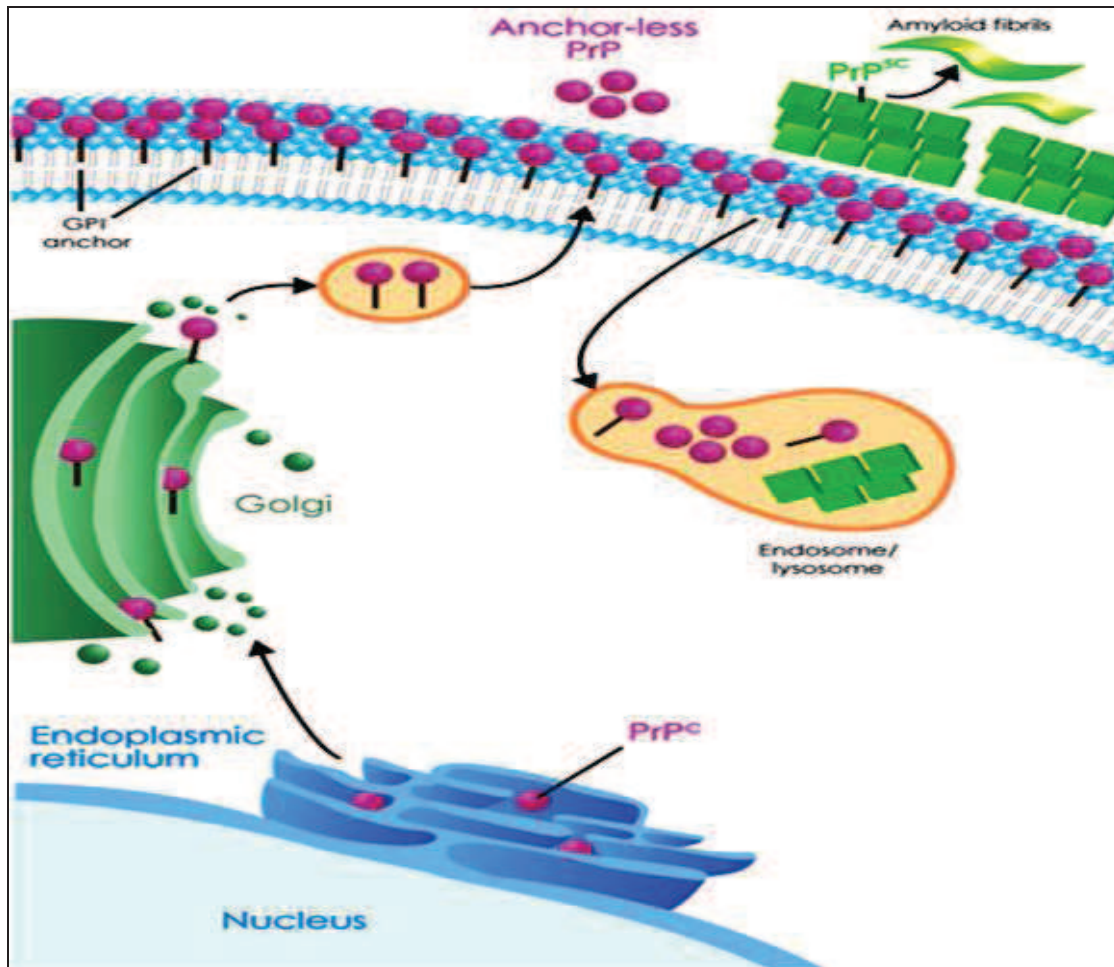


Figure 9. Les lieux possibles de conversion de PrP^C en PrP^{Sc}.

La transconformation de PrP^C en PrP^{Sc} pourrait avoir lieu dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, au niveau des microdomaines rafts ou encore dans les voies d'endocytose.

I.3.3.3 Mécanismes moléculaires de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}

L'hypothèse de la protéine seule suggère que l'agent infectieux associé aux ESST est une forme différemment repliée (PrP^{Sc}) de la protéine PrP^C qui pourrait convertir la forme classiquement repliée (PrP^C) en PrP^{Sc} selon les mécanismes potentiels suivant (figure 10) :

(i) Modèle de conversion imposée par la matrice (figure 10A)

Dans ce modèle, il existerait une barrière énergétique importante qui empêcherait la transconformation naturelle de la forme PrP^C en forme pathologique PrP^{Sc}. Dans ce cas, PrP^{Sc} entrerait en contact avec PrP^C et lui imposerait sa conformation. L'homodimère ainsi formé pourrait soit s'agréger pour former des fibres amyloïdes, soit se dissocier en monomères aptes à provoquer la transconformation d'autres PrP^C (Aguzzi and Polymenidou 2004; Prusiner 1991; Zou and Gambetti 2005).

(ii) Modèle de nucléation-polymérisation (figure 10B)

Selon ce modèle, il existerait un équilibre entre la forme PrP^C et la forme PrP^{Sc} qui apparaîtrait spontanément mais serait extrêmement instable. L'agent infectieux ne serait pas une protéine monomérique mais un agrégat de PrP^{Sc} hautement ordonné. Les monomères de PrP^{Sc} seraient incorporés dans un noyau amyloïde naissant (Aguzzi and Polymenidou 2004; Jarrett and Lansbury 1993).

(iii) Modèle de nucléation assistée (figure 10C)

Dans ce modèle, le mécanisme de conversion fait intervenir d'un facteur endogène (facteur X) qui interagirait avec la PrP^C et la transformerait en une structure intermédiaire PrP*. Cette conformation intermédiaire permettrait à PrP^C de subir des modifications structurales conduisant à la formation de PrP^{Sc} (Soto 2003).

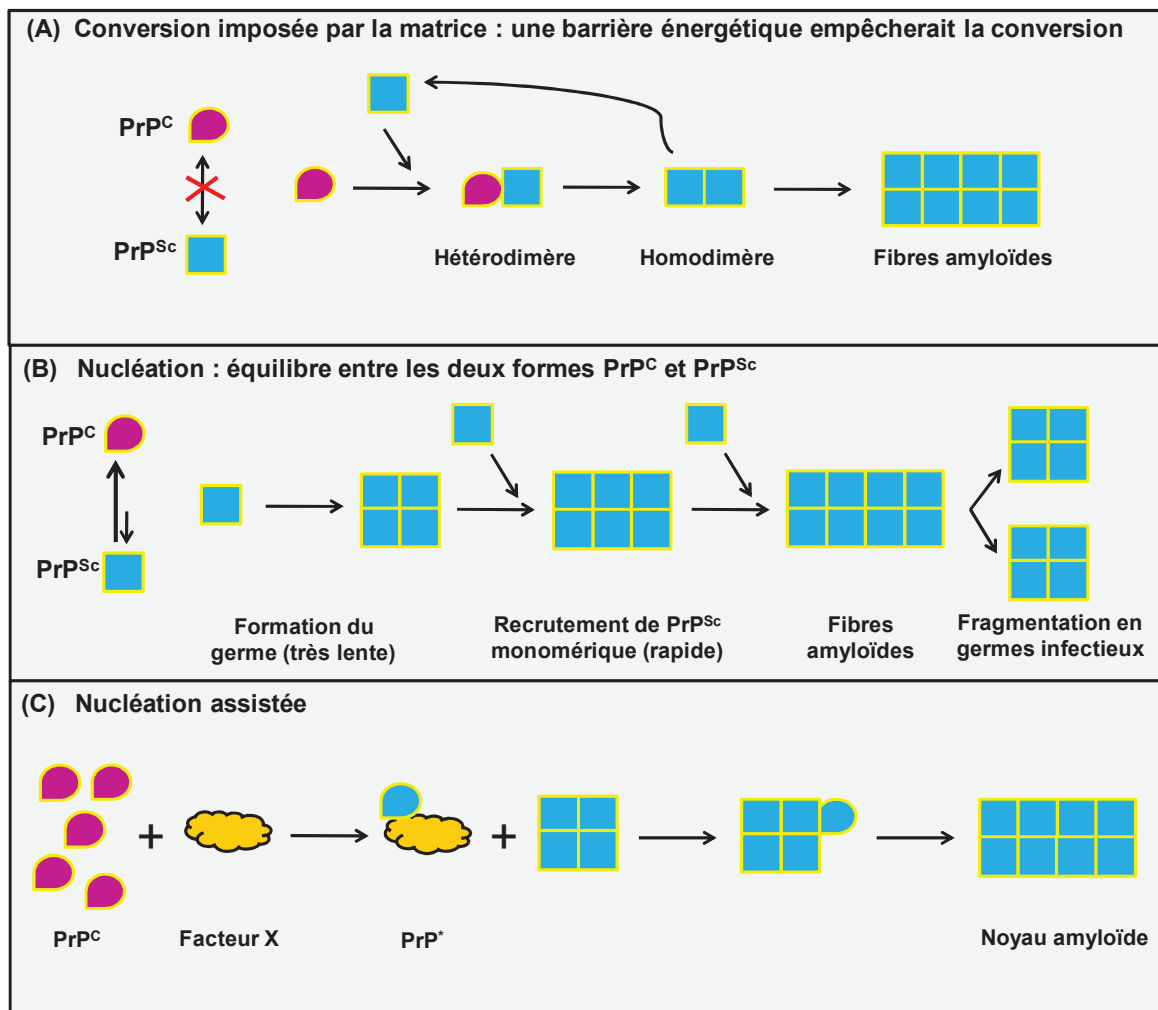


Figure 10. Les hypothèses de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (d'après Aguzzi and Polymenidou 2004 ; Abid and Soto 2006).

- (A) Le modèle de conversion imposée par la matrice suggère une interaction entre PrP^{Sc} exogène et PrP^C endogène. PrP^{Sc} impose alors sa conformation à PrP^C.
- (B) Le modèle de nucléation-polymérisation propose que PrP^C et PrP^{Sc} soient dans un équilibre thermodynamique réversible. Le noyau de nucléation recrute les monomères de PrP^{Sc} afin de former la fibre amyloïde, mais c'est un processus lent. L'Amyloïde formé se fragmente en de nombreux noyaux infectieux (germes infectieux) qui, à leur tour, recrutent des monomères PrP^{Sc}.
- (C) Le modèle de nucléation assistée repose sur la formation d'une structure intermédiaire PrP*. Cette formation nécessiterait l'intervention d'un facteur de conversion endogène, nommé « facteur X ».

Aucune de ces hypothèses n'a pour l'heure été validée expérimentalement. L'expérimentation *in vitro* constitue donc une étape essentielle pour valider cette théorie de conversion de la protéine saine PrP^C en protéine pathologique PrP^{Sc}. Ainsi, Byron Caughey et ses collègues ont mis au point le premier test de conversion acellulaire (Kocisko, Come et al. 1994). La réaction *in vitro* consiste à utiliser de la

PrP^{Sc} partiellement purifiée, extraite de cerveaux d'animaux infectés, et de la PrP^C marquée au ³⁵S et purifiée. Après plusieurs heures d'incubation, la mesure de l'acquisition de la résistance à la protéinase K dans la fraction radioactive est effectuée. Ce test ne mesure pas réellement la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} mais la conversion d'une forme sensible à la protéinase K (PrP^{sen}) en une forme résistante PrP^{res}. La réaction de conversion ne nécessite pas des PrP^C nouvellement synthétisées, suggérant qu'une interaction directe protéine-protéine est suffisante pour l'induction de la conversion. La PrP^{Sc} « impose » à la PrP^C sa conformation et certaines de ses propriétés physico-chimiques (Bessen, Kocisko et al. 1995) dans un processus auto-catalytique.

Un nouveau système de conversion *in vitro* a été également décrit (Saborio, Permanne et al. 2001). Ce système d'amplification cyclique de protéine mal repliée (PMCA pour Protein Misfolding Cyclic Amplification) est fondé sur deux idées nouvelles : (i) casser les agrégats amyloïdes (PrP^{Sc}) en petits fragments par sonication et (ii) ajouter un lysat de cerveau d'animal sain comme source de protéines PrP^C. A chaque cycle, la quantité de protéine PrP^{res} résistante à la protéinase K augmente. Ces observations *in vitro* confirment la conversion de la conformation PrP^C en PrP^{Sc}. Contrairement au système de B. Caughey qui utilise des protéines purifiées, celui-ci utilise des homogénats bruts de cerveau. Cette différence permet à d'hypothétiques facteurs ou de cofacteurs cellulaires d'agir dans la conversion de la protéine PrP^C en protéine résistante à la digestion de la protéinase K (PrP^{res}). Les cofacteurs peuvent être des chaperons de protéines qui augmentent significativement le rendement de la conversion *in vitro* (DeBurman, Raymond et al. 1997), les glycosaminoglycanes, les héparanes sulfate, les protéoglycanes (Wong, Xiong et al. 2001) mais aussi l'ADN double brin (Cordeiro, Machado et al. 2001) ou les ARN isolés à partir de cerveau de mammifères (Deleault, Lucassen et al. 2003). L'identification des molécules servant de cofacteurs à la formation de PrP^{Sc} *in vivo* représente une étape importante pour la compréhension des mécanismes moléculaires du changement de conformation de PrP^C en PrP^{Sc}.

Actuellement, il existe de nombreux modèles basés sur la protéine prion pour étudier les ESST ainsi que leur transmission entre espèces. Un grand nombre de modèles murins développant des ESST ont été créés : souris « ovinisées » (Crozet, Flamant et al. 2001; Vilette, Andreoletti et al. 2001), « bovinisées » (Buschmann and Groschup 2005; Beringue, Bencsik et al. 2006) ou « humanisées » (Asante, Gowland et al. 2002; Beringue, Le Dur et al. 2008). Cependant, aucun traitement n'est disponible contre les maladies à prion (Mallucci and Collinge 2005; Zerr 2008). Différentes approches thérapeutiques visant à réduire le niveau de PrP^{Sc} sont en cours de développement (Karapetyan, Sferrazza et al. 2013). Les études basées sur la protéine PrP sont relativement lourdes à mettre en œuvre, complexes et présentent certaines contraintes dues à sa capacité de transmission à l'homme (expérience réalisées en laboratoire de catégorie 3). C'est pourquoi la levure s'est révélée un bon modèle pour étudier des pathologies humaines en général, et pour étudier le prion en particulier grâce à des protéines qui se comportent comme des prions de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

II. Autres prions

Outre PrP, il existe d'autres protéines se comportant comme des prions chez les animaux. Ces protéines peuvent former des fibres amyloïdes telles que la protéine CPEB chez l'Aplysie, la TIA1 et Pmel17, une protéine impliquée dans la biosynthèse de la mélanine chez l'homme.

II.1 La protéine CPEB

Chez l'Aplysie, une protéine neuronale appartenant à la famille CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein qui régule la traduction des ARNm dormants, possède des propriétés de type prion. La partie N-terminale de CPEB présente un domaine riche en glutamine comme les prions de levure. CPEB se comporte comme une protéine prion lorsqu'elle est exprimée chez la levure (Si, Lindquist et al. 2003). De façon surprenante, c'est la forme dominante

autocatalytique de type prion de CPEB qui a la plus forte capacité à stimuler la traduction des ARNm régulés par CPEB.

Le comportement de type prion de la protéine CPEB de l'Aplysie a aussi été observé lorsque CPEB est exprimée de façon exogène dans des neurones sensoriels. CPEB pourrait agir comme une protéine prion auto-catalytique au niveau du système nerveux et pourrait ainsi permettre aux changements synaptiques liés à son activité de persister pour de longues périodes (Si, Giustetto et al. 2010), d'où son implication possible dans le stockage de la mémoire à long terme.

II.2 TIA1

La protéine TUA1 est une protéine humaine impliquée dans l'assemblage des granules de stress (SGs) lors de l'initiation de la traduction. En culture, elle adopterait une conformation prion qui régule la traduction en réponse à un stress (Gilks, Kedersha et al. 2004).

III. Les prions de champignons

III.1 La levure *Saccharomyces cerevisiae*, un modèle simple pour l'étude des prions

La levure a été utilisée depuis l'antiquité pour les applications biotechnologiques majeures que sont la fermentation de sucres en alcool et la panification. *Saccharomyces cerevisiae*, la levure de boulanger ou de brasseur, constitue également un organisme modèle très utilisé en biologie depuis sa découverte par Louis Pasteur, du fait de la conservation de la plupart des mécanismes cellulaires entre la levure et les mammifères. Ainsi, les deux systèmes de défenses cellulaires lors de l'accumulation de protéines anormalement repliées sont très conservés de la levure à l'homme :

- Les chaperons moléculaires (Hsp40p, Hsp70p, Hsp90p) permettent soit d'aider au repliement des protéines mal repliées ou de les adresser vers une voie de dégradation rapide (Frydman 2001).
- Le système ubiquitine-protéasome qui est impliqué dans la dégradation des protéines mal repliées (Hershko and Ciechanover 1998; Schwartz and Ciechanover 1999).

Par ailleurs, *S. cerevisiae* est l'organisme eucaryote pour lequel le plus d'outils et de techniques génétiques, cellulaires et moléculaires sont disponibles. Elle a été le premier eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé (Goffeau, Barrell et al. 1996), initiant ainsi toutes les grandes approches globales telles que transcriptomique, protéomique, interactomique, métabolomique etc... Toutes ces approches globales ont montré qu'en plus de la grande conservation des mécanismes biologiques essentiels de la levure à l'homme, les acteurs eux-mêmes (gènes, ARN, protéines) sont également fréquemment conservés. Ainsi, de nombreux modèles levure ont été mis au point pour étudier différentes pathologies humaines allant du cancer aux maladies génétiques ou neurodégénératives.

De plus, le modèle levure possède un certain nombre d'avantages pratiques et économiques tels qu'un temps de génération court, une expression facile de gènes hétérologues, la possibilité de manière relativement aisée et rapide d'y pratiquer la mutagenèse dirigée tant sur les génomes nucléiques que mitochondriaux, des milieux de culture (solide ou liquide) simples et bon marchés. Enfin, la levure possède des protéines qui se comportent comme des prions et présentant l'énorme avantage de n'être toxiques ni pour la levure les portant ni pour l'expérimentateur (Couzin 2002). Tous ces critères font de la levure un modèle pertinent pour l'étude des pathologies humaines, notamment les maladies à prion, et ceci malgré l'absence d'un homologue de la protéine prion PrP chez la levure.

III.2 Les prions de la levure *S. cerevisiae*

Depuis l'identification de la protéine PrP dont l'isoforme pathologique PrP^{Sc} est à l'origine des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients atteints de la MCJ et d'autres ESST, le prion est associé à la notion de pathologie. Mais la découverte des protéines qui se comportent comme de prions chez la levure et chez le champignon filamenteux *Podospora anserina* a changé ce regard. En effet, ces prions ne confèrent pas de « maladies » à la levure et pourrait même, dans certaines situations, être bénéfiques pour les cellules les contenant (Tuite 2013). La plupart des prions de levure identifiés apportent des avantages aux cellules porteuses en conditions de stress (Eaglestone, Cox et al. 1999; Namy, Galopier et al. 2008). Comme la protéine PrP de mammifère, les prions de levure adoptent deux formes, soit soluble définissant le phénotype [*prion*-], soit insoluble agrégée pour le phénotype [*PRION*+] . A l'heure actuelle, au moins dix protéines se comportant comme des prions ont été décrites chez la levure *S. cerevisiae* (Liebman and Chernoff 2012). Deux prions sont plus exploités que les autres dans l'étude du prion. Il s'agit de [*PSI*+], découvert en 1965 par Brian Cox (Cox 1971; Serio and Lindquist 1999) et [*URE3*], découvert en 1971 par François Lacroute et Michel Aigle (Tuite 2013 ; Aigle and Lacroute 1975) les formes prions des protéines Sup35 et Ure2, respectivement. Il faut noter que les prions de levures sont impliqués dans les activités ou les régulations de divers processus cellulaires, comme la transcription ou

la traduction (Liebman and Chernoff 2012). Les prions de levure sont des protéines cytosoliques, contrairement à la protéine PrP qui est une protéine ancrée à la membrane plasmique par une ancre GPI.

Les caractéristiques génétiques des prions de levure ont été bien résumées par B. Wickner (Wickner, Edskes et al. 2006) :

- Phénotype dominant : si une cellule haploïde de phénotype [*PRION+*] est croisée avec une cellule haploïde de phénotype [*prion-*], la cellule diploïde obtenue présente un phénotype [*PRION+*].
- Hérité cytoplasmique : si le cytoplasme d'une cellule donneuse de phénotype [*PRION+*] est mis en contact avec celui d'une cellule receveuse de phénotype [*prion-*], la cellule receveuse verra son phénotype transformé en [*PRION+*].
- Ségrégation non-mendélienne : la sporulation de diploïdes de phénotype [*PRION+*] issus du croisement d'un haploïde [*PRION+*] avec un haploïde [*prion-*] donnera le plus souvent des tétrades dont toutes les spores sont de phénotype [*PRION+*]. On obtient donc une ségrégation de type 4 : 0 au lieu de 2 : 2 selon les lois de Mendel.
- La propagation du phénotype [*PRION+*], notamment des phénotypes prion [*PSI+*] et [*URE3*] des protéines Sup35 et Ure2 respectivement, nécessite l'expression de ces protéines et dépend de la présence de leur domaines prions (PrD).
- La cure de [*PRION+*] est réversible. Une souche contenant un prion peut être curée avec une dose de 1 à 5 mM de Chlorure de Guanidium (GuHCl). Le phénotype [*PRION+*] peut réapparaître spontanément avec la même fréquence que celle observée pour les conversions spontanées (10^{-5} à 10^{-6}).

- La surproduction de la protéine prion dans les cellules [*psi*-] augmente la fréquence d'apparition du phénotype [*PRION*+].

Tout ceci suggère que la fonction biologique est assurée par la forme soluble de la protéine et que le phénotype prion correspond à une perte plus ou moins complète de fonction.

III.2.1 Le phénotype prion [*PSI*+] et la protéine Sup35

La nature du phénotype [*PSI*+] est restée mystérieuse pendant plus de 30 ans. Les premières indications expérimentales suggéraient une connexion entre le phénotype [*PSI*+] et Sup35p, une protéine cytoplasmique. La surproduction de la protéine Sup35 (i) cause des défauts de croissance chez les souches [*PSI*+] mais pas chez les souches [*psi*-] (Chernoff et al. 1992), (ii) induit l'apparition du phénotype [*PSI*+] chez les cellules [*psi*-] (Chernoff, Derkatch et al. 1993). Le phénotype [*PSI*+] est donc lié la forme prion de la protéine Sup35. Cette protéine est l'homologue du facteur de terminaison de la traduction eRF3 conservé chez tous les eucaryotes. Sup35p forme un complexe avec Sup45p (homologue d'eRF1 chez l'homme), un facteur de terminaison de la traduction, qui reconnaît les codons stops des ARN messagers.

III.2.1.1 Structure de la protéine Sup35

Sup35p est une protéine essentielle de 685 acides aminés, composée de 3 domaines (figure 11) :

- Le domaine N-terminal (1-123) est divisé en 2 régions. La première région (1-42), riche en résidus asparagine et glutamine, est nécessaire et suffisante pour induire le phénotype [*PSI*+] (Derkatch, Chernoff et al. 1996). La deuxième région (43-123) contient 6 répétitions d'un oligopeptide PQGGYQQ_YN qui est nécessaire pour la propagation du phénotype prion (DePace, Santoso et al. 1998; Derkatch, Bradley et al. 1999; Kochneva-Pervukhova, Paushkin et al. 1998; Liu, Sondheimer et al. 2002; Osherovich, Cox et al. 2004).

- Le domaine central, ou domaine M (124-253). Ce domaine est riche en acide aspartique, acide glutamique et lysine, il est donc particulièrement chargé par rapport au reste de la protéine. Ce domaine n'est essentiel ni pour la fonction cellulaire ni pour la fonction prion de la protéine Sup35. Il pourrait cependant jouer un rôle dans la stabilité du prion lors de la mitose et de la méiose (Liu, Sondheimer et al. 2002). Le domaine M peut interagir directement avec le chaperon de protéines Hsp104p (Helsen and Glover 2012).
- Le domaine C (254-685) est essentiel puisque sa délétion est létale pour la cellule (Ter-Avanesyan, Kushnirov et al. 1993). Il est homologue au facteur eRF3 et est suffisant pour assurer la fonction de terminaison de la traduction (Kushnirov and Ter-Avanesyan 1998).

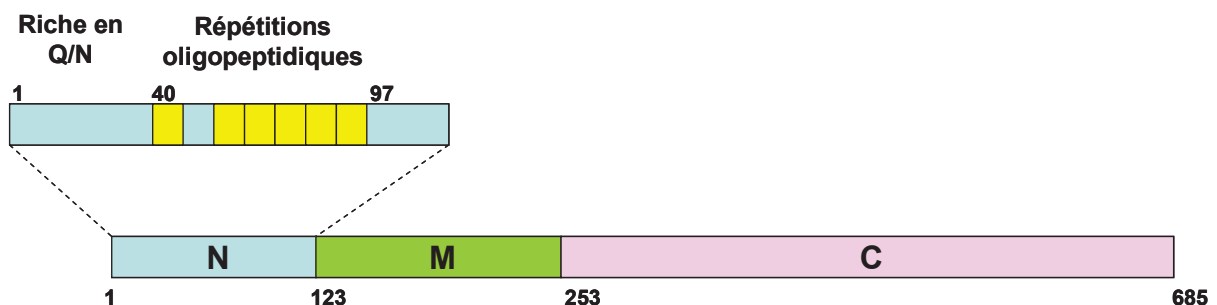


Figure 11. Structure de la protéine Sup35p (d'après Tuite 2003).

La protéine est composée de 3 parties : (i) le domaine N (1-123) ou domaine prion, essentiellement constitué d'acides aminés polaires non chargés et composé d'une région riche en asparagine/glutamine et d'une région riche en répétitions oligopeptidiques; (ii) le domaine M (124-253) jouerait un rôle dans la stabilité du prion lors de la mitose et de la méiose; (iii) le domaine C (254-685) assure la fonction cellulaire de terminateur de traduction de Sup35p.

III.2.1.2 Système rapporteur pour la visualisation de l'état prion [PSI+] de Sup35p

La détermination du phénotype prion [PSI+] se fait par un système de coloration blanc-rouge basé sur le niveau de suppression d'un codon non-sens dans la phase de lecture du gène *ADE1*. La présence d'un codon stop opale prématuré dans le gène *ADE1* (mutation *ade1-14*) conduit à une auxotrophie pour l'adénine (Chien, Weissman et al. 2004 ; Wickner, Edskes et al. 2002; Wickner, Edskes et al. 2007). En effet, le gène *ADE1* code la protéine Ade1p, une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'adénine. Du fait de cette mutation, la protéine Ade1p n'est pas synthétisée, ce qui conduit à l'accumulation d'un sous-produit de la voie de biosynthèse de l'adénine nommé AIR (5-aminoimidazole ribonucléotide) qui devient rouge après oxydation durant les phases de croissance post-diauxique et stationnaire.

Le système rapporteur est donc basé sur la fidélité de la synthèse protéique *via* l'utilisation de l'allèle *ade1-14* qui possède un codon stop prématuré UGA à la place du codon UGG (tryptophane) en position 240. Dans les cellules [*psi*-], Sup35p est sous forme active non agrégée. Elle forme avec Sup45p un complexe de terminaison de la traduction lorsque le codon stop prématuré entre dans le site A de ribosome. Le complexe de facteurs de terminaison de la traduction Sup5p/Sup45p empêche la synthèse d'Ade1p complète, les cellules [*psi*-] sont donc incapables de pousser sur un milieu minimum dépourvu d'adénine et forment des colonies rouges sur un milieu riche. Dans les cellules [PSI+], Sup35p est majoritairement présente sous forme agrégée et inactive. Le ribosome ne s'arrête pas systématiquement au niveau des codons stops lors de la traduction. L'augmentation de translecture du codon stop prématuré du gène *ade1-14* permet aux cellules de produire Ade1p et donc de pousser sur un milieu dépourvu d'adénine, et de former des colonies blanches sur un milieu riche (figure 12).

L'allèle *ade1-14* du gène *ADE1* constitue un système rapporteur très pratique et facile à utiliser pour évaluer l'état d'agrégation de la protéine Sup35p (Chernoff, Lindquist et al. 1995). Comme la Sup35p est une protéine essentielle, le phénotype

[PSI+] ne correspond qu'à une inactivation partielle des protéines Sup35p. Il existe différentes souches de prion [PSI+] qui correspondent à des agrégats de Sup35p de tailles et de structures différentes, ainsi qu'à une proportion de Sup35p soluble variable. La souche de prion [PSI+] « *strong* » donne des colonies de levure de couleur blanche car la majorité de la protéine Sup35p est sous forme agrégée, alors que la souche [PSI+] « *weak* » contient une plus grande proportion de Sup35p sous forme soluble ce qui donne des colonies de couleur rosée (Tuite 2013).

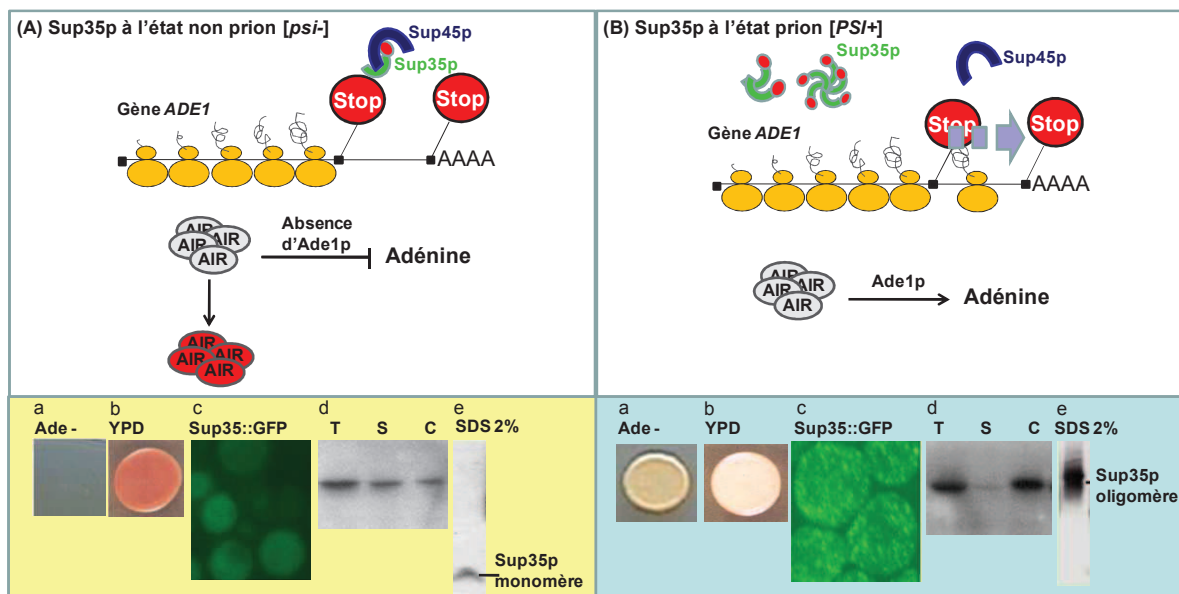


Figure 12. Le système rapporteur de [PSI+] (d'après Liebman and Chernoff 2012).

- (A) Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction. Lorsqu'elle est sous une conformation non agrégée dans une cellule ayant un codon stop prématuré dans le gène *ADE1*, Sup35p forme avec Sup45p un complexe de terminaison de la traduction ce qui empêche la synthèse complète de la protéine Ade1. Cette protéine étant nécessaire dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine, son absence provoque un arrêt dans la chaîne et l'accumulation d'un sous-produit AIR (5-aminoimidazole ribonucléotide) qui devient rouge après oxydation. La souche [*psi*-] est donc incapable de pousser sur un milieu Ade- (a), et forme des colonies rouges sur un milieu riche (b). Sup35p fusionné à la GFP (Sup35p::GFP) diffuse dans les cellules (c). Sup35p se trouve majoritairement dans la fraction soluble du lysat cellulaire (d) (T : Total, S : Surnageant et C : Culot). Sup35p est sous forme monomérique (e).
- (B) Sup35p est à l'état prion, agrégée. Elle ne peut plus former de complexe avec Sup45p lors de la traduction. Il y a alors une translecture du codon stop prématuré dans le gène *ade1-14*. Ade1p est produite ce qui permet la biosynthèse de l'adénine. La souche [PSI+] est donc capable de pousser sur un milieu Ade- (a), et forme des colonies blanches sur un milieu riche (b). Sup35p::GFP forme des agrégats dans les cellules (c). Les agrégats de Sup35p se trouvent majoritairement dans la fraction insoluble du lysat cellulaire (d). Sup35 est sous forme oligomérique (e).

III.2.2 Le phénotype prion [URE3] et la protéine Ure2p

Le phénotype prion [URE3] correspond à la forme prion de la protéine Ure2p qui est un régulateur du métabolisme azoté codé par le gène *URE2* (Lacroute 1971). L'Ure2p est une protéine de 354 acides aminés, dont le domaine N-terminal (1-93) est non structuré et contient un taux élevé de résidus asparagine et glutamine (44%). Cette partie N-terminale correspond au domaine prion qui est nécessaire et suffisant pour induire le phénotype prion [URE3]. Le domaine C-terminal (94-354) est riche en hélice α et très structuré (Thual, Komar et al. 1999). Il est responsable de l'activité de la protéine. Le domaine C-terminal est homologue aux Glutathion S-Transférases (GST) bactériennes (Bousset, Belrhali et al. 2001) (figure 13A).

La protéine Ure2p inhibe la production de la perméase Dal5p, codée par le gène *DAL5*, qui est nécessaire à l'entrée dans les levures de l'allantoate mais aussi de l'ureidosuccinate (USA), un homologue structural de l'allantoate. Chez la levure, l'USA intervient dans la chaîne de biosynthèse de l'uracile. Il est le produit de la transformation du carbamyl phosphate par l'enzyme Ura2p mais il peut également être importé dans la cellule par la perméase Dal5p (Turoscy and Cooper 1987) (figure 13B et C).

L'expression du gène *DAL5* est dépendante de la source d'azote présente. Son expression est induite en présence de source pauvre en azote comme l'allantoate, et non induite en présence de source riche en azote comme l'ammonium. L'interaction entre le facteur de la transcription Gln3p et Ure2p régule l'expression du gène *DAL5* :

- Sur un milieu contenant une source riche en azote (ammonium, glutamine), le facteur Gln3p est complexé à la protéine Ure2p soluble. Ce complexe séquestre Gln3p dans le cytoplasme l'empêchant d'accéder à ses gènes cibles possédant la boîte TATA, dont le gène *DAL5*. La perméase Dal5p ne sera donc pas produite. Les souches *ura2Δ* sont donc incapables de pousser sur un milieu dépourvu d'uracile (figure 13B).

- En présence d'une source pauvre en azote (allantoate, proline, urée, arginine), Ure2p ne s'associe pas avec Gln3p qui est acheminée dans le noyau et induit l'expression de ses gènes cibles, notamment *DAL5* (Coffman, el Berry et al. 1994; Cai, Hauser et al. 2007). La perméase permet l'entrée de l'USA dans la cellule et l'uracile est ainsi synthétisé.

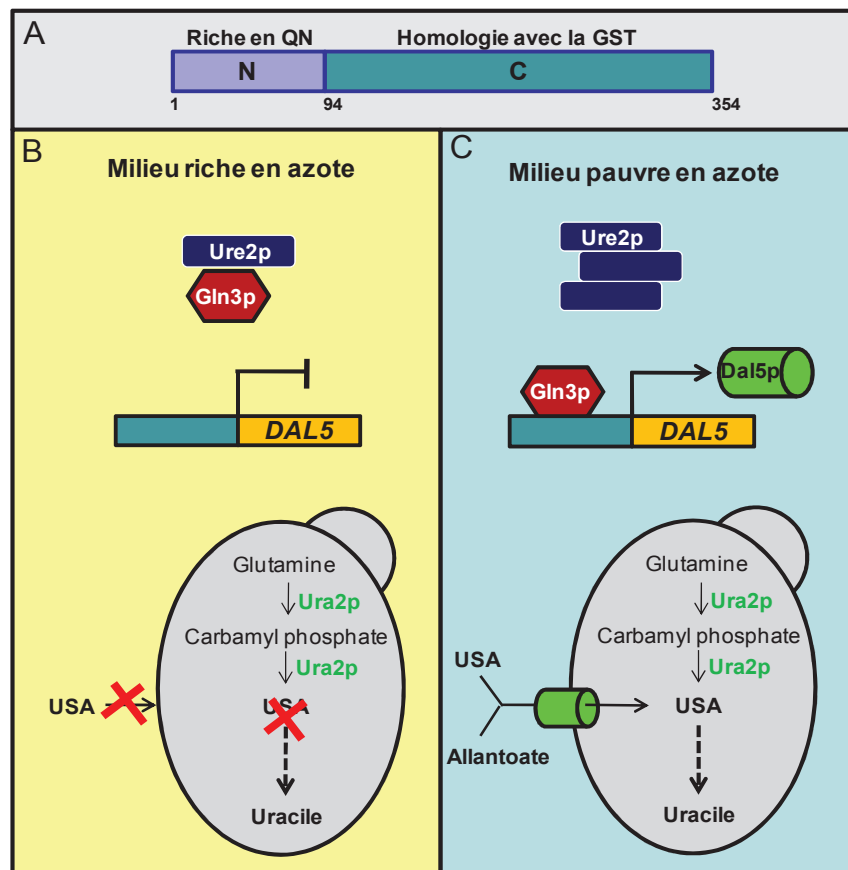


Figure 13. Implication de Ure2p dans la biosynthèse de l'uracile (d'après Fernandez-Bellot and Cullin 2001).

- (A) Ure2p est formée de deux parties : la partie N-terminale (1-93) riche en glutamine et asparagine et la partie C-terminale (94-354) qui est homologue aux Glutathiones S-transférase.
- (B) Dans un milieu riche en azote, Ure2p à l'état non prion (non agrégée), inhibe la fixation du facteur de transcription Gln3p sur ses gènes cibles dont *DAL5* qui code la Dal5p, une perméase. Dal5p n'est pas produite. L'Urédosuccinate (USA) ne peut pas entrer dans les cellules. Par conséquent, la biosynthèse de l'uracile est arrêtée chez les souches *ura2Δ*.
- (C) Ure2p est à l'état prion (agrégée), Gln3p pourra aller activer la transcription de *DAL5*. La perméase Dal5p est produite. L'entrée de l'intermédiaire USA par la perméase Dal5p grâce à son homologie structurale avec l'allantoate permet la biosynthèse de l'uracile. Les souches *ura2Δ* peuvent se pousser sur un milieu dépourvu d'uracile.

Système rapporteur pour la visualisation de l'état prion [URE3] de Ure2p

Le phénotype prion [URE3] peut également être détecté par un système rapporteur de coloration blanc-rouge (Schlumpberger, Prusiner et al. 2001). Dans celui-ci, le gène *ADE2* codant Ade2p, une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine, est placé sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5* (figure 14). Lorsque Ure2p est sous forme prion agrégée dans les cellules [URE3], Gln3p n'est pas séquestrée et elle active la synthèse de la protéine Ade2p via l'induction du promoteur du gène *DAL5*. Comme [*PSI+*], les cellules [URE3] forment des colonies blanches sur un milieu riche et sont capables de pousser sur un milieu dépourvu d'adénine. Inversement, lorsque Ure2p est sous forme soluble non prion dans les cellules [*ure3-0*], elle se fixe au facteur de transcription Gln3p dans le cytoplasme. La protéine Ade2p n'est donc pas synthétisée ce qui se traduit par un arrêt dans la voie de biosynthèse de l'adénine et l'accumulation du métabolite AIR qui confère une coloration rouge aux colonies. Les levures [*ure3-0*] forment donc des colonies rouges sur un milieu riche et sont incapables de pousser sur un milieu dépourvu d'adénine (figure 14).

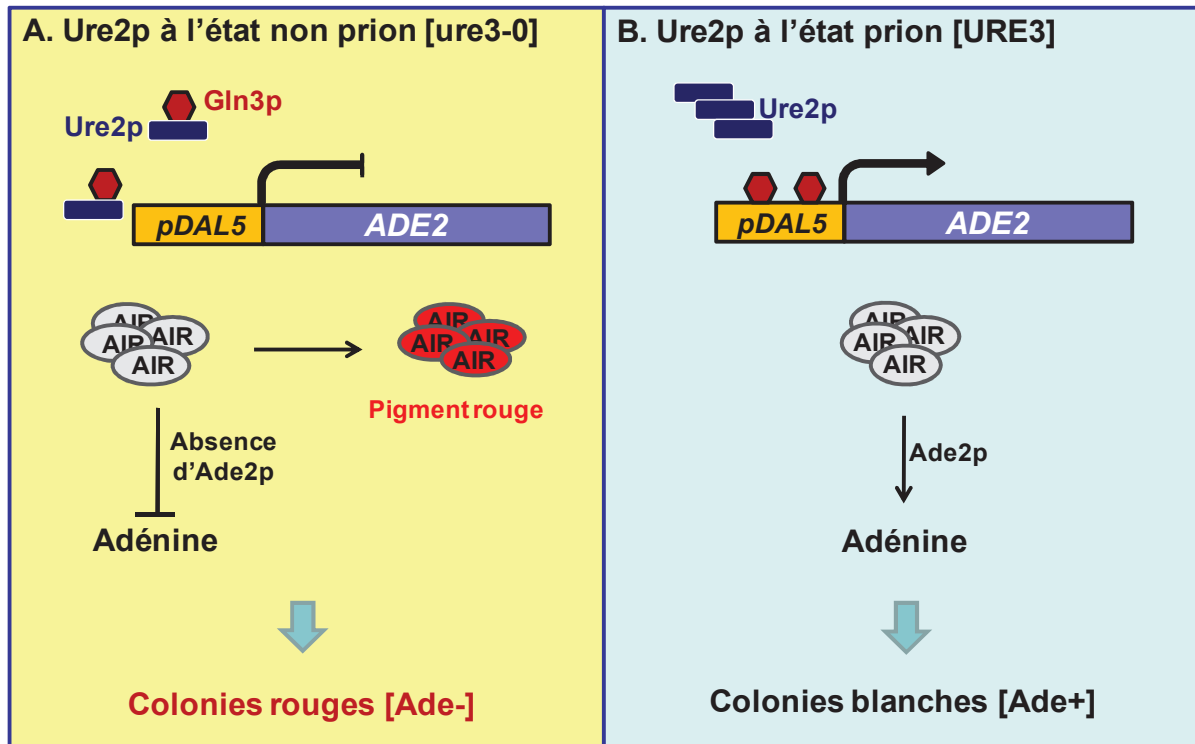


Figure 14. Le système rapporteur de [URE3] basé sur le gène *ADE2*.

- (A) Le gène *ADE2* est placé sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5* (*pDAL5*). Lorsque Ure2p est sous forme soluble, elle se lie à la protéine Gln3p qui ne peut donc pas activer la transcription du gène *ADE2*, il n'y a donc pas de synthèse d'Ade2p. Comme dans le cas des cellules [*psi*⁻], les cellules [*ure3-0*] forment alors des colonies rouges sur un milieu riche et ne peuvent pas pousser sur un milieu dépourvu d'adénine.
- (B) Au contraire, lorsque Ure2p est sous forme prion agrégée, elle ne peut plus se lier à la protéine Gln3p, qui pourra ainsi activer la transcription du gène *ADE2*. Les cellules [URE3] forment donc des colonies blanches sur un milieu riche et sont capables de pousser sur un milieu dépourvu d'adénine.

III.2.3 Autres prions de *S. cerevisiae*

Le phénotype [PIN+]

Le phénotype prion [RNQ+] de la protéine Rnq1p est plus connu sous le nom de [PIN+] pour « [*PSI*+] *Inducibility* ». La présence du prion [PIN+] est nécessaire pour l'apparition de *novo* du prion [PSI+], mais pas pour sa propagation. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que [PIN+] séquestre des facteurs cellulaires inhibiteurs de la formation de [PSI+] ou encore selon le modèle « seeding », les agrégats [PIN+] faciliterait l'apparition de [PSI+] en servant de modèle « patron » pour l'agrégation des isoformes cellulaires de Sup35p.

La protéine responsable du phénotype [*PIN+*], Rnq1p (pour Rich in asparagine and glutamine), est constituée de 405 résidus, elle contient une région riche en asparagine et en glutamine située entre les acides aminés 153 et 405. Ce domaine riche en Asn et Gln possède les mêmes caractéristiques que les domaines MN de *SUP35*. De plus, sa surproduction entraîne l'agrégation de Rnq1p, agrégation qui se transmet de façon dominante (Patino, Liu et al. 1996).

Autres prions

Plusieurs protéines prion ont récemment été identifiées, elles sont généralement impliquées dans la régulation de la transcription telles que le phénotype [*ISP+*] de la protéine Sfp1 (Volkov, Aksenova et al. 2002 ; Rogoza, Goginashvili et al.), le phénotype [*OCT+*] de la protéine Cyc8 (Patel, Gavin-Smyth et al. 2009), le phénotype [*SWI+*] de la protéine Swi1 (Du, Park et al. 2008, 2010) ou encore le phénotype [*MOD5*] de la protéine Mod5 (Suzuki, Shimazu et al. 2012). Par une approche bioinformatique, l'équipe de S Alberti a étudié 100 protéines prions candidates chez la levure *S. cerevisiae* dont 19 pourraient former des prions, parmi elles, le phénotype [*MOT3*] de la protéine Mot3 (Alberti, Halfmann et al. 2009) (tableau 5)

Tableau 5. Les principaux prions de la levure *S. cerevisiae* et leurs caractéristiques (d'après Liebman and Chernoff 2012)

Prion	[PSI+] ^a	[PIN+] ^b	[URE3] ^c	[SWI+] ^d	[OCT+] ^e	[MOT3] ^f	[ISP+] ^g	[MOD5] ^h
Protéine	Sup35	Rnq1	Ure2	Swi1	Cyc8	Mot3	Sfp1	Mod5
Fonction associée	Terminaison de la traduction	inconnue	Régulation du métabolisme azoté	Régulation de la transcription	Régulation de la transcription	Régulation de la transcription	Régulation de la transcription	Isopentenyl transférase
Phénotype prion	Perte de fonction	Apparition de prions hétérologues	Perte de fonction	Perte de fonction	Perte de fonction	Perte de fonction	Perte de fonction	protège cellule à des agents antifongiques
Infectiosité des fibres	Oui	Oui	Oui	Oui	ND	Oui	ND	ND
Amyloïdes	Oui	Oui	Oui	Oui	ND	Oui	ND	Oui
Domaine QN	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Variantes isolés	Oui	Oui	Oui	ND	ND	ND	ND	ND
Curé par ΔHSP104	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Curé par GuHCl	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Trouvé dans la nature	Oui	Oui	Non	ND	ND	ND	ND	Oui

^a (Cox, 1965 ; Chernoff et al, 1993, 1995, 2000 ; Doel, McCready et al. 1994 ; Ter-Avanesyan, Dagkesamanskaya et al. 1994) ; Wickner 1994 ; Glover, Kowal et al. 1997 ; King, Tittmann et al. 1997 ; Resende, Outeiro et al. 2003 ; King and Diaz-Avalos 2004 ; (Tanaka, Chien et al. 2004 ; Nakayashiki, Kurtzman et al. 2005).

^b (Derkatch et al, 1997, 2001 ; Sondheimer, Lopez et al. 2001 ; Bradley, Edskes et al. 2002 ; Resende, Outeiro et al. 2003 ; Nakayashiki, Kurtzman et al. 2005 ; Patel and Liebman 2007).

^c (Lacroute, 1971 ; Wickner 1994 ; Moriyama, Edskes et al. 2000 ; Schlumpberger, Prusiner et al. 2001 ; Brachmann, Baxa et al. 2005 ; Nakayashiki, Kurtzman et al. 2005).

^d (Du, Park et al. 2008, 2010 ; Crow, Du et al.).

^e (Patel, Gavin-Smyth et al. 2009).

^f (Alberti, Halfmann et al. 2009).

^g (Volkov, Aksenova et al. 2002 ; Rogoza, Goginashvili et al.).

^h (Suzuki et al. 2012)

(ND: Non déterminé)

III.3 Le prion [Het-s] de *Podospora anserina*

Podospora anserina est un champignon filamenteux ascomycète. Il est le seul champignon autre que les levures possédant un élément génétique non mendélien nommé [Het-s]. La protéine HET-s fait partie d'un complexe protéique lié à la reconnaissance du soi et à la réaction d'incompatibilité végétative (Saupe, Clave et al. 2000 ; Coppin, Debuchy et al. 1997 ; Glass, Jakobson et al. 2000). Comme tous les champignons filamenteux, *P. anserina* est formé par un réseau d'hyphes formant le mycélium. Au cours de la croissance, ses hyphes peuvent fusionner avec un filament appartenant à un autre individu *P. anserina*. Si les champignons sont génétiquement

différents au niveau de certains *loci*, il se produit une réaction de mort cellulaire appelée réaction d'incompatibilité hétérocaryotique ou végétative.

La viabilité de ces hétérocaryons est génétiquement contrôlée par les *loci* HET (heterocaryon incompatibility). Parmi eux, le locus *het-s* possède deux formes alléliques distinctes *het-s* et *het-S* codant les protéines HET-s et HET-S, qui diffèrent de 13 acides aminés sur 289, et qui sont impliquées dans la réaction de mort cellulaire par incompatibilité végétative (Turcq, Deleu et al. 1991). HET-s peut adopter une conformation prion [Het-s] ou une forme non prion [Het-s*]. Une souche [Het-s*] peut basculer vers l'état prion [Het-s] de façon spontanée à faible fréquence, ou de façon systématique après contact cytoplasmique avec une souche [Het-s]. Le phénotype [Het-s] est donc invasif et dominant dans une souche [Het-s*] (Seuring, Greenwald et al. 2012 ;). La protéine HET-s est donc une protéine prion car elle présente un caractère infectieux et est capable de former des fibres amyloïdes riches en feuillets β comme Sup35p dans une souche [Het-s] (Coustou-Linares, Maddelein et al. 2001; Coustou, Deleu et al. 1997 ; Ritter, Maddelein et al. 2005).

Lorsqu'un mycélium [Het-s] fusionne avec un mycélium [Het-S], il y a morte de la cellule fusion (Saupe, Clave et al. 2000). Par contre, un mycélium [Het-s*] est compatible avec un mycélium [Het-S]. Donc, seule la forme prion [Het-s] de HET-s est capable de provoquer la réaction de morte cellulaire lorsqu'elle est en contact avec la protéine HET-S. Le phénotype prion [Het-s] correspond donc à un gain de fonction et non à une perte de fonction de la protéine correspondante, contrairement à [PSI+] et [URE3] (figure 15).

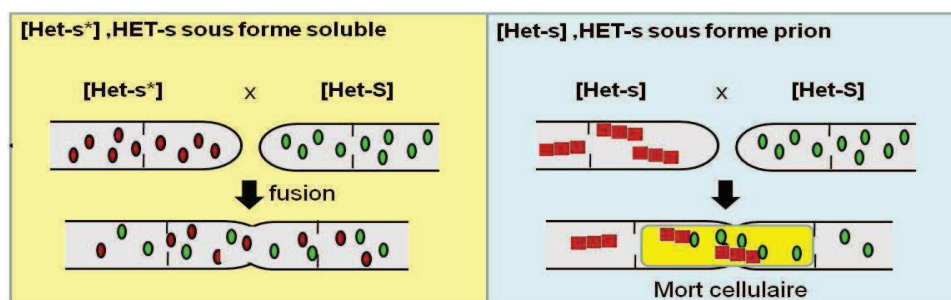


Figure 15. La réaction de mort cellulaire par incompatibilité végétative (d'après Benkemoun and Saupe 2006).

Lors de la croissance hyphale, deux cellules apicales peuvent se rencontrer et fusionner. Dans le cas de deux souches compatibles ([Het-s*] et [Het-S]) l'hétérocaryon est viable. Si les deux souches sont incompatibles ([Het-s] et [Het-S]), une réaction de mort cellulaire se met en place.

III.4 Propagation des prions de levure

La forme [*PRION+*] chez les levures peut être propagée au cours des générations par un mécanisme qui assure la transmission des germes infectieux (« prion seeds ») de la cellule mère aux cellules filles. Ce mécanisme de propagation est similaire à celui du prion de mammifère PrP^{Sc} (Tuite and Koloteva-Levin 2004) et consiste en trois étapes (figure 16) :

- (1) **Polymérisation** : la protéine prion sous forme monomérique soluble interagit avec les prions préexistants. Elle est ensuite convertie sous forme prion, entraînant la formation de fibres amyloïdes. Cela correspond au recrutement de PrP^{Sc} monomériques pour former des fibres amyloïdes chez les mammifères.
- (2) **Fragmentation**: les fibres amyloïdes sont fragmentées pour produire des polymères de faible masse molaire. Ces petits fragments de fibre de prion sont considérés comme des germes infectieux qui, à leur tour, peuvent convertir la forme soluble en forme prion. Cette étape nécessite des facteurs cellulaires, les chaperons de protéines, notamment Hsp104p (Heat Shock Protein de 104 kDa). Hsp104p est impliquée dans les mécanismes de propagation de tous les prions de levure identifiés jusqu'à présent (Grimminger-Marquardt and Lashuel; Jones and Tuite 2005), mais son rôle dans la propagation du prion [*Het-s*] reste mal connu (Malato, Dos Reis et al. 2007).
- (3) **Transmission des germes infectieux** : les germes infectieux sont transmis aux cellules filles. Un nombre minimum de germes infectieux doit être transmis afin d'assurer la propagation du prion au cours des générations.

La fibre amyloïde est le support de l'information prion, elle est donc indispensable pour la propagation au cours des divisions cellulaires. Cette fibre amyloïde doit être fragmentée afin d'obtenir des fragments de petites tailles appelés propagons ou

encore germes infectieux, permettant la transmission de l'information prion (Kushnirov and Ter-Avanesyan 1998). Le propagon est l'entité épigénétique suffisante et nécessaire pour propager l'information prion de la cellule mère aux cellules filles au cours des divisions mitotiques et méiotiques. Il est capable de convertir des formes cellulaires néo-synthétisées en forme prion. Plus il y a de propagons dans une cellule, meilleure sera la transmission de « l'information prion » au cours des divisions cellulaires (Derkatch, Chernoff et al. 1996; Cox, Ness et al. 2003). La taille des propagons a également un lien avec l'efficacité de transmission de l'information prion (Sindi and Serio 2009; Derdowski, Sindi et al.). Les agrégats de tailles différentes sont transmis aux cellules filles avec des efficacités différentes. La fragmentation des agrégats prions en de petits fragments nécessite une activité de type désagrégase qui est portée par des chaperons de protéines, notamment Hsp104p. Néanmoins, la nature moléculaire exacte de ces fragments d'agrégats n'a pas encore été résolue que ce soit pour les petits ou les grands agrégats prion.

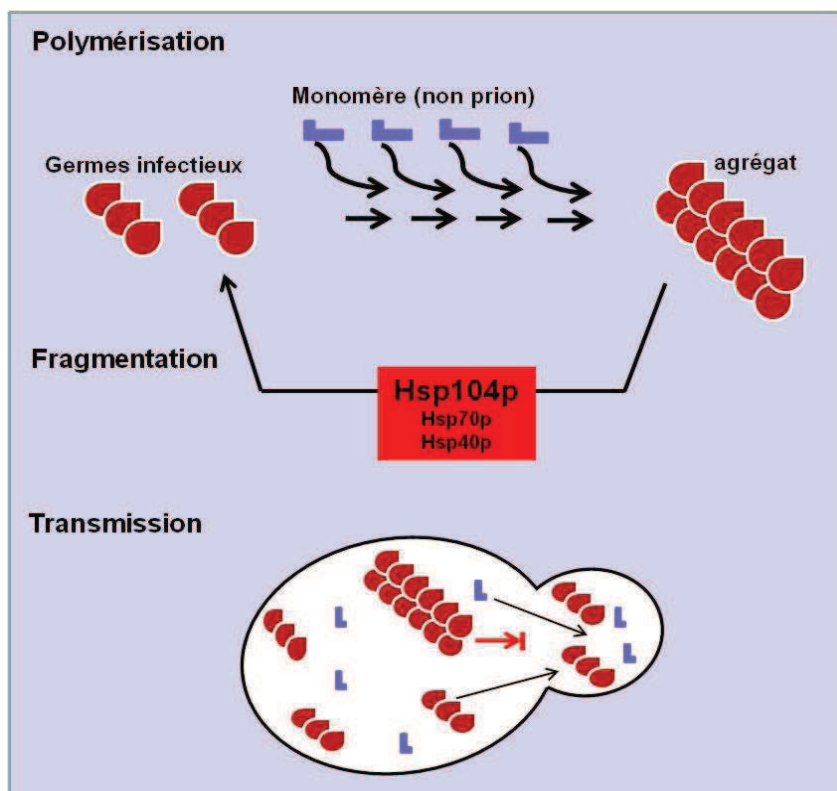


Figure 16. Le cycle de propagation des prions chez la levure (d'après Staniforth and Tuite 2012).

La polymérisation permet d'allonger les agrégats en recrutant les monomères. Les facteurs cellulaires, notamment les chaperons de protéines, fragmentent les agrégats en fragments de petite taille ou germes infectieux. Ces germes infectieux peuvent recruter les monomères pour former des agrégats ou bien être transmis aux cellules filles permettant la propagation du prion au cours des générations.

III.5 Les facteurs interférant avec l'apparition et la propagation des prions de levure

Il y a actuellement plusieurs facteurs connus pour être impliqués dans l'apparition et la propagation des prions de levure tels que la présence d'un domaine prion qui est nécessaire à la formation de prion, et des facteurs protéiques notamment des chaperons de protéines pour la propagation du prion au cours des générations.

III.5.1 Rôle du domaine prion

Les protéines prion de champignon contiennent dans leur partie N-terminale (Sup35p, Ure2p) ou C-terminale (HET-s de *P. anserina*) un domaine qui est essentiel pour le changement de conformation entraînant la formation de prion, nommé le domaine prion (PrD pour « prion domain ») (figure 17). Ce domaine prion n'est pas indispensable au bon fonctionnement de la protéine (Tuite 2000; Ross, Minton et al. 2005). Le domaine prion se caractérise par sa richesse en asparagine/glutamine et par l'absence d'acides aminés chargés et hydrophobes (Alberti, Halfmann et al. 2009; Michelitsch and Weissman 2000 ; Harrison, Yu et al. 2007). Un domaine prion « minimal » peut être dépourvu de glutamine (Crow, Du et al. 2011). Plusieurs études ont suggéré que le domaine prion est un domaine hautement flexible, facilitant ainsi les modifications de conformation (Scheibel and Lindquist 2001). Les domaines prion sont nécessaires à la propagation et au maintien du prion sans le reste de la protéine (Ross, Minton et al. 2005; Inge-Vechtomov, Zhouravleva et al. 2007).

Des modèles de structures différents ont été proposés pour les conformations prion des trois protéines Sup35p, Ure2p et HET-s : un repliement en hélices β pour Sup35p (Kishimoto, Hasegawa et al. 2004; Perutz, Finch et al. 2002), un structure β -serpentine pour les fibres d'Ure2p (Kajava, Baxa et al. 2004) et un structure en solénoïde β pour HET-s (Ritter, Maddelein et al. 2005; Wasmer, Lange et al. 2008) (figure 17). On peut noter que le modèle proposé pour PrP^{Sc} est un repliement en hélices β comme pour Sup35p (Wille, Michelitsch et al. 2002), ces deux protéines possédant des répétitions oligopeptidiques dans leurs domaines prion.

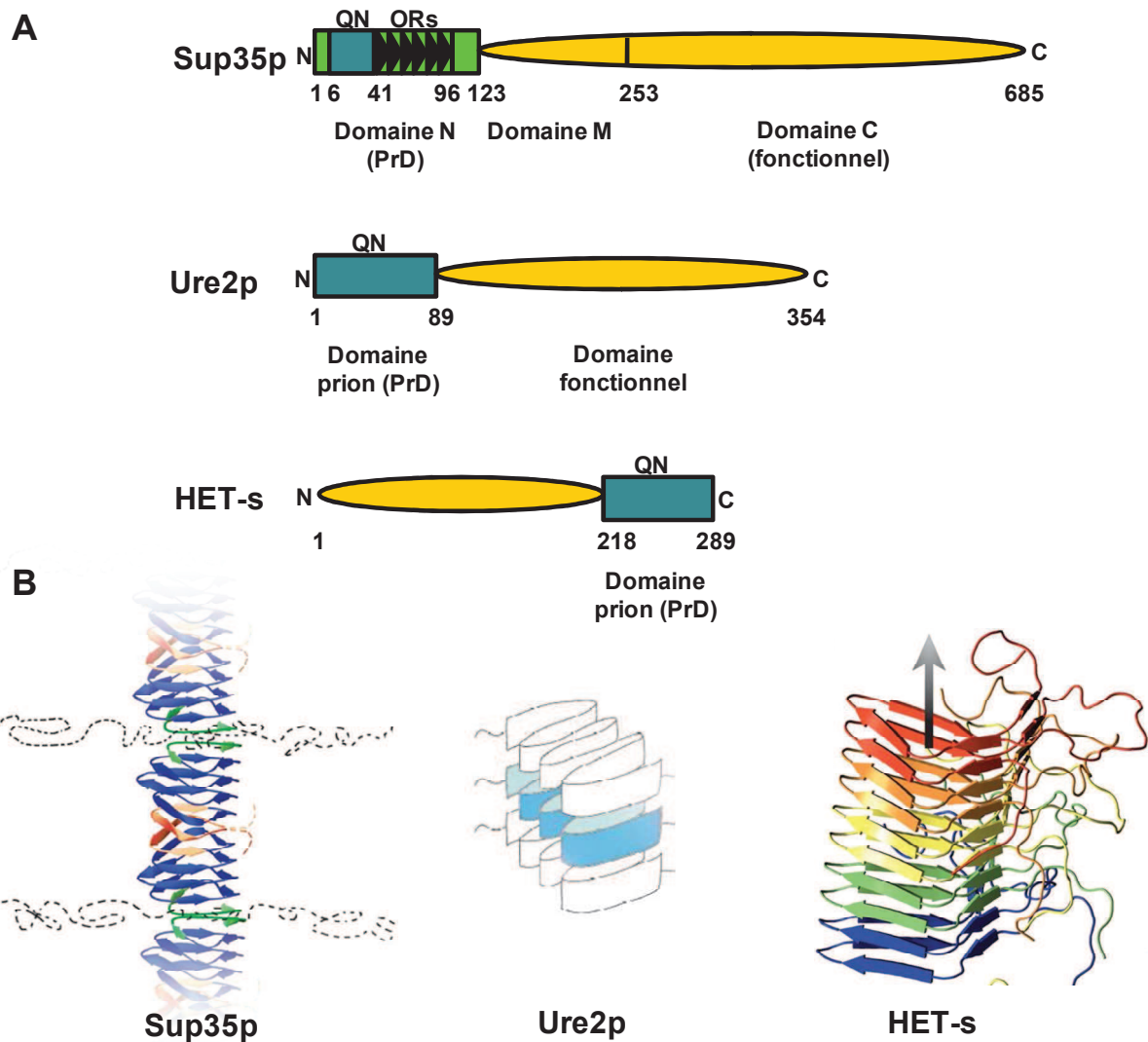


Figure 17. Caractéristiques structurales des prions de champignons (d'après Liebman and Chernoff 2012 ; Benkemoun and Saupe 2006).

- (A) Les différentes protéines prion avec leurs domaines prion (PrD) respectifs : les PrDs sont riches en asparagines et glutamine (QN). Le PrD de HET-s est situé en C-terminal. Seule Sup35p possède des répétitions d'un octapeptide (OR).
- (B) Modèles de fibres amyloïdes : l'interaction intermoléculaire entre tête-tête (rouge) et queue-queue (verte) des domaines N de Sup35p forment des fibres en hélices β . La région centrale du domaine N (bleu) n'entre pas dans l'interaction. Fibres amyloïdes en β serpentine où chaque unité d'Ure2p en zigzag dans un plan perpendiculaire à l'axe de la fibre (Kajava et al. 2004) et la structure en solénoïde β pour HET-s est formée par l'interaction entre les PrD (Liebman and Chernoff 2012).

III.5.2 Les facteurs protéiques

Pour la survie des cellules, en particulier dans des conditions de stress comme un choc thermique, les cellules possèdent des mécanismes de protection dans lesquels les protéines Hsp (heat shock protein) ou chaperon de protéines sont impliquées. Il y a trois groupes importants d'Hsps chez la levure qui sont décrites selon leurs tailles : Hsp104p, Hsp70p et son co-chaperon Hsp40p. Le rôle des Hsps consiste à protéger l'ensemble des protéines cellulaires en assistant leur renaturation ou bien en les dirigeant vers la voie de dégradation pour empêcher leur agrégation qui nuirait à la viabilité de la cellule. Ainsi, la réponse des protéines de choc thermique peut être considérée comme un mécanisme universel de défense contre toute forme d'agrégation toxique des protéines en réponse à ces stress.

III.5.2.1 Hsp104p : un facteur de tolérance aux stress

Le chaperon de protéines Hsp104p appartient à la famille des Hsp100/ClpB (Caseinolytic peptidase protein), sous-famille de la superfamille des AAA+ ATPase (ATPase associated with various cellular activities). Il n'y a pas d'homologue d'Hsp104p chez les vertébrés. Hsp104p est active sous forme d'homo-hexamères et possède dans sa structure 2 domaines de liaison aux nucléotides nommés NBD1 et NBD2 (Nucleotide binding domain) qui ont des caractéristiques différentes : le second domaine AAA+ ATPase (NBD2) est spécifiquement impliqué dans l'hexamérisation des molécules Hsp104p, tandis que la reconnaissance du substrat nécessite la liaison d'ATP au niveau du NBD1. L'absence d'oligomérisation dépendante de NBD2 n'empêche pas la reconnaissance du substrat et la fixation initiale par NBD1 (Parsell, Kowal et al. 1994 ; Hattendorf and Lindquist 2002; Schwimmer and Masison 2002) (figure 18).

Chez la levure, le mécanisme d'action d'Hsp104p pour re-solubiliser les protéines agrégées est dépendant de l'ATP. La protéine serait extraite de l'agrégat par dépliement par le passage à travers le canal central de l'hexamère. Ce mécanisme a besoin de l'assistance du complexe Hsp70p/Hsp40 qui va à la fois rendre les agrégats plus accessibles aux hexamères d'Hsp104p et participer au repliement des

polypeptides sortis du canal central. Les chaperons Hsp70p et Hsp40p sont capables de solubiliser les petits agrégats en absence d'Hsp104p (Glover, Kowal et al. 1997).

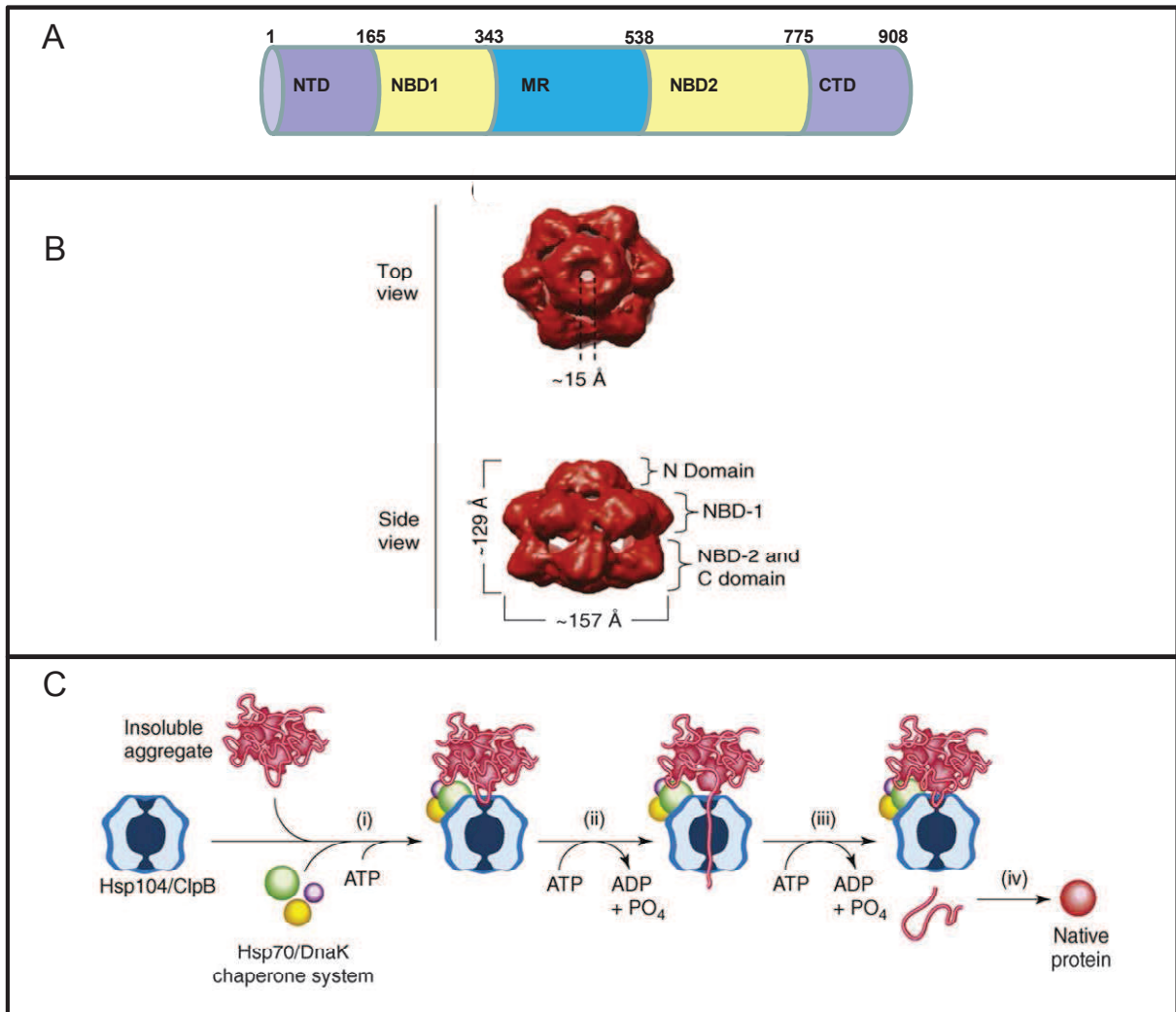


Figure 18. Structure d'Hsp104p et mécanisme de désagrégase des chaperons (d'après Doyle and Wickner 2009).

- (A) La protéine Hsp104. NTD : N-terminal domain ; NBD1 et NBD2 : Nucleotide binding domains ; MR : Middle region ; CTD : C-terminal peptide-binding domain.
- (B) Hsp104p est active sous forme hexamérique et forme un canal central d'environ 15 Å permettant le passage des protéines lors de leur désagrégation (reconstruction d'Hsp104p de *S. cerevisiae* selon la technique de cryo-EM).
- (C) Modèle de la désagrégation des protéines agrégées par Hsp104p en collaboration avec les chaperons Hsp70p/40p (DnaK : Hsp70 chez *E. coli*). L'hexamère d'Hsp104p permet de re-solubiliser des protéines agrégées en les faisant passer dans le canal central. Ce processus nécessite l'hydrolyse d'ATP. Ce mécanisme est réalisé en collaboration avec des Hsp70p et Hsp40p qui d'une part apportent les agrégats protéiques à Hsp104p et d'autre part interagissent avec la protéine nouvellement dépliée pour l'aider à se replier correctement.

Hsp104 : un facteur essentiel à la propagation des prions de levure

Le chaperon de protéines Hsp104p est indispensable pour la formation et la propagation de l'ensemble des prions connus de levure (Chernoff, Lindquist et al. 1995; Moriyama, Edskes et al. 2000), à l'exception du prion [*ISP+*] (Rogoza, Goginashvili et al. 2010) (tableau 6), en désagrégeant partiellement les agrégats en plus petits fragments. Cette fragmentation permet de former des germes infectieux ou propagons et donc de nouvelles extrémités libres pour la conversion des isoformes cellulaires. Les germes infectieux seraient transmis aux cellules filles, permettant aussi la propagation de la conformation prion au cours des générations (Ter-Avanesyan and Kushnirov 1999). L'activité désagrégase d'Hsp104p joue ainsi un rôle primordial dans la stabilité du prion. Ainsi, tout changement de l'activité ATPase d'Hsp104p (surexpression ou inhibition) perturbe la stabilité du prion (figure 19). L'interaction directe entre Hsp104p et la protéine prion Sup35p a également été mise en évidence (Helsen and Glover 2012)

- La surexpression d'Hsp104p cure le prion [*PSI+*] mais pas [*URE3*] (figure 19B). Hsp104p élimine le prion [*PSI+*] par dissolution du prion en monomère (Paushkin, Kushnirov et al. 1996; Kochneva-Pervukhova, Paushkin et al. 1998). Des travaux récents montrent qu'Hsp104p n'est pas le seul acteur de cette cure. Pour que sa surproduction élimine efficacement le prion [*PSI+*], la présence de certains chaperons et co-chaperons est indispensable. La présence d'Hsp70p n'est pas indispensable pour cette cure mais en augmente l'efficacité. Par contre Hsp90 ainsi que ses co-chaperons Sti1p et Crp7p sont indispensables, l'absence l'un de ces acteurs inhibe la cure du prion [*PSI+*] par la surproduction d'Hsp104p (Reidy and Masison 2012; Moosavi, Wongwigkarn et al. 2010).
- La délétion d'*HSP104* cure les prions [*PSI+*] et [*URE3*], ainsi que tous les prions naturels de levure (figure 19C). En absence d'Hsp104p, les agrégats ne seraient plus fragmentés en des germes infectieux, ils seraient perdus au cours des divisions cellulaires par dilution (Chernoff,

Lindquist et al. 1995). Le même résultat est obtenu avec le chlorure de Guanidium (GuHCl), un inhibiteur de l'activité ATPase d'Hsp104p (Eaglestone, Ruddock et al. 2000; Ferreira, Ness et al. 2001).

Le cas particulier du chlorure de Guanidium (GuHCl)

Le chlorure de Guanidium (GuHCl) est une molécule efficace contre les prions de levure. Ainsi, 1 à 5 mM de GuHCl permettent d'éliminer complètement les prions (Wickner 1994; Chernoff, Lindquist et al. 1995). Il s'agit d'un inhibiteur de l'activité ATPase de la protéine chaperon Hsp104p. En inhibant l'activité ATPase d'Hsp104p, le GuHCl bloque la formation ou réplication de nouveaux propagons sans détruire les propagons préexistants (Eaglestone, Ruddock et al. 2000). Les propagons préexistants se diluent donc au cours des divisions cellulaires jusqu'au moment où certaines cellules n'héritent plus de propagons (Byrne, Cox et al. 2007). Ainsi, le phénotype prion disparaît après 5 à 6 générations (figure 19C). L'inhibition d'Hsp104p par le GuHCl a donc le même effet que la délétion du gène *HSP104*.

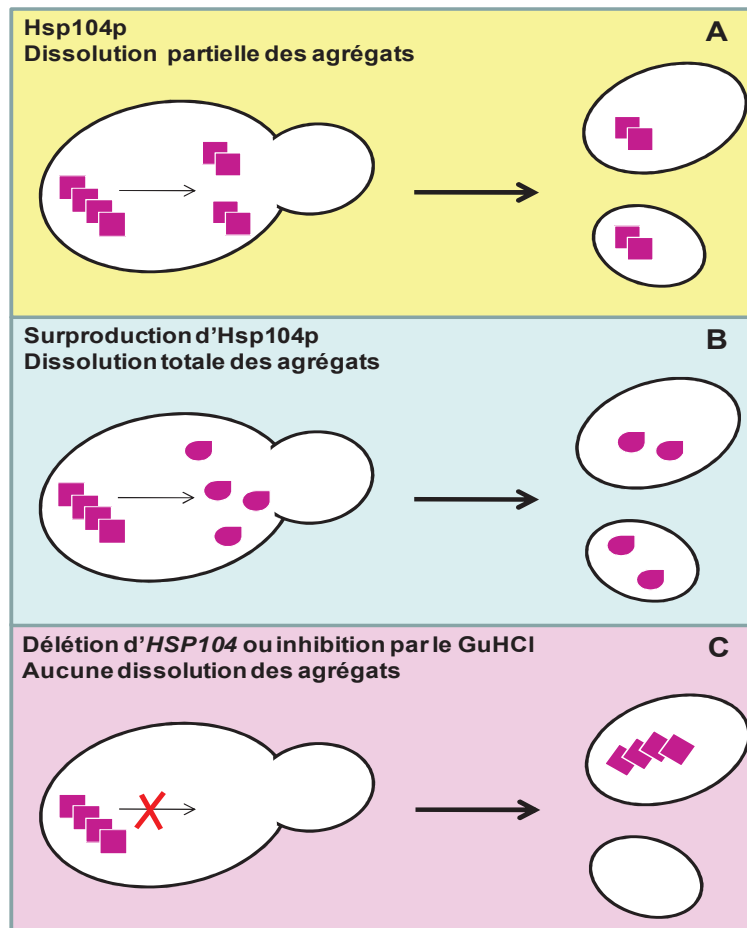


Figure 19. Implication de Hsp104p dans la propagation des prions de levure.

- (A) Une expression normale de Hsp104p permet la dissolution partielle des agrégats et donc leur propagation de la cellule mère à la cellule fille (Chernoff, Lindquist et al, 1995 ; Moriyama et al, 2000).
- (B) La surproduction d'Hsp104p provoque une dissolution totale des agrégats, par conséquent il n'y aurait plus de germe infectieux transmis aux cellules filles, ce qui se traduit par la cure du prion (Paushkin et al, 1996 ; Ter-Avanesyan, 1998).
- (C) La délétion d'*HSP104* ou l'inhibition d'Hsp104p par le GuHCl empêchent la dissolution des agrégats. Aucun germe infectieux n'est formé et les agrégats seraient perdus par la dilution au cours des générations, conduisant à la cure du prion (Wickner 1994 ; Chernoff et al. 1995).

III.5.2.2 Rôle des autres chaperons de protéines

Dans les mécanismes de désagrégation, Hsp104p n'agit pas seule mais plutôt en collaboration avec d'autres chaperons de protéines. Ainsi, les chaperons Hsp70p et co-chaperons Hsp40p sont également impliqués dans la propagation des prions chez la levure. La levure contient 2 sous-familles cytoplasmiques d'Hsp70p : la sous-famille Ssa qui fonctionne avec les co-chaperons Hsp40 (Ydj1 et Sis1) et la sous-famille Ssb qui fonctionne avec Hsp40-Zuo1. La famille génique SSA est formée de quatre gènes homologues : SSA2 est exprimé constitutivement ; SSA3 et SSA4 sont

strictement inductibles par le stress et *SSA1* est modérément exprimé et également inductible par le stress. La famille *SSB* contient deux gènes non essentiels *SSB1* et *SSB2* dont les protéines qui en sont issues *Ssb1* et *Ssb2* s'associent au ribosome et participent au repliement des chaînes polypeptidiques néo-synthétisées. Ces deux sous-familles modulent la formation et la stabilité de la propagation du prion mais de façon opposée. La surexpression des protéines *Ssa* protège le prion [*PSI*+] de la cure causée par la surexpression d'*Hsp104p*, alors que la surexpression des protéines *Ssb* l'aggrave (Allen, Wegrzyn et al. 2005). La délétion de *SSB* inhibe la cure du prion. Tous les membres de la famille *Ssa* agissent dans une même direction lorsqu'ils sont simultanément surexprimés (Allen, Wegrzyn et al. 2005). Mais des résultats différents ont été obtenus lorsque chaque protéine *Ssa* est individuellement exprimée dans une souche délétée du gène *SSA* (Sharma and Masison 2008). Par exemple, la surproduction de *Ssa1p*, et pas de *Ssa2p*, cure le prion [*URE3*] (Schwimmer and Masison 2002). Le changement d'un seul acide aminé à la position 83 est responsable de cette différence (Sharma and Masison 2011). De même, la délétion de *SSA2*, et pas de *SSA1*, cure le prion [*URE3*] (Newnam, Birchmore et al. 2011).

Les *Hsp40p* sont des co-chaperons d'*Hsp70p*. Ils sont également impliqués dans les mécanismes de propagation du prion chez la levure (tableau 7). Des études montrent que *Sis1*, le co-chaperon *Hsp40*, est essentiel (Rikhvanov, Romanova et al. 2007), et est impliqué dans le maintien de [*URE3*] (Higurashi, Hines et al. 2008) et de [*PIN*+] (Sondheimer, Lopez et al. 2001). *Sis1p* favorise également la cure du prion [*PSI*+] par la surexpression d'*Hsp104p* (Kirkland, Reidy et al.). *Hsp104p* et *Sis1p* se fixent sur les agrégats ce qui permet leur dissolution partielle en petits fragments. L'expression des autres *Hsp40p* influence également la cure du prion : la surexpression et la délétion du gène codant *Ydj1p* amplifient certains effets causés par le chaperon *Ssa1p* sur le prion [*PSI*+] (Kushnirov, Kryndushkin et al. 2000; Jones and Masison 2003; Sondheimer, Lopez et al. 2001). La délétion des gènes codant les co-chaperons *Sti1p* et *Cpr7p* d'*Hsp70/90* inhibe l'effet curatif de la surproduction d'*Hsp104p* sur le prion [*PSI*+] (Moosavi, Wongwigkarn et al. 2010; Reidy and Masison 2012).

L'ensemble de ces données montre l'importance de l'action conjointe des chaperons de protéines sur l'apparition, le maintien et la propagation du prion. Une machinerie complexe composée de nombreux chaperons de protéines joue un rôle crucial autour d'Hsp104p pour la propagation des prions. En fonction du contexte cellulaire et de la balance de l'ensemble de ces acteurs, l'information du prion sera maintenue ou éliminée au cours des divisions cellulaires.

III.5.2.3 Btn2p et Cur1p

Les protéines Btn2p et Cur1p sont impliquées dans les mécanismes de propagation du prion [URE3] (Kryndushkin, Shewmaker et al. 2008). Dans les cellules délétées pour *BNT2* ou *CUR1*, on observe une augmentation significative de la proportion « *strong* » du phénotype [URE3] ce qui suggère que Btn2p et Cur1p pourraient limiter la propagation du prion [URE3] (Kryndushkin, Shewmaker et al. 2008). Leur surexpression cure le prion [URE3] mais n'a pas d'effet sur [*PS*/+], peut-être du fait du nombre de propagon plus important pour le prion [*PS*/+] que pour le prion [URE3]. Bien que la surexpression de Btn2p ne cure pas le prion [*PS*/+], une co-localisation entre Btn2p et les agrégats prion de Sup35p est observée. De plus, Btn2p colocalise avec des agrégats de polyglutamines. Btn2p aurait donc une affinité pour les amyloïdes et semble les regrouper à un même endroit dans le cytoplasme.

Tableau 7. Les effets des chaperons et co-chaperons de protéines sur les mécanismes de propagation des prions de levure (d'après Liebman and Chernoff 2012).

Chaperons		Effets sur [PSH+]		Effets sur autres prions	
Famille	Protéine/sous-famille	Excès	Délétion ou inactivation	Excès	Délétion ou inactivation
Hsp100	Hsp104 ^a	Cure	Cure	Pas d' effet	Cure tous les prions sauf [SP+]
Hsp70	Ssa (1-4) ^b	Déstabilise Protège de la surexpression d' Hsp104	Déstabilise	Cure [URE3] (ssa1)	Cure [URE3] (ssa2)
	Ssb (1,2) ^c	Aide à la surexpression d' Hsp104p Déstabilise	Protège de la surexpression d' Hsp104p	ND	ND
Hsp40	Sis1 ^d	Favorise la cure par surexpression d' Hsp104p	Inhibe la cure par surexpression d' Hsp104p	ND	Cure [PIN+]
	Ydj1 ^f	ND	Pas d' effet	Cure [URE3] ^e	Cure [SW+]
	Apj1 ^g	ND	ND	Compensation pour Ydj1	ND
Hsp90	Hsp82 ^h	Pas d' effet	Protège de la surexpression d' Hsp104p	ND	ND
NEF pour Hsp70p	Sse1 ⁱ	ND	Cure	Cure [URE3]	Cure [URE3], [SW+]
	Fes1 ⁱ	ND	Cure	Cure [URE3]	ND
Co-chaperon de 70/90	Sti1 et Cpr7 ^j	ND	Protège de la surexpression d' Hsp104p	ND	ND

- a. Chernoff et al. 1995 ; Derkatch et al. 1997 ; Moriyama et al. 2000 ; Du et al. 2008 ; Alberti et al. 2009 ; Patel et al. 2009 ; Rogoza et al. 2010.
- b. Newnam et al. 1999, 2011 ; Jung et al. 2000 ; Schwimmer and Masison. 2002 ; Roberts et al. 2004 ; Allen et al. 2005 ; Sharma and Masison, 2008, 2011 ; Mathur et al. 2009.
- c. Chernoff et al. 1999 ; Kushnirov et al. 2000b ; Chacinska et al, 2001 ; Allen et al, 2005.
- d. Moriyama et al, 2000 ; Bradley et al, 2002 ; Sharma et al, 2009 ; Hines et al, 2011.
- e. Overexpression of J-domain from Sis1, Ydj1 or Apj1 antagonizes [SW+].
- f. Sondheimer et al. 2011, Higurashi et al. 2008 ; Hines et al. 2011 ; Kirland et al. 2011.
- g. Hines et al. 2011.
- h. Newnam et al. 1999; Reidy and Masison. 2011.
- i. Jones et al. 2007; Krydushkin and Wickner 2007; Sadlish et al. 2008; Hines et al. 2011.
- j. Moosavi et al, 2010; Reidy and Masison, 2011.
- (ND non déterminé)

III.6 La prionisation, un moyen de contrôle épigénétique d'un gène qui peut être bénéfique

La définition originale du prion pour les cellules provient de l'agent pathogène PrP^{Sc} responsable des maladies à prions chez les mammifères. Il est clair à présent que cette définition est élargie à toute protéine dont une variante de conformation stable catalyse sa propre formation à partir de la protéine non variante. Les prions de levure peuvent avoir des effets bénéfiques en agissant comme des interrupteurs moléculaires dans des voies cellulaires. Le mécanisme de prionisation pourrait être un mécanisme très général de régulation épigénétique transmissible aux cellules filles, comme la méthylation de l'ADN (Uptain and Lindquist 2002; Wickner, Edskes et al. 2002). Les prions peuvent se manifester par un phénotype de perte de fonction, de gain de fonction ou bien les deux. Le fait que le domaine prion soit extrêmement conservé au cours de l'évolution conduit à se poser la question de l'effet bénéfique des prions. Sous sa forme prion, HET-s est impliquée dans l'incompatibilité entre souches différentes. C'est la forme prion qui est active et qui correspond donc à un gain de fonction (Coustou, Deleu et al. 1997). [URE3] résulte en une activation de la protéine et se manifeste par une altération de la préférence de l'assimilation des sources riches en azote (Wickner 1994). Le prion [PSI+] réduit la fidélité de la terminaison de traduction, ceci peut être considéré comme une perte de fonction d'un facteur de terminaison de la traduction mais également un gain de fonction en augmentant potentiellement la taille de toutes les protéines (Eaglestone, Cox et al. 1999; True and Lindquist 2000; Shorter and Lindquist 2005; Tuite 2013).

Des études ont montré que les prions pouvaient faciliter la survie des cellules qui les contiennent (Suzuki, Shimazu et al. 2012). Ils permettraient une adaptation rapide à un environnement hostile et pourraient être transmis à la génération suivante, sans changement dans l'ADN ou dans la régulation génétique, l'effet bénéfique pourrait ensuite être fixé par des mutations. Mick Tuite et collaborateurs ont montré que suivant l'exposition aux chocs thermiques ou à l'éthanol, des souches [PSI+] survivaient mieux que des souches isogéniques [psi-]. De même, une étude menée par le groupe de Susan Lindquist a montré que les souches [PSI+] s'adaptent plus facilement que les souches [psi-] sur des milieux contenant des sources de carbone,

d'azote, de métaux, des inhibiteurs de différents processus cellulaires et à différentes températures (True and Lindquist 2000). Les travaux de ce même groupe montrent que le phénotype [*PS*/+] est présent dans des souches naturelles (10 pour 690 souches) (Halfmann, Jarosz et al. 2012). Une nouvelle protéine prion de levure a récemment été identifiée, il s'agit de la protéine Mod5 dont le phénotype prion [*MOD5*] améliore la gestion des conditions de stress et aide la levure en lui accordant une résistance cellulaire aux fongicides (Suzuki, Shimazu et al. 2012).

III.7 Utilisation du modèle levure pour identifier des composés antiprion

Dans le but d'identifier des molécules actives contre les prions de mammifères, des cribles ont été effectués. Un premier crible relativement lourd a été réalisé *in vitro* sur le prion de mammifère PrP^{Sc} à partir des cellules mammifères (Korth, May et al. 2001). Deux molécules ont été identifiées au cours de ce crible : la Quinacrine, qui est un agent anti-malaria, et la Chlorpromazine, qui est un anti-dépresseur. Cependant, ces molécules ne sont pas actives *in vivo* tant dans un modèle murin que dans des essais compassionnels chez des patients (Collins, Lewis et al. 2002).

Afin d'identifier de manière plus efficace de molécules antiprion, notre laboratoire a mis en place une stratégie de criblage « moyen-débit » rapide, basée sur les prions de levure, qui permet d'identifier des composés capables de curer les prions [*PS*/+] et [*URE3*]. Ces molécules sont ensuite testées contre le prion mammifère PrP^{Sc} dans des tests cellulaires puis *in vivo* dans un modèle murin de maladies à prion. L'hypothèse initiale était que les mécanismes contrôlant l'apparition et/ou le maintien des prions pourraient être conservés de la levure à l'homme. La grande facilité d'emploi, le faible coût et l'innocuité de la levure ont été mis à profit pour réaliser du criblage moyen-débit. Cette stratégie se compose de 3 étapes (Voisset, Saupe et al. 2009) : (1) Un criblage *in vivo* en levure afin d'identifier des molécules ayant une activité contre les prions de levure [*PS*/+] puis [*URE3*], (2) ces molécules actives sont ensuite testées contre PrP^{Sc} dans un système mammifère *ex vivo*. (3) Les molécules

les plus prometteuses sont finalement testées *in vivo* dans un modèle murin de maladie à prion (Bach, Talarek et al. 2003; Bach, Tribouillard et al. 2006).

(1) Le criblage *in vivo* en levure permet de tester un grand nombre de molécules en peu de temps, ce qui fait un premier tri et permet ainsi de tester moins de molécules dans les systèmes *ex vivo* et *in vivo* qui sont beaucoup plus fastidieux et onéreux à mettre en œuvre. Basée sur le système rapporteur colorimétrique blanc-rouge, la levure est un modèle efficace dans la recherche de molécules ayant une activité contre les prions de levure. Dans le crible primaire, les molécules de différentes chimiothèques sont testées pour leur activité antiprion contre le prion [PSI+], puis les molécules positives contre [PSI+] sont ensuite testées contre le prion [URE3]. Une molécule active contre les prions de levure [PSI+] et [URE3] est capable de convertir les colonies blanches [PRION+] en colonies rouges [*prion*-]. L'ajout directement dans le milieu de culture d'une quantité sub-optimale de GuHCl permet d'augmenter considérablement la sensibilité du test de criblage (Bach, Talarek et al. 2003). Etant donné la grande divergence tant de séquences primaires que de fonctions biochimiques des protéines Sup35p et Ure2p responsables de l'apparition de ces deux prions, des molécules actives à la fois contre les prions [PSI+] et [URE3] sont supposées agir sur les mécanismes généraux de prionisation chez la levure et non sur des mécanismes spécifiques de l'un ou de l'autre de ces prions.

(2) Les molécules actives contre les deux prions de levure [PSI+] et [URE3] sont ensuite testées *ex vivo* contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire. Des cellules neurogliales MovS6 provenant de ganglions de la racine dorsale de souris transgéniques dont le gène *PRNP* murin a été remplacé par le gène *PRNP* ovin (tgOv) sont utilisées. Cette lignée cellulaire a été stablement infectée par des isolats naturels de prion ovin (Archer, Bachelin et al. 2004). Le test *ex vivo* est basé sur la propriété de résistance de PrP^{Sc} à la protéinase K. Les molécules à tester et le DMSO (le contrôle négatif) sont incubées avec les cellules MovS6. Après 6 jours,

les extraits protéiques de cellules MovS6 sont traités par la protéinase K. Seule la protéine PrP sous sa conformation prion PrP^{Sc} résiste partiellement à cette digestion enzymatique. Une molécule est considérée active contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo* quand elle réduit la quantité de PrP^{Sc} par rapport au contrôle DMSO. A cette étape, nous identifions des molécules actives contre les prions de levure [PS/+] et [URE3] qui sont capables d'éliminer la PrP^{Sc} *ex vivo* en culture cellulaire. Il a été frappant de constater que la plupart des molécules actives contre les prions de levure [PS/+] et [URE3] se sont avérées actives contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo*, ce qui valide l'hypothèse initiale d'une conservation de la levure aux mammifères des mécanismes de prionisation.

- (3) Seules les molécules les plus prometteuses sont sélectionnées pour tester leur action *in vivo* chez des souris infectées par PrP^{Sc}, en collaboration avec Vincent Béringue (INRA Jouy en Josas). Le modèle murin utilisé correspond à des souris transgéniques permettant une propagation rapide des maladies à prion (Vilotte, Soulier et al. 2001). Ces souris transgéniques expriment la protéine PrP^{VRG} ovine à un taux relativement élevé dans un contexte génétique déficient en PrP endogène (souris tgOv). Suite à l'inoculation du prion ovine par injection intrapéritonéale, les souris tgOV développent des symptômes neurologiques associés à une encéphalopathie spongiforme et accumulent une forme PrP^{res} dans la rate et dans le cerveau. En absence de traitement, le temps de survie des souris tgOv est d'environ 90 jours post-inoculation avec une phase clinique de moins d'une semaine, contre un an lorsque les souris ne sont pas transgéniques (Collinge, Palmer et al. 1995; Telling, Scott et al. 1995).
- (4) Une autre méthode permet d'évaluer l'activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} de molécules plus rapide que le test *in vivo* chez des souris infectées par le prion. Il s'agit d'un test en culture organotypique (en collaboration avec Vincent Béringue et Sophie Halliez, INRA Jouy en Josas). Des tranches de cerveau de souris (TgOv) sont mises en culture

in vitro pendant une semaine puis infectées par le prion. Une semaine après l'infection, les cultures organotypiques sont traitées par les molécules à tester. La révélation de la quantité de PrP^{Sc} après 2 semaines de traitement indique l'activité antiprion de ces molécules (Falsig, Sonati et al. 2011).

Cette méthode de criblage nous a permis d'identifier plusieurs composés ayant une activité à la fois contre les prions de levure et de mammifères, parmi lesquels, la 6-aminophenanthridine (6AP) et le Guanabenz (GA). Ce résultat constitue la première indication fonctionnelle d'une conservation des mécanismes de propagation des prions de la levure à l'homme (Bach, Talarek et al. 2003; Tribouillard-Tanvier et al. 2008).

III.8 Mise en évidence de l'activité antiprion de la 6AP et du GA

III.8.1 La 6AP et le GA sont actifs contre les prions de levure et de mammifère

La 6-aminophenanthridine (6AP) est un dérivé de la phenanthridine, composé commercialisé comme base de synthèse de nombreuses molécules polycycliques, et issue du criblage de la chimiothèque constituée par Laurent Meijer à la station biologique de Roscoff (Bach, Talarek et al. 2003). L'activité de la phenanthridine a été optimisée par une approche structure/activité (RSA) qui a conduit à la 6AP (en collaboration avec l'équipe d'Hervé Galons, Université René Descartes, Paris V). Le Guanabenz (GA) est un composé utilisé en clinique pour le traitement de l'hypertension (Holmes, Brogden et al. 1983). Il est issu du criblage de la chimiothèque Prestwick (Tribouillard-Tanvier, Beringue et al. 2008) qui a été construite selon l'approche SOSA (Selective Optimization of Side Activities of drug molecules) (Wermuth 2004). Cette approche permet une optimisation sélective des activités secondaires des molécules médicaments. Seul un nombre limité de molécules médicaments très diverses est examiné, pour lesquelles les études de biodisponibilité et de toxicité ont déjà été réalisées. Il y a deux cas de figure possibles : (i) une activité antiprion suffisante de ces médicaments conduit à un

repositionnement thérapeutique, (ii) sinon, les études RSA permettent d'améliorer leur activité antiprion et aussi de découpler cette dernière de l'activité thérapeutique originale de la molécule.

Comme le montre la figure 20, la 6AP et le GA sont actifs contre les prions de levure [*PSI*⁺] et [*URE3*]. Ils sont capables de convertir la souche [*PRION*⁺] blanche en [*prion*⁻] rouge. De plus, ils sont actifs contre la PrP^{Sc} *ex vivo* et *in vivo* en diminuant la quantité de PrP^{Sc} dans les cellules MovS6 en culture cellulaire ou retrouvée dans la rate de souris infectées par la PrP^{Sc}. Les dérivés inactifs 6APi et GAi dont les structures sont très proches de celles de la 6AP et du GA, ont été synthétisés lors d'études structure-activité (en collaborations avec Hervé Galons). La 6APi correspond à la 6AP sur laquelle un groupe 2-(butan-1-ol) a été ajouté en position 6. Le GAi correspond à la molécule GA sur laquelle un des deux chlores a été remplacé par un fluor. Du fait que la 6APi et le GAi sont inactifs contre les prions de levure et de mammifère, ils ont été utilisés comme contrôles négatifs pour les expériences utilisant la 6AP et le GA.

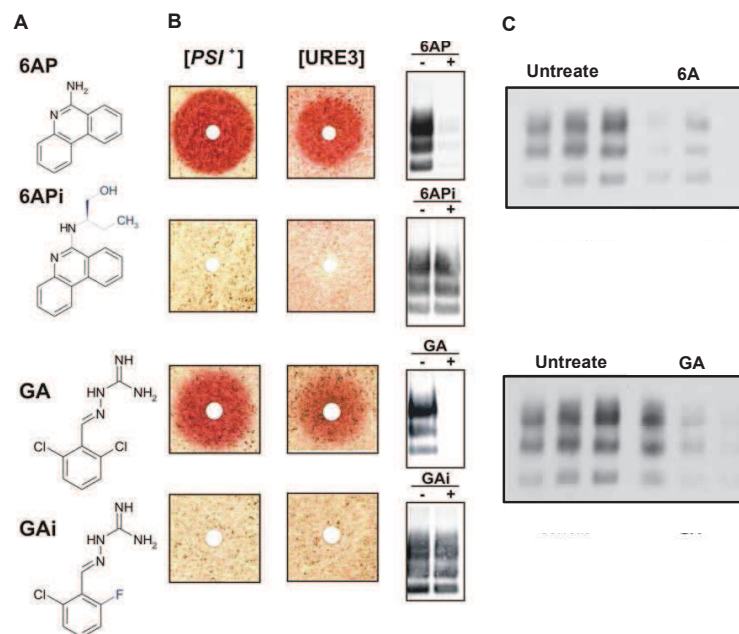


Figure 20. Activité contre les prions de levure et de mammifère de la 6AP et du GA (d'après Tribouillard-Tanvier, Beringue et al. 2008).

(A) Les composés 6AP et GA sont actifs contre les prions de levure [*PSI*⁺] et [*URE3*]. Ils sont également capables de réduire la quantité de PrP^{Sc} dans les cellules MovS6 *ex vivo* (B) et *in vivo* dans un modèle de murin de la maladie à prion (C). Les composés 6APi et GAi, deux dérivés proches de la 6AP et du GA, sont inactifs tant contre les prions de levures que contre le prion de mammifère PrP^{Sc}.

III.8.2 Identification des cibles cellulaires de la 6AP et du GA

Dans le but d'identifier les cibles cellulaires de la 6AP et du GA, une approche biochimique basée sur la méthode de chromatographie d'affinité sur drogues immobilisées a été développée (Guiffant, Tribouillard et al. 2007). Dans cette méthode, les drogues antiprion 6AP et GA ont été couplées à des billes de Sépharose via un bras amino caproylaminopentyloxy (figure 21A). L'activité antiprion des molécules greffées (composé + bras) a parallèlement été testée contre les prions de levure [*PSI*⁺] et [*URE3*] afin de s'assurer que le bras n'affecte pas leur activité antiprion. La 6AP et le GA greffés à des billes de sépharose ont ensuite été utilisés comme des « hameçons » qui permettent de « pêcher » leurs cibles cellulaires.

Les matrices d'affinité ont été mises en contact avec des lysats cellulaires de différents organismes (levure, souris, porc). Après des lavages intensifs et séparation sur SDS-PAGE, les analyses de spectrométrie de masse ont révélé que la plupart des protéines interagissant spécifiquement avec les matrices d'affinité sont des protéines ribosomales ou associées aux ribosomes. Ces résultats ont indépendamment été obtenus avec la 6AP et le GA (figure 21B) et suggèrent que le ribosome pourrait être la cible de la 6AP et du GA. Afin de déterminer si ces molécules se liaient sur les composants protéiques ou ARNr du ribosome, les lysats ont été traités par de la RNase A. Comme le montre la figure 21B, la digestion par la RNase A supprime toute liaison des ribosomes aux matrices d'affinité de la 6AP et du GA. Nous pouvons donc dire que la liaison du ribosome à la 6AP et au GA est ARNr-dépendante.

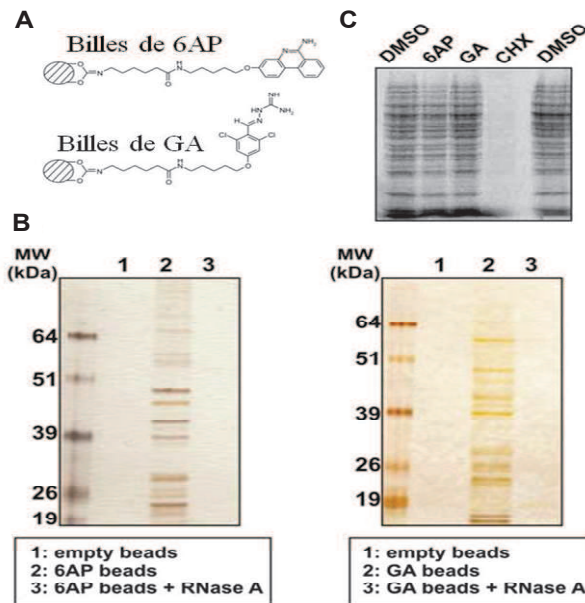


Figure 21. Caractérisation des cibles cellulaires de la 6AP et du GA par chromatographie d'affinité (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008).

- (A) Structures des matrices de chromatographie d'affinité : la 6AP et le GA sont greffés de façon covalente à des billes de Sépharose par un bras amino caproylamino-pentyloxy.
- (B) La liaison entre le ribosome et la 6AP ou le GA est ARNr-dépendante. La piste 1 contient les lysats cellulaires avec des billes non greffées, la piste 2 contient les lysats cellulaires et les billes greffées avec les drogues, la piste 3 correspond à des billes greffées avec les lysats préalablement traités par la RNase A.
- (C) La 6AP et le GA n'affectent pas l'activité de synthèse du ribosome *in vivo* chez la levure. La cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction, a été utilisée comme contrôle positif.

III.8.3 Le ribosome est la cible des molécules antiprion 6AP et GA

III.8.3.1 Le ribosome : structure et fonctions

La biosynthèse des protéines, assurée par le ribosome, est un mécanisme vital permettant de traduire l'information du code génétique de tout organisme vivant en séquences peptidiques. Le ribosome des eucaryotes est formé de deux sous-unités : une grande sous-unité de 60S (S pour Svedberg correspond à un coefficient de sédimentation) et une petite sous-unité 40S. Chaque sous-unité est formée de protéines et de différents ARN ribosomiaux (ARNr) (tableau 8). La grande sous-unité contient l'ARNr 28S (25S chez les levures, 23S chez les procaryotes) et les l'ARNr 5.8S et 5S. La petite sous-unité ne contient que l'ARNr 18S. Les ARNr 18S, 5.8S et 28S sont synthétisés dans le nucléole sous forme d'un précurseur de taille supérieure, l'ARN 45S. Les ARNr 5S sont synthétisés dans le nucléoplasme, tandis

que les protéines ribosomales sont synthétisées dans le cytoplasme et importées dans le noyau. Une fois présents dans le noyau, les différents composants sont associés pour former les deux sous-unités du ribosome. Les deux sous-unités sont séparément exportées du noyau vers le cytoplasme où elles s'associent sur l'ARNm pour former le ribosome entier essentiel à la traduction (figure 22).

Les ribosomes de procaryote ont un coefficient de sédimentation de 70S, ce qui provient de l'association d'une sous-unité 50S avec une sous-unité 30S sur l'ARNm lors de la traduction. Ils sont également composés d'ARNr mais plus petites et de moins de protéines que chez les eucaryotes (tableau 8).

Tableau 8. Taille des sous-unités et des ARNr des ribosomes d'origine procaryote ou eucaryote (levures, mammifères).

* 2 protéines sont présentes en double exemplaire.

** L pour *large* (grande sous-unité) et S pour *small* (petite sous-unité).

	Procaryotes (70S)		Levure (80S)		Mammifères (80S)	
	Petit sous-unité	Grande sous-unité	Petit sous-unité	Grande sous-unité	Petit sous-unité	Grande sous-unité
Densité	30S	50S	40S	60S	40S	60S
ARNr	16S	23S 5S	18S	25S 5S 5.8S	18S	28S 5S 5.8S
Protéines	21 protéines De S1 à S21**	31 protéines De L1 à L34*	33 protéines De S1 à S33	49 protéines De L1 à L49	33 protéines De S1 à S33	49 protéines De L1 à L49

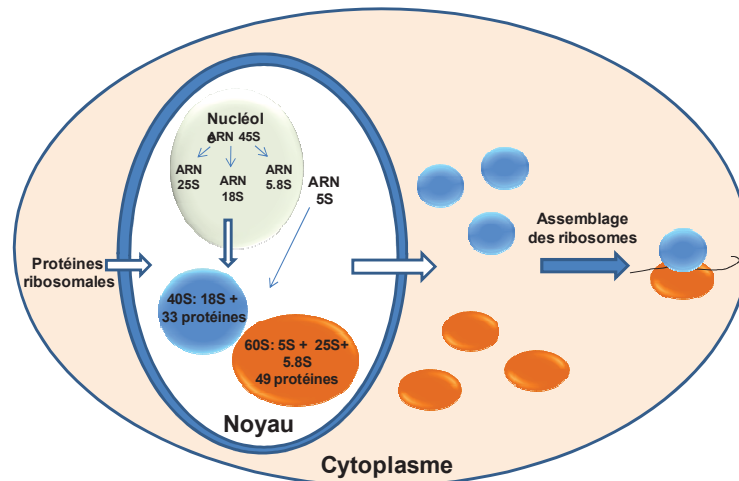


Figure 22. Biosynthèse des ribosomes chez la levure.

L'ARN précurseur 45S est synthétisé dans le nucléole alors que l'ARN 5S est extra-nucléolaire. L'ARN 45S est clivé pour donner les ARNr 25S, 18S et 5.8S. Les protéines ribosomales sont importées du cytoplasme vers le noyau où a lieu l'assemblage des sous-unités du ribosome. Les grandes et petites sous-unités sont exportées dans le cytoplasme et s'associent lors de la traduction des ARNm en chaînes polypeptiques.

(i) L'activité traductionnelle du ribosome

Le ribosome est un ribozyme car c'est l'ARNr 28S (23S chez les procaryotes et 25S chez la levure) qui porte l'activité peptidyl-transférase indispensable pour synthétiser les séquences peptidiques.

L'effet de la 6AP et du GA sur l'activité traductionnelle du ribosome a été évaluée par différentes méthodes *in vitro* et *in vivo*. Aucune de ces deux molécules antiprion n'inhibe l'activité de synthèse protéique du ribosome (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008) (figure 21C).

(ii) L'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR)

En plus de son rôle central dans la synthèse protéique, le ribosome possède aussi la capacité d'assister le repliement des protéines. Cette seconde fonction du ribosome est nommée PFAR (Protein Folding Activity of the Ribosome). Cette activité chaperon de protéines portée par le ribosome qui a essentiellement été montrée *in vitro* et semble être un mécanisme général agissant sur un large panel de protéines substrats et conservé à travers le vivant (Bera, Das et al. 1994 ; Chattopadhyay, Das

et al. 1994 ; Das, Chattopadhyay et al. 1996; Ghosh, Basu et al. 2003). L'activité chaperon de protéines du ribosome est localisée au niveau du domaine V de l'ARNr 25S/28S de la grande sous-unité 60S du ribosome, comme le PTC (Peptidyl Transferase Center) qui porte l'activité traductionnelle (Kudlicki, Mouat et al. 1994; Kudlicki, Coffman et al. 1997). En effet, des expériences *in vitro* ont montré que les ribosomes purifiés à partir de différents organismes procaryotes et eucaryotes ou de mitochondries augmentent le taux de repliement d'un grand nombre de protéines préalablement dénaturées par le GuHCl et leur permettent de retrouver une conformation active (Basu, Samanta et al. 2008). En utilisant la technique d'extension d'amorce par réverse transcription, D. Samanta et ses collègues ont identifié les nucléotides du domaine V de l'ARNr 23S d'*E. coli* qui interagissent avec des protéines en cours de renaturation (préalablement dénaturées par le GuHCl). Ces nucléotides, qui se situent à proximité du PTC, et sont les mêmes pour quatre protéines testées : la bovine carbonic anhydrase, la lactate deshydrogenase , la malate deshydrogenase et le lysozyme du blanc d'œuf de poule (Samanta et al. 2008). Ces nucléotides sont impliqués dans l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) et sont encadrés en rouge dans la figure 23. Ces nucléotides sont partiellement masqués par la petite sous-unité dans un ribosome entier lors de traduction.

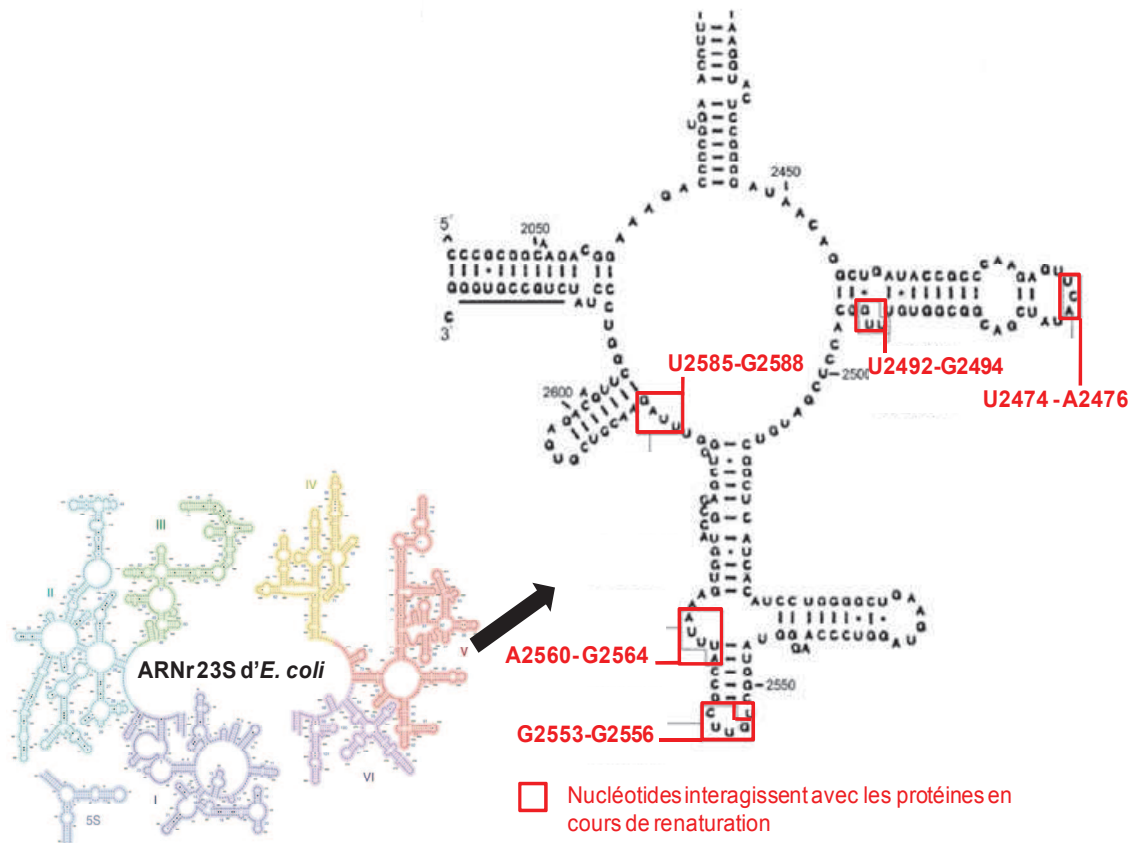


Figure 23. Cartographie des nucléotides du domaine V de l'ARNr 23S d'*E. coli* interagissant avec des protéines en cours de renaturation (d'après Samanta et al. 2008).

III.8.3.2 La 6AP et le GA ciblent spécifiquement la PFAR

L'effet de la 6AP et du GA sur l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) a été évalué *in vitro*. La 6AP et le GA inhibent la renaturation des protéines dénaturées (anhydrase carbonique humaine) par le ribosome complet d'*E. coli* (70S) et de levure (80S), ainsi que par la grande sous-unité du ribosome 50S, l'ARNr 23S et domaine V synthétisé *in vitro* (Tribouillard-Tanvier, Beringue et al. 2008) (figure 24). Par contre, les dérivés inactifs 6APi et GAi de la 6AP et du GA n'ont aucun effet sur la PFAR *in vitro*. Les études récentes montrent que la 6AP inhibe l'activité PFAR par compétition avec les protéines substrats (Dos Reis et al. 2011). Une cartographie des nucléotides du domaine V de l'ARNr 23S interagissant avec la 6AP a également été établie. Il est important de noter que les nucléotides interagissant avec les protéines en cours de renaturation et la molécule antiprion 6AP sont souvent très proches, voire

chevauchants (Pang, Kurella et al. 2013; Samanta, Mukhopadhyay et al. 2008) (figure 25). De plus, les mutations au niveau de ces nucléotides du domaine V de l'ARNr 23S conduisent à une perte de l'activité PFAR *in vitro* et annulent la liaison des protéines substrats et de la 6AP (Pang, Kurella et al. 2013). Les mutations des nucléotides équivalents de l'ARNr 25S de levure suppriment également l'activité PFAR *in vitro*, ce qui confirme une conservation de l'activité PFAR entre les procaryotes et eucaryotes (Pang et al. 2013). Ces nucléotides U2861-U2862, G2863, U2873-G2874, U2875-C2876, U2932, U2954-U2955 et A2956-G2957 de l'ARNr 25S de *S. cerevisiae* ont ainsi été identifiés pour leur implication dans l'activité PFAR du ribosome (figure 25).

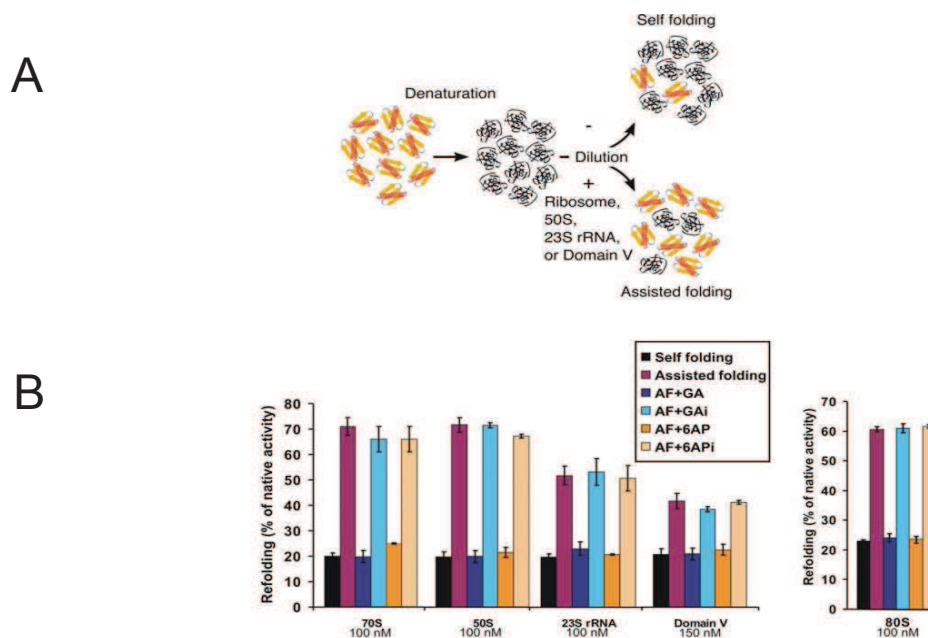


Figure 24. La 6AP et le GA inhibent l'activité chaperon de protéines du ribosome (d'après Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al, 2008).

- (A) Principe de l'essai *in vitro* permettant d'évaluer l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR). Les enzymes (anhydrase carbonique humaine, hCA) sont dénaturées par du GuHCl puis diluées dans un tampon permettant leur renaturation. La renaturation correcte des enzymes est déterminée en mesurant leur activité enzymatique. Spontanément, 20% des protéines sont capables de se renaturer pour atteindre leur conformation active (self folding). Si des ribosomes entiers, des grandes sous-unités 50S, l'ARN 23S d'*E.coli* ou le domaine V de l'ARN 23S sont ajoutés aux protéines dénaturées, le pourcentage d'enzymes capables d'atteindre une conformation active augmente jusqu'à 70% du fait de l'activité chaperon de protéines du ribosome (assisted folding).
- (B) La 6AP et le GA inhibent spécifiquement l'activité chaperon de protéines du ribosome. Des ribosomes entiers isolés d'*E.coli* (70S), de levure (80S), ou une partie de ribosome (grande sous-unité 50S, ARNr 23S, domaine V de l'ARNr 23S) ont été ajoutés aux protéines dénaturées. En présence de la 6AP et du GA, les ribosomes entiers ou les différentes parties de ribosomes portant la PFAR ne sont plus capables d'assister la renaturation de protéines hCA dénaturées, contrairement à la 6APi et au GAi qui n'ont aucun effet.

IV. Objectifs du projet de thèse

Comme nous l'avons vu, la 6AP et le GA sont actifs contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3]. Ces deux molécules sont également actives contre la PrP^{Sc} *ex vivo* en culture cellulaire et *in vivo* dans un modèle de souris infectées par le prion ovin. Parallèlement, une approche biochimique a mis en évidence le fait que la 6AP et le GA inhibent spécifiquement l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR). Ces données posent la question du lien entre PFAR et les mécanismes de maintien et/ou de propagation des prions de levure et de mammifère.

L'objectif de ma thèse était donc déterminer si l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) est bien impliquée dans les mécanismes de prionisation. Nous avons essayé d'établir les rôles de PFAR dans l'apparition et le maintien du prion et de définir la nature de son implication dans les mécanismes de prionisation. En focalisant sur l'implication de la PFAR, nous espérons acquérir de nouvelles connaissances concernant les aspects fondamentaux du contrôle cellulaire de la formation des prions, ce qui pourraient nous éclairer et conduire à des pistes thérapeutiques potentielles pour les maladies à prions.

Parallèlement, nous avons identifié de nouveaux composés actifs contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3], et contre le prion de mammifère PrP^{Sc}. Des molécules diverses issues des différentes chimiothèques académiques ou commerciales ont été criblées. Certaines chimiothèques ont été construites selon l'approche SOSA et contiennent des médicaments. Le fait de les cribler contre les prions de levure ainsi que le prion PrP^{Sc} de mammifère permet éventuellement leur repositionnement thérapeutique. En collaboration avec des chimistes (Paris, Strasbourg), les études de relations structure-activité (RSA) autour de nouvelles molécules antiprion identifiées ont été réalisées afin de synthétiser des molécules antiprion plus intéressantes. La caractérisation de nouvelles molécules antiprion est indispensable, autant pour le traitement des personnes atteintes que pour la compréhension du phénomène de prionisation.

V. Résultats

Dans la première partie de ma thèse, nous avons montré que l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) est impliquée dans les mécanismes de prionisation chez la levure. Au cours d'études antérieures à cette thèse, le laboratoire de M. Blondel a isolé la 6AP et le GA, des molécules actives tant contre les prions de levure [*PSI*⁺] et [*URE3*] que le prion de mammifère PrP^{Sc}. L'équipe a ensuite montré que la 6AP et le GA étaient des inhibiteurs compétitifs de l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) qui est portée par le domaine V de l'ARNr 25S de grande sous-unité 60S du ribosome. Les nucléotides du domaine V qui sont responsables de l'activité PFAR sont également des cibles spécifiques de la 6AP et du GA. Cela suggère donc que l'activité PFAR représente un nouveau mécanisme de prionisation conservé de la levure aux mammifères. Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'activité PFAR est réellement impliquée dans les mécanismes de prionisation chez la levure. Cette implication a été mise en évidence de façon directe en inhibant spécifiquement des nucléotides impliqués dans l'activité PFAR et interagissant avec la 6AP et le GA par une méthode de méthylation dirigée. En effet, la méthylation dirigée de certains de ces nucléotides responsables de l'activité PFAR conduit à une déstabilisation quasi totale du prion [*PSI*⁺]. L'impact de PFAR sur le prion [*PSI*⁺] est ensuite confirmé en utilisant les souches de levure *Itv1Δ* et *yar1Δ* enrichies en grande sous-unité 60S de ribosome qui porte la PFAR. L'enrichissement en PFAR favorise l'apparition spontanée du prion [*PSI*⁺] au sein de la population de cellules [*psi*⁻]. A l'inverse, l'enrichissement en PFAR conduit à une instabilité accrue de ce même prion. Ainsi, l'activité PFAR est similaire à celle d'Hsp104, une protéine indispensable au maintien et à la propagation de tous les prions de levure. Nous avons émis l'hypothèse que les activités PFAR et Hsp104p pourraient être au moins partiellement redondantes pour les mécanismes de prionisation chez la levure. L'ensemble de ces données est présenté dans l'article 1 : « **The protein folding activity of the ribosome is involved in amyloid formation and propagation** » qui sera prochainement publié dans un journal à comité de lecture.

Dans la deuxième partie, nous avons identifié de nouvelles molécules antiprion issues de chimiothèques commerciales et académiques. Les molécules identifiées

sont actives aussi bien contre les prions de levure [*PSI+*] et [URE3] que contre le prion de mammifère PrP^{Sc}. Notamment, l'Imiquimod est une molécule antiprion issue de la chimiothèque Tebu-bio et la Flunarizine est issue de la chimiothèque Prestwick. De plus, ces molécules possèdent systématiquement la capacité d'inhiber l'activité PFAR. Ces résultats suggèrent d'une part une conservation de mécanismes de prionisation entre la levure et le mammifère, et d'autre part la PFAR est une cible thérapeutique prometteuse pour les maladies à prion. Nous avons également réalisée des études structure-activité (RSA) autour du GA et de la 6AP, des molécules antiprion antérieurement isolés dans notre laboratoire, afin d'identifier de nouveaux dérivés actifs plus intéressantes.

Les résultats concernant l'Imiquimod fait l'objet de l'article 2: « **The Toll-like receptor agonist imiquimod is active against prions.** Oumata N, Nguyen P.H, Beringue V, Soubigou F, Pang Y, Desban N, Massacrier C, Morel Y, Paturel C, Contesse M.A, Bouaziz S, Sanyal S, Galons H, Blondel M and Voisset C. PLoS ONE, August 2013, volume 8, issue 8, e72112.

V.1 Implication de l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) dans les mécanismes de prionisation

V.1.1 Les preuves directes

La question sur le rôle de l'activité PFAR dans les mécanismes de prionisation a été posée pour la première fois après que l'activité PFAR ait été identifiée comme cible spécifique des molécules antiprion 6AP et GA (Tribouillard-Tenvier et al. 2008), puis de nombreux composés antiprion criblés dans notre laboratoire. Les nucléotides U2861-U2862, G2863, U2873-G2874, U2875-C2876, U2932, U2954-U2955 et A2956-G2957 de l'ARNr 25S de *S. cerevisiae* ont récemment été identifiés pour leur implication dans l'activité PFAR *in vitro* et ils interagissent avec la 6AP et du GA (Dos Reis et al. 2011 ; Pang, Kurella et al. 2013) (figure 25). Nous avons voulu déterminer si l'altération de ces nucléotides pourrait directement affecter la propagation du prion *[PSI+]*. Or, la mutagenèse dirigée de l'ARNr ne peut pas être effectuée car chez la levure, tous les ARNr sont codés par un locu de 9 kb qui est répété de 100 à 140 fois sur le chromosome XII (Petes 1979). Nous avons donc utilisé une méthode de méthylation dirigée qui permet de méthyler ces nucléotides au niveau du produit du gène, l'ARNr, sans modifier les gènes codant les ARNr (Liu B and Fournier MJ 2004). La méthode de méthylation dirigée basée sur l'utilisation d'un snoRNA, un complexe formé d'ARN non codant et de protéines, qui méthyle un nucléotide spécifique sur un ARN cible grâce à son ARN guide (Liu B, Ni J et al. 2001). L'équipe de M. Fournier a « customisé » le snoRNA38 naturel de levure pour méthyler des nucléotides à façon une méthylation sur un nucléotide qui peut être assimilée à une « pseudo mutation ». Nous avons utilisé le snoRNA38 afin de méthyler les nucléotides du domaine V de l'ARN 25S impliquées dans la PFAR. 7 PFAR-snoRNAs ont été créés pour méthyler les nucléotides U2862, G2863, U2873, C2876, U2932, U2954 et G2957. Nous avons utilisé la souche *[PSI+]* *weak* dans laquelle le prion est moins stable que dans la souche *strong*, ce qui permet de visualiser plus facilement les défauts de propagations de *[PSI+]*. La souche *[PSI+]* *weak* a ensuite été transformée par les plasmides codant ces snoRNA et la proportion des colonies

rouges [*psi*-] obtenue par rapport aux contrôles (snoRNA sans séquence guide et plasmide vide) a été évaluée afin de déterminer l'implication *in vivo* de l'activité PFAR dans la propagation du prion [*PS*/+]. L'inactivation de la PFAR par la méthylation ciblée du nucléotide U2862 du domaine V de l'ARNr 25S a un effet sur la propagation de prion [*PS*/+]. Lorsque le nucléotide U2862 est méthylé par le snoARN, une perte massive du prion [*PS*/+] a été observée par rapport aux contrôles (figure 1D, article 1). Nous avons aussi vérifié que la surexpression de snoARN ne perturbe pas l'expression de Sup5p ni d'Hsp104p (figure S3B, article 1) ni le ratio 18S/25S (figure 3SA, article 1). Ces expériences ont été réalisées par Flavie Soubigou, Justine Evrard et C. Voisset. C'est la première preuve directe du lien entre l'inhibition de la PFAR et la déstabilisation du prion [*PS*/+].

V.1.2 Les preuves indirectes

Afin de confirmer l'implication de la PFAR dans les mécanismes de prionisation, nous avons déterminé les effets de l'enrichissement en PFAR sur le maintien et la propagation du prion [*PS*/+].

V.1.2.1 Surexpression de l'ARNr 25S

Comme le domaine V de l'ARNr 25S porte la PFAR chez la levure, nous avons essayé de surexprimer l'ARNr 25S dans les cellules [*PS*/+] pour voir si cette augmentation a un impact sur la stabilité et sur la sensibilité aux drogues antiprion du prion [*PS*/+]. Avant mon arrivée dans l'équipe, F. Soubigou et C. Voisset ont effectué la transformation de levures [*PS*/+] par le plasmide pWL 170 codant l'ARNr 25S de *S. cerevisiae* sous le contrôle du promoteur forte GAL1 (Liang and Fournier 1997). Le contrôle était le plasmide pRS426 qui ne porte pas la séquence codant l'ARNr 25S. Après plusieurs essais, aucune différence de la stabilité ni de la sensibilité de [*PS*/+] aux drogues antiprion n'a été observée entre les cellules transformées par pWL 170 et pRS426 (résultats non publiés). Il est probable que la surproduction de l'ARNr 25S par transformation ait pour conséquence la réduction de la production d'ARNr 25S à partir des copies chromosomiques, aboutissant ainsi à un taux d'ARNr

25S inchangé. J'ai ensuite testé l'impact de la surproduction du domaine V d'ARNr 23S (bactérie), d'ARNr 25S (levure) et d'ARNr 28S (humaine) sur la stabilité du prion [PS/+]. Les séquences codant le domaine V ont été sous-clonées sous le contrôle du promoteur forte GAL1. La surproduction du domaine V (de 23S, 25S et 28S) n'ont pas provoqué une perte du prion [PS/+]. Il est possible que le domaine V ne soit pas correctement replié pour avoir des effets sur le prion [PS/+].

V.1.2.2 L'enrichissement en PFAR par modification du ratio de grandes/petites sous-unités 60S/40S du ribosome

Une autre stratégie a été utilisée afin d'augmenter l'activité chaperon de protéines du ribosome *in vivo*. C. Voisset a construit des mutants de levure dans lesquels le ratio entre la quantité de grandes et de petites sous-unités du ribosome est modifié en faveur des grandes sous-unités 60S (qui portent l'activité PFAR). Si la PFAR est réellement impliquée dans les mécanismes de prionisation du prion, l'enrichissement en grandes sous-unités 60S de ribosome portant la PFAR pourrait avoir des conséquences directes sur la fréquence d'apparition *de novo* du prion [PS/+] et sur sa stabilité. Par la délétion des gènes codant les protéines impliquées dans le transport des petites sous-unités 40S du noyau vers le cytoplasme tels que les gènes non essentiels *LTV1* et *YAR1*, le ratio 60S:40S cytoplasmique augmente dans les souches mutantes (Loar, Seiser et al. 2004 ; Seiser, Sundberg et al. 2006) (figure 26).

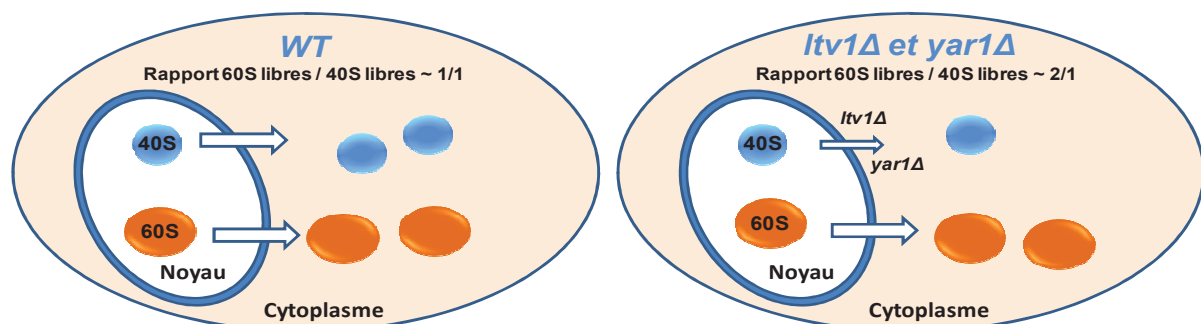


Figure 26. Schéma représentant les ratios entre les grandes sous-unités 60S libres et les petites sous-unités 40S libres du ribosome dans les souches WT et mutantes (*Itv1Δ* et *yar1Δ*).

Dans la souche *WT*, le ratio cytoplasmique entre les 60S libres et les 40S libres du ribosome est de 1/1. Dans les souches mutantes (*Itv1Δ* et *yar1Δ*), le transport des petites sous-unités 40S du noyau vers le cytoplasme est réduit, ce qui favorise une augmentation du rapport 60S libres / 40S libres, et donc un enrichissement en PFAR portée par les grandes sous-unités 60S du ribosome.

L'augmentation de 60S libres par rapport aux 40S libres chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* a été vérifiée par leurs profils de polysomes (figure S1A, article 1). Bien que les gènes *LTV1* et *YAR1* soient impliqués dans la biogenèse de ribosome, les profils de traduction de ces mutants ne diffèrent pas de celui de la souche sauvage comme le montre les gels d'électrophorèse 2D effectués par S. Chédin et J. Labarre (Saclay) (figure S1C, article 1). Le niveau d'expression de Sup35p et de Hsp104p dont la variation peut perturber la propagation du prion *[PSI⁺]* *weak*, reste également inchangé entre ces mutants et le *WT* (figure S1D, article 1). Chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ*, nous avons observé une diminution de la sensibilité aux drogues antiprion tels que la 6AP et le GA qui inhibent spécifiquement la PFAR par rapport au *WT* (figure S1B, article 1). Cette diminution de la sensibilité n'est pas due à un changement de la perméabilité membranaire mais à l'enrichissement en PFAR chez ces mutants. En effet, la perméabilité membranaire des souches mutantes et *WT* est identique, les différentes molécules (éthanol, menadione, disulfiram et chlorhexidine) donnent des halos toxiques de diamètres similaires pour les mutants et le *WT* (figure S1E, article 1). L'ensemble de ces données confirme que les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* enrichis en PFAR sont de bons outils pour étudier l'implication de l'activité PFAR dans la prionisation chez la levure.

Au sein de la population de levure *[psi⁻]*, l'apparition spontanée du prion *[PSI⁺]* est plus importante chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* que chez le *WT* (figure 1A, article 1). Il semble donc que l'augmentation de la quantité de sous-unités 60S du ribosome portant la PFAR ait un effet pro-prion. En effet, la PFAR pourrait aider la protéine Sup35p à atteindre sa conformation prion. A l'inverse, l'enrichissement en PFAR chez ces mutants déstabilise le prion *[PSI⁺]* (figure 1B, article 1). La proportion de colonies rouges *[psi⁻]* apparaissant dans une population de cellules *[PSI⁺]* est plus grande chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* que chez le *WT*. Pour vérifier que la perte du prion *[PSI⁺]* est directement associée à l'enrichissement en PFAR chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ*, les cellules ont été étalées sur un milieu riche YPD contenant des quantités croissantes de 6AP (0 à 50 μM), un inhibiteur de l'activité PFAR. Nous avons observé que plus la concentration en 6AP est grande, moins le prion *[PSI⁺]* est perdu (figure 1C, article 1). L'ensemble de ces données montre une corrélation directe entre l'enrichissement en PFAR et l'apparition spontanée du prion *[PSI⁺]* ainsi que sa stabilité.

Dans le but de confirmer que c'est bien l'augmentation de la quantité de sous-unité 60S libres du ribosome portant la PFAR qui a une influence directe sur la stabilité du prion [*PSI*⁺] et non un effet secondaire dû à la délétion des gènes *LTV1* et *YAR1*, nous avons augmenté la quantité de 60S libres par la surproduction de Bms1p. La protéine Bms1 est une protéine nucléaire essentielle chez la levure et conservée chez les eucaryotes au cours de l'évolution. Elle a un rôle dans la régulation de la biogenèse des petites sous-unités 40S du ribosome (Wegierski, Billy et al. 2001 ; Perez-Fernandez, Martin-Macos et al. 2011). Dans le but de déterminer les meilleures conditions qui permettent d'optimiser le taux de production et la qualité de protéines hétérologues membranaires ou solubles chez la levure *S. cerevisiae*, l'équipe de R. Bill a remarqué qu'une surexpression du gène *BMS1* permettait une synthèse accrue de protéines plus actives donc mieux repliées. Ils ont observé que la surproduction de Bms1p conduit à un déséquilibre entre les grandes 60S et petites sous-unités 40S du ribosome en faveur des sous-unités 60S (Bonander, Darby et al. 2009). Nous avons montré que la surproduction de Bms1p dans la souche *WT* [*PSI*⁺] par le plasmide codant Bms1p favorise l'enrichissement en grandes sous-unités 60S libres portant la PFAR (figure S2A, article 1), ce qui déstabilise également le prion [*PSI*⁺] (figure S2C, article 1) : la proportion de colonie [*psi*⁻] obtenue est beaucoup plus importante dans le cas de surproduction de Bms1p que par le contrôle (plasmide vide).

L'enrichissement en sous-unité 60S libres du ribosome portant la PFAR que ce soit par mutation (*ltv1Δ* et *yar1Δ*) ou par surproduction de Bms1p a donc la même conséquence sur la stabilité du prion [*PSI*⁺] : cela le déstabilise. Avec l'effet sur l'apparition spontanée du prion [*PSI*⁺] plus importante chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* enrichis en PFAR que le *WT*, ces observations non seulement constituent l'évidence d'un lien direct entre la PFAR et les mécanismes régulant du prion [*PSI*⁺] mais évoquent également le mode d'action d'Hsp104, un acteur cellulaire connu pour être impliqué de façon majeur dans les mécanismes de prionisation chez la levure.

V.1.3 La PFAR et Hsp104p : un rôle similaire dans la propagation du prion [PSI+] ?

Chez la levure, le principal acteur cellulaire connu pour son implication dans les mécanismes de prionisation est le chaperon de protéine Hsp104p. Dans des conditions de stress cellulaire, Hsp104p désassemble et assiste le repliement des protéines cellulaires (Bösl B et al. 2006) (figure 18). Hsp104p est également impliquée dans la propagation du prion [PSI+] chez la levure. Grâce à son activité désagrégase, Hsp104p permet de transformer les agrégats protéiques en de petits fragments, ou germes infectieux, qui sont transmis aux cellules filles, assurant ainsi la stabilité du prion au cours des générations (Liebman and Chernoff 2012 ; Wickner, Edskes et al. 2013). Une perte de l'activité désagrégase d'Hsp104p (par inhibition par le GuHCl ou par délétion du gène *HSP104*) diminue le nombre de germes infectieux par cellule lors de la division cellulaire et par conséquent cure le prion de levure (Liebman and Chernoff 2012; Paushkin, Kushnirov et al. 1996; Ferreira, Ness et al. 2001). La surproduction d'Hsp104 cure également le prion [PSI+], probablement par une désagrégation complète des fibres sous forme de monomères solubles, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien déterminés (Helsen and Glover 2012 ; Wickner, Edskes et al. 2013) (figure 19).

Nous avons montré que l'implication de l'activité PFAR dans l'apparition spontanée et la propagation du prion [PSI+] est similaire à celle d'Hsp104p. L'activité PFAR pourrait avoir un rôle de type Hsp104p-like dans la prionisation. Par son activité désagrégase, Hsp104p est impliquée dans les mécanismes de propagation du prion [PSI+] :

- L'inhibition d'Hsp104p (*hsp104Δ* ou traitement par le GuHCl) conduit à une perte du prion [PSI+] comme dans le cas de l'inhibition de l'activité PFAR par le GA et la 6AP (Tribouillard-Tanvier, Beringue et al. 2008) ou par la méthylation de nucléotide U2862 du domaine V de l'ARNr 25S (figure 27B).
- La surexpression d'*HSP104* cause la perte du prion [PSI+] (Newnam et al. 2011), comme l'enrichissement en PFAR le déstabilise (figure 27B).

- Enfin, la surproduction d'Hsp104p semble être nécessaire pour la formation *de novo* de petits oligomères de sup35p lors de la nucléation pour former des nouvelles fibres de Sup35p (Shorter and Lindquist, 2004), ce qui est similaire à une apparition spontanée du prion [PSI+] plus importante dans les souches [psi-] *ltv1Δ* et *yar1Δ* enrichies en PFAR.

L'ensemble de ces observations suggère que l'activité chaperon de protéines d'Hsp104p et celle de la PFAR sont peut-être redondante. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons délété *HSP104* chez les souches [PSI+] mutantes *ltv1Δ* et *yar1Δ* et le *WT* pour savoir si l'enrichissement en PFAR est capable de soutenir la propagation du prion [PSI+]. Or, cette délétion conduit à une perte complète du prion. L'activité chaperon d'Hsp104p est essentielle dans les mécanismes de propagation du prion. L'enrichissement en PFAR dans les souches *ltv1Δ* et *yar1Δ* ne peut pas complètement compenser la délétion d'*HSP104*. Cette redondance d'Hsp104p et la PFAR dans les mécanismes de propagation pourrait n'être que partielle.

La PFAR et l'activité chaperon d'Hsp104p sont partiellement redondantes

Nous avons proposé un modèle dans lequel Hsp104p et PFAR sont toutes les deux impliquées dans les mécanismes de prionisation (figure 27A). Les activités chaperon de protéines d'Hsp104p et de PFAR seraient nécessaires pour la propagation du prion [PSI+]. Toute modification de l'une de ces activités perturberait la propagation du prion [PSI+]. Ainsi, selon notre hypothèse, toute réduction de l'activité de l'une pourrait être compensée par l'augmentation de l'activité de l'autre, et *vice versa* (figure 27C et D).

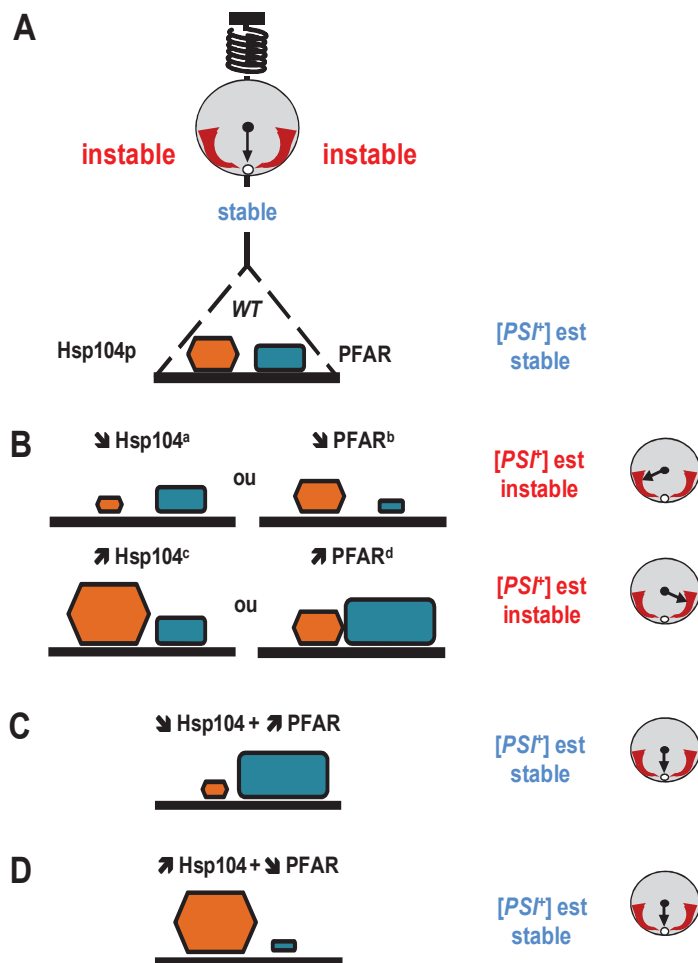


Figure 27. Modèle représentant la redondance partielle entre Hsp104p et PFAR dans la propagation du prion [PS⁺].

- (A) En condition normale, l'ensemble d'Hsp104p et de PFAR est impliquée dans le maintien de la stabilité du prion [PS⁺].
- (B) L'inhibition ou la surexpression de l'activité d'Hsp104p ou de PFAR conduit à une perte du prion [PS⁺] (^a inhibition d'Hsp104p par le GuHCl (Liebman SW & Chernoff YO 2012; Ness F, Ferreira P, Cox BS, & Tuite MF 2002); ^b inhibition de la PFAR par la 6AP ou le GA (Tribouillard-Tanvier D, *et al.* 2008), ^c surproduction d'Hsp104p par un choc thermique modéré à 39°C (Wickner RB, *et al.* 2013; Newnam *et al.* 2012) et ^d les souches *ltv1Δ* et *yar1Δ* enrichies en PFAR (figures 3 et 4, article 2).
- (C) L'inhibition d'Hsp104p serait compensée par l'enrichissement en PFAR.
- (D) L'inhibition de PFAR serait compensée par la surproduction d'Hsp104p.

(i) L'enrichissement en PFAR compense l'inhibition d'Hsp104p

Afin de tester la compensation entre l'activité chaperon de protéines d'Hsp104p et de la PFAR, nous avons évalué la sensibilité des souches [PS⁺] *WT* ainsi que des mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* enrichis en PFAR au traitement par le GuHCl dans le test

colorimétrique. Le halo rouge autour du filtre sur lequel a été déposé le GuHCl indique la capacité de cure du prion par le GuHCl par inhibition de l'activité ATPase d'Hsp104p. La même quantité de GuHCl déposée produit des halos rouges remarquablement plus petits pour les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* que celui obtenu dans le cas de *WT* (figure S4, article 1). L'enrichissement en PFAR chez les souches mutantes compense donc partiellement la perte d'activité d'Hsp104 causée par le GuHCl. Cette compensation est également observée dans un test de stabilité du prion [*PSI+*]. Contrairement à une cure totale de [*PSI+*] *weak*, qui se traduit par 100% de colonies rouges [*psi-*] chez la souche *WT* en présence d'une faible concentration de GuHCl dans le milieu YPD, la présence de GuHCl augmente la stabilité du prion [*PSI+*] chez les mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ* enrichis en PFAR (figure 3A, article 1). Ces données indiquent que l'instabilité du prion [*PSI+*] causée par l'enrichissement en PFAR peut être compensée par une inhibition partielle de l'activité d'Hsp104p. Cela suggère que PFAR et Hsp104p sont partiellement redondantes dans les processus de propagation du prion.

Nous avons ensuite validé ces résultats par une technique ne nécessite pas l'utilisation d'un inhibiteur. Pour cela, la compensation de l'activité entre PFAR et Hsp104p a également été évaluée en utilisant des souches [*PSI+*] haploinsuffisantes pour *HSP104*. Si la PFAR est capable de compenser une perte partielle d'activité d'Hsp104p, le prion [*PSI+*] devrait être plus stable dans des souches enrichies en PFAR dont un allèle d'*HSP104* a été délété que dans les souches contenant deux allèles d'*HSP104*. Nous avons observé que la proportion globale de colonies [*psi-*] obtenue est similaire pour les souches haploinsuffisantes pour *HSP104* enrichie ou non en PFAR. En effet, la souche *HSP104/hsp104Δ* produit une grande quantité de colonies [*psi-*] sectorisées rouge/blanche contenant une majorité de secteurs rouges. Par contre, les souches enrichies en PFAR produisent une grande quantité de colonies [*psi-*] sectorisées blanche/rouge contenant une majorité de secteurs blancs (figure 3B et 3C, article 1). Ceci indique que l'activité désagrégase d'Hsp14p dans la souche haploinsuffisante pour *HSP104* n'est pas suffisante pour assurer normalement la fragmentation des agrégats en germes infectieux pour transmettre aux générations suivants permettant la stabilité du prion [*PSI+*]. Par contre, l'enrichissement en PFAR semble compenser cette insuffisance en Hsp104p, le prion [*PSI+*] est plus stable au cours des générations, ce qui se traduit par la couleur

majoritairement blanche des colonies. Nous avons aussi vérifié que le niveau d'expression de Sup35p n'était pas modifié dans les souches haploinsuffisantes pour Hsp104 utilisées. Ces expériences ont été effectuées par F. Soubigou, J. Evrard et C. Voisset.

(ii) La surproduction d'Hsp104p compense l'inhibition de la PFAR

La stabilité du prion $[PS/+]$ a ensuite été évaluée en présence d'un excès d'Hsp104p. La surproduction d'Hsp104p déstabilise $[PS/+]$ en solubilisant les fibres de Sup35p nécessaires à la propagation de prion $[PS/+]$. Un choc thermique modéré induit une surproduction rapide d'Hsp104p qui déstabilise massivement le prion $[PS/+]$ après 30 minutes de choc en comparaison avec des cellules témoins (Newnam et al. 2011). Cette déstabilisation massive du prion $[PS/+]$ est entravée par la présence de GuHCl. Selon notre hypothèse, l'inhibition de la PFAR pourrait être compensée par l'excès d'Hsp104p. En effet, nous avons montré que la stabilité du prion $[PS/+]$ chez la souche *WT* est beaucoup moins affectée par le choc thermique modéré lorsque les cellules sont préalablement traitées par la 6AP, un inhibiteur de l'activité PFAR. Et enfin, le prion $[PS/+]$ devient beaucoup plus stable au choc thermique modéré quand les cellules sont traitées à la fois par de la 6AP et du GuHCl (figure 4A et 4B, article 1). De même, le prion $[PS/+]$ chez les mutants enrichis en PFAR est également déstabilisé par l'excès d'Hsp104p induit par le choc thermique modéré, mais la perte de $[PS/+]$ est beaucoup plus massive dans les mutants enrichis en PFAR que chez le *WT*. La stabilité de $[PS/+]$ est partiellement restaurée par le traitement par la 6AP et/ou le GuHCl comme dans le cas du *WT* (figure S7A et S7B, article 1).

En conclusion, l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) est réellement impliquée dans les mécanismes de l'apparition, de propagation et de maintien du prion $[PS/+]$. De plus, une redondance partielle entre PFAR et Hsp104p a été établie. L'ensemble de l'activité chaperon de PFAR et d'Hsp104p semble être nécessaire pour la propagation du prion $[PS/+]$ chez la levure et l'inhibition de l'une serait compensée par l'enrichissement de l'autre. Dans les cellules animales où il n'existe pas de chaperon de protéines de type Hsp104, il est possible que toute l'activité

chaperon de protéines nécessaire à la propagation des prions soit portée par la PFAR.

V.1.4 Rôle de PFAR dans le repliement des protéines lors d'un choc thermique

La PFAR et Hsp104p sont partiellement redondantes dans les mécanismes de prionisation. Nous allons voulu savoir si la PFAR est également capable de renaturer les protéines de levure lors d'un choc thermique et d'assurer la thermotolérance, comme le fait l'Hsp104p. Pour cela, les souches *WT*, *Itv1Δ* et *yar1Δ [psi-]* délétées ou non du gène *HSP104* ont été transformée par un plasmide codant une Luciférase qui est sensible à la température. La Luciférase est inactivée lorsque les cellules sont incubées à 46°C et elle retrouve son activité au cours du temps lorsque les cellules sont replacées à 29°C. En collaboration avec Gary Jones (Irlande), nous avons montré que la proportion de Luciférase restaurée après un choc thermique à 46°C est plus importante chez les mutants enrichis en PFAR que chez le *WT* (figure 4C, article 1). De plus, en absence d'Hsp104 (les souches *hsp104Δ*), l'enrichissement en PFAR a également augmenté l'activité de la Luciférase après un choc thermique. La PFAR semble comme Hsp104p, être capable de replier les protéines lors d'un choc thermique.

Pourtant, l'enrichissement en PFAR ne permet pas de prolonger la survie des cellules lors d'un choc thermique. En effet, lorsque les cellules ont subi un choc thermique à 48°C, les taux de survie n'ont pas différé entre les souches *WT* et mutantes enrichies en PFAR (figure 28).

L'activité PFAR est donc capable de replier les protéines dénaturées mais elle ne permet pas de prolonger la survie cellulaire lors d'un choc thermique, comme le fait l'Hsp104p. Il est probable que son impact soit trop faible pour être mis en évidence seul.

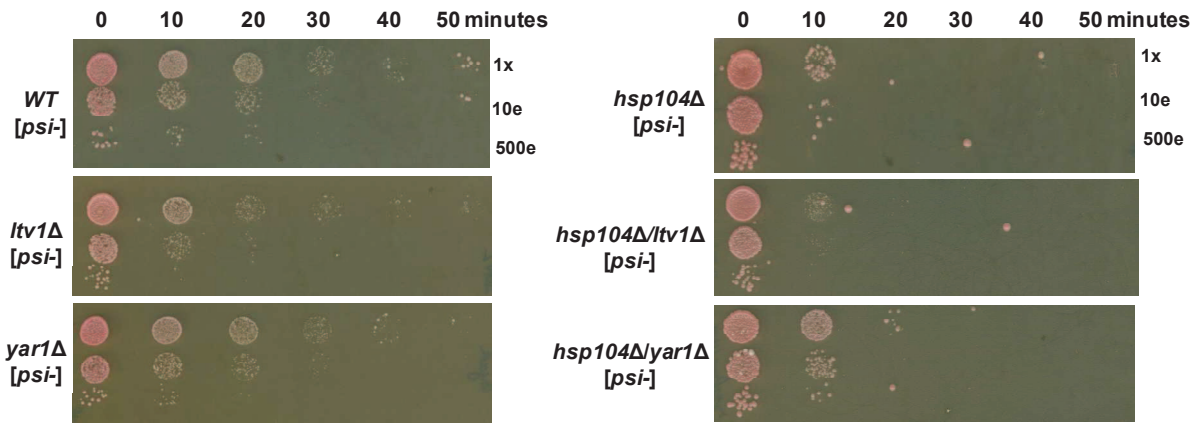


Figure 28. Test en goutte pour évaluer la thermotolérance des souches [psi-] enrichies en PFAR.

Les cellules ont subi un choc thermique à 48°C. Aux temps indiqués, des échantillons ont été prélevés puis dilués au 10^e et 500^e. Une goutte de 8 µl de chaque dilution a été déposée sur le milieu riche YPD. La quantité cellulaire à t = 0 (1x) est d'environ 500 cellules/µl.

L'activité PFAR est réellement impliquée dans les mécanismes de prionisation. Son activité est donc partiellement redondante avec celle d'Hsp104p. Ces résultats ont été obtenus d'un travail collectif dans lequel plusieurs personnes de l'équipe levure sont impliquées et également des collaborations étroites avec nos collaborateurs. Un manuscrit est en cours de rédaction et sera prochainement publié dans un journal de comité de lecture. L'ensemble de résultats est présenté dans l'article 1 : « **The protein folding activity of the ribosome is involved in amyloid formation and propagation** ».

Article 1

The protein folding activity of the ribosome is involved in amyloid formation and propagation

Cécile Voisset¹, Phu hai Nguyen¹, Flavie Soubigou¹, Justine Evrard¹, Naushaba Hasin², Stéphane Chédin³, Jean Labarre³, R. Gillet⁴, Marie-Astrid Contesse¹, Gaëlle Friocourt¹, Zarrin Alavi⁵, Suparna Sanyal⁶, Guillaume Stahl⁷, Gary Jones², Marc Blondel¹.

1 INSERM UMR1078, Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et de Sciences de la Santé ; Etablissement Français du Sang (EFS) Bretagne ; CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Brest, France, **2** Yeast Genetics Laboratory, Department of Biology, National University of Ireland Maynooth, Maynooth, County Kildare, Ireland, **3** CEA, iBiTecS, CNRS, Université Paris-Sud, FRE3377, F-91191 Gif-sur-Yvette, France, **4** Team Translation and Folding, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6290 IGDR, Campus de Beaulieu, Rennes, France, **5** INSERM CIC 0502 CHRU of Brest, **6** Department of Cell and Molecular Biology, BMC, Uppsala University, Sweden, **7** Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Université de Toulouse, Toulouse, France.

INTRODUCTION

The concept of infectious protein has first been established for PrP protein in mammals developing transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). When PrP is under its PrP^{Sc} prion conformation, it accumulates as self-propagating amyloid fibres without the need for specific nucleic acid (Griffith 1967; Prusiner 1982). Prions have also been identified in the budding yeast *S. cerevisiae* (Liebman and Chernoff 2012). Although prion proteins present in yeast do not show obvious sequence similarity with the mammalian prion protein PrP, they share a number of properties like formation of self-propagating amyloid fibres and oligomers, as well as proteinase K resistance (Liebman and Chernoff 2012).

Hsp104p, together with Hsp40s and Hsp70s (Reidy and Masison 2011; Winkler, Tyedmers et al. 2012), is needed for [PSI⁺] prion propagation and is, until today, the only known yeast cellular components involved in prionisation mechanisms. Hsp104p is a heat shock-induced molecular chaperone which primary role is to disassemble and remodel misfolded cellular proteins that have aggregated in heat-stressed cells, thus allowing thermotolerance (Sanchez and Lindquist 1990; Parsell, Kowal et al. 1994). The currently accepted model stipulates that, at its basal level, Hsp104p behaves as a desagregase, *i.e.*, it may act as a molecular sonicator to transform the highly aggregated dead-end fibres of the prion proteins into low molecular weight oligomers that can seed new rounds of protein polymerization and allow their transmission from mother to daughter cells (Liebman and Chernoff 2012; Wickner, Edskes et al. 2013). Thus, when Hsp104p is inhibited by guanidine hydrochloride (GdnHCl) or when *HSP104* is deleted, cells are cured of the prion as prion fibres are still able to form but are not split anymore to make new seeds so that the number of fibres per cell decreases as cells divide (Ness, Ferreira et al. 2002; Cox, Ness et al. 2003; Kryndushkin, Alexandrov et al. 2003; Liebman and Chernoff 2012). Similarly, Hsp104p overexpression also cures [PSI⁺] prion, likely by complete disaggregation of the prion fibres back to their soluble form, but the mechanisms of curing is not fully deciphered yet (Helsen and Glover 2012; Wickner, Edskes et al. 2013). No *HSP104*-like desagregase activity has been reported in mammalian cells yet.

[PSI⁺] is the prion form of the yeast cellular release factor Sup35p. In psi⁻ cells, Sup35p is under a soluble form and causes the ribosome to stop at the premature stop codon presents in the *ade1-14* gene. This leads to the release of a truncated Ade1 protein, thus preventing cells to grow on medium lacking adenine. In the

absence of Ade1p, cells accumulate a red metabolite. When Sup35p activity is partially sequestered under its prion state, it is incompletely functional in the process of termination (for review see liebman ou wickner), thus allowing readthrough of the ADE1 UGA stop codon (non sens suppression). Ade1p is thus produced in PSI⁺ cells, converts the red metabolite into a colorless compound, allowing colonies to grow on medium lacking adenine and to be white or light pink on YPD rich medium.

We took advantage of this white/red colorimetric system to set up an antiprion drug screening assay. This assay, based on the successive use of the two unrelated [PSI⁺] and [URE3] yeast prions and PrP^{Sc} mammalian prion, allowed us to show that mechanisms controlling prion appearance and propagation are conserved from yeast to human (Bach, Talarek et al. 2003; Bach, Tribouillard et al. 2006; Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008). This screening method allowed the identification of two antiprion compounds, 6-aminophenanthridine (6AP) and Guanabenz (GA, a compound already in use in human for the treatment of hypertension) that are active against both yeast and mammalian prions (Bach, Talarek et al. 2003; Tribouillard-Tanvier, Beringue et al. 2008). 6AP and GA were shown to interact with specific nucleotides of the domain V of the large rRNA (23S in *E. coli*, 25S in *S. cerevisiae* and 28S in human) of the large subunit of the ribosome (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008; Pang, Kurella et al. 2013). The domain V of this rRNA bears two enzymatic activities, *i.e.*, the peptidyl transferase activity and the protein folding activity, also named PFAR (Protein Folding Activity of the Ribosome (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008); for reviews, see (Das, Das et al. 2008; Voisset, Thuret et al. 2008). PFAR was characterized by *in vitro* refolding experiments showing that the large subunit of the ribosome and the *in vitro* synthesized domain V of 23S/25S/28S rRNA are able by themselves to assist protein folding of a large number of denatured proteins (Chattopadhyay, Das et al. 1996; Das, Chattopadhyay et al. 1996; Chattopadhyay, Pal et al. 1999; Das, Das et al. 2008; Voisset, Thuret et al. 2008). 6AP and GA were further shown to be the first specific inhibitors of PFAR, contrary to antibiotics like chloramphenicol which affects both peptidyl transferase and protein folding activities of the ribosome (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008; Pang, Kurella et al. 2013). PFAR is not much characterized yet and its involvement in cellular processes and prion propagation is currently undeciphered.

In this study, we investigated the role of PFAR in the propagation of the yeast prion [PSI⁺]. We showed that PFAR is involved in both [PSI⁺] *de novo* formation and propagation. Our data also

indicate that Hsp104p and the domain V of the ribosome bear partially redundant chaperon activities both necessary for $[PSI^+]$ propagation.

RESULTS

PFAR enrichment enhances *de novo* appearance and in the mean time also impairs propagation of $[PSI^+]$.

Previous reports showed that the large ribosomal subunit (60S) of the ribosome folds proteins more efficiently than the entire ribosome, which suggests that the small ribosomal subunit (40S) may slightly attenuate PFAR by partially masking the domain V of the large rRNA (Basu, Samanta et al. 2008; Das, Das et al. 2008; Voisset, Thuret et al. 2008). We took advantage of the power of yeast genetics to create mutants displaying an imbalance between large and small subunits of ribosome to decipher the role of PFAR in prionisation mechanisms. The rationale was that if PFAR plays a role in prion propagation, enrichment in 60S large subunits of the ribosome bearing PFAR may directly affect *de novo* appearance of $[PSI^+]$ prion and/or its propagation. We thus deleted *LTV1* and *YAR1* genes that are involved in the transport of the small 40S subunits from the nucleus to the cytoplasm in a *WT* $[PSI^+]$ weak strain (Loar, Seiser et al. 2004; Seiser, Sundberg et al. 2006). Compared to the *WT* strain, *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutant strains displayed elevated levels of free 60S subunits, as well as an impoverishment in 40S subunits compared to the *WT* strain (Fig. S1A), as previously described (Loar, Seiser et al. 2004; Seiser, Sundberg et al. 2006). The lower antiprion efficiency of 6AP and GA on *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains is in good correlation with the excess of their 25S rRNA target on *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains (Fig. 1SB). These two mutants display translation profile (Fig. S1C & S1D) and membrane permeability (Fig. S1E) similar to that of the *WT* strain.

To investigate the involvement of PFAR in initiating prion seeding, we monitor the *de novo* formation of $[PSI^+]$ from $[psi^-]$ in these PFAR-enriched cells. We showed that spontaneous $[PSI^+]$ formation occurred at a higher rate in *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains compared to the *WT* strain (Fig. 1A). We can conclude from this set of experiments that when the protein folding activity of the ribosome is strengthened, Sup35p can more easily convert into its prion state, suggesting that PFAR may help Sup35p reaching a prion-prone conformation.

We next wondered whether PFAR was also involved in $[PSI^+]$ propagation, as apparition and propagation of $[PSI^+]$ prion could be mediated by distinct mechanisms (Derkatch, Bradley et al. 2000; Zhou, Derkatch et al. 2001; Bradley and Liebman 2004). $[PSI^+]$ propagation efficiency

was assessed by scoring the proportion of $[psi^-]$ red colonies issued from white $[PSI^+]$ colonies upon cell division. As shown in Fig. 1B, the proportion of spontaneously appearing red colonies was higher for *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutants compared to the *WT* strain, suggesting that $[PSI^+]$ propagation was impaired in PFAR-enriched cells. In the presence of the PFAR inhibitor 6AP, $[PSI^+]$ recovered its stability in *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains in a dose-dependent manner (Fig. 1C), indicating that $[PSI^+]$ instability was linked to the enrichment in protein folding activity of the ribosome of these strains. In order to further confirming these data, we increased the proportion of free 60S subunits by overexpressing Bms1p, a protein involved in the biogenesis of the 40S subunits, leading to the perturbation of 60S:40S ratio in favour of 60S subunits (Bonander, Darby et al. 2009), similarly to what is observed in *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains (Fig. S2A). The overexpression of Bms1p in a *WT* $[PSI^+]$ weak strain makes $[PSI^+]$ less susceptible to antiprion drugs 6AP and GA compared to the *WT* strain (Fig. S2B). Moreover, as observed for *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains, the higher proportion of red $[psi^-]$ colonies indicates that $[PSI^+]$ propagation was markedly reduced on Bms1p-overexpressing cells (Fig. S2C), thereby confirming the direct correlation between PFAR and $[PSI^+]$ propagation. Together with the fact that $[PSI^+]$ appears spontaneously with a higher frequency in PFAR-enriched *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutants, these data underscore that PFAR is involved in prionisation mechanisms.

Alteration of rRNA nucleotides involved in PFAR impairs $[PSI^+]$ propagation.

Some nucleotides of the domain V of bacteria 23S rRNA were recently shown to specifically interact with denatured proteins under refolding process (Samanta, Mukhopadhyay et al. 2008) as well as with anti-PFAR drugs 6AP and GA (Pang, Kurella et al. 2013). Using an *in vitro* assay, we recently showed that mutation of some of these nucleotides on 23S and 25S rRNA led to a complete loss of PFAR, indicating that these nucleotides are involved in the protein folding activity of the ribosome (Pang, Kurella et al. 2013). Based on these *in vitro* data, we sought to determine if altering nucleotides involved in PFAR may directly affect $[PSI^+]$ propagation. rDNA site-directed mutagenesis was hardly conceivable because the yeast genome contains about 100 to 140 copies of rDNA (Petes 1979). We thus make use of the site-directed methylation method described by M. Fournier's group (Liu and Fournier 2004; Decatur, Liang et al. 2007) that allows to specifically methylate nucleotides directly at the rRNA level, by hijacking naturally encoded yeast snoRNA. Different groups have shown that miss-

targeted methylation can be achieved at will by replacing the guide element of cellular snoRNAs with a custom guide sequence (Cavaille, Nicoloso et al. 1996; Liu, Ni et al. 2001; Decatur, Liang et al. 2007). The nucleotide to be modified is targeted through specific base-pairing of the snoRNA guide sequence with its rRNA substrate. Introduction of a point modification using natural machinery at a specific site is thus equivalent to a point mutation but only on the gene products (Liu and Fournier 2004). This *in vivo* site-directed methylation method has been used for functional mapping of the peptidyl transferase centre (Liu, Ni et al. 2001; Liu and Fournier 2004). All custom snoRNA designed so far were shown to generate a methylation at the targeted nucleotide (Liu, Liang et al. 2008). We thus generated 7 PFAR-snoRNAs specifically targeting nucleotides of the domain V of yeast 25S rRNA previously described to be involved in the protein folding activity of the ribosome *in vitro* (Pang, Kurella et al. 2013). $[PSI^+]$ stability was assessed by scoring the proportion of $[psi^-]$ red colonies issued from $WT [PSI^+]$ weak cells expressing these PFAR-snoRNAs. The expression of the PFAR-snoRNA targeting nucleotide T2862 led to a large proportion of $[psi^-]$ red cells compared to cells transformed by the snoRNA without guide sequence, other snoRNAs or an empty vector (Fig. 1D), suggesting that methylation of nucleotide T2862 markedly impairs $[PSI^+]$ propagation. $[PSI^+]$ loss upon expression of PFAR-snoRNA-T2862 is most probably due to methylation rather than an antisense interference effect caused by PFAR-snoRNA-T2862, as targeting methylation to the neighbour nucleotide T2863 causes no defect. Similar positional effects have already been described (Liu, Ni et al. 2001; Liu and Fournier 2004). Previous reports showed that mutations in the snoRNA box D' element that disrupts methylation but maintains base-pairing potential suppresses the growth interference effect of a snoRNA (Liu and Fournier 2004). $[PSI^+]$ instability in T2862-methylated cells was not due to a modification of 25S:18S ratio (Fig. S3A, (Liu, Liang et al. 2008)) or the expression level of proteins involved in $[PSI^+]$ propagation (Hsp104p and Sup35p) (Fig. S3B). These results confirm that PFAR is involved in $[PSI^+]$ propagation. This is the first direct evidence of a link between inhibition of ribosome-assisted folding activity and prion destabilization.

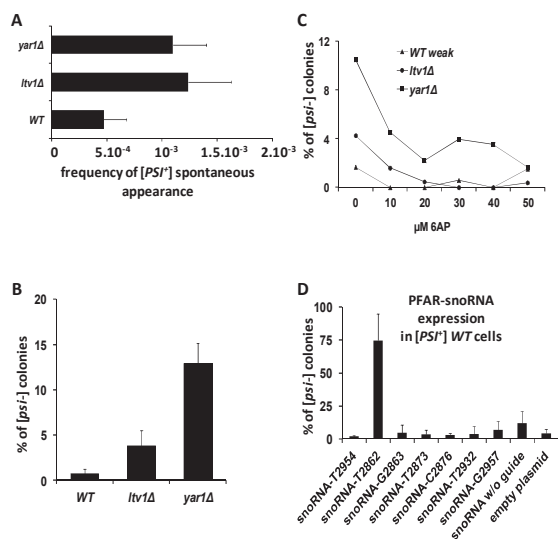


Figure 1. PFAR is involved in $[PSI^+]$ de novo formation and propagation.

(A) The spontaneous apparition rate of $[PSI^+]$ colonies from $[psi^-]$ $[PIN^+]$ cells was determined for WT , $Itv1Δ$ and $yar1Δ$ strains. Averages of four experiments are shown, with error bars. (B) The stability of $[PSI^+]$ was evaluated by scoring $[psi^-]$ red or sectored colonies issued from $[PSI^+]$ pink cells as a percentage of total cells for WT , $Itv1Δ$ and $yar1Δ$ strains. Averages of four experiments are shown, with error bars. (C) The effect of 6AP was evaluated on $[PSI^+]$ stability by scoring $[psi^-]$ red or sectored colonies issued from $[PSI^+]$ cells on medium supplemented with increasing amount of 6AP. (D) Effect on $[PSI^+]$ propagation of site-directed methylation mediated by PFAR-snoRNAs. $WT [PSI^+]$ weak cells were transformed by plasmids constitutively expressing PFAR-snoRNA specifically methylating nucleotides involved in the protein folding activity of the ribosome. The stability of $[PSI^+]$ was evaluated by assessing the number of $[psi^-]$ red or sectored colonies issued from $[PSI^+]$ cells as a percentage of total cells. Averages of three experiments are shown, with error bars.

Hsp104p and PFAR chaperon activities are partially redundant.

Our data showing that PFAR is involved in $[PSI^+]$ *de novo* appearance and propagation are reminiscent of the involvement of Hsp104p in prion propagation in yeast and suggest that PFAR may have an Hsp104p-like activity for $[PSI^+]$ propagation. Indeed, a lack of Hsp104p activity ($hsp104Δ$ or GdnHCl treatment) leads to $[PSI^+]$ curing (Jung and Masison 2001; Jung, Jones et al. 2002; Grimminger, Richter et al. 2004), as observed when PFAR is inhibited by anti-PFAR drugs 6AP or GA (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008) or by site-directed methylation (Fig. 1D). On the other hand, overexpression of *HSP104* results in $[PSI^+]$ loss (Paushkin, Kushnirov et al. 1996), like PFAR enrichment impairs $[PSI^+]$ propagation (Fig. 1B). Hsp104p also seems to be required for the *de novo* formation of small Sup35p oligomers necessary for the nucleation of new Sup35p fibrils (Shorter and Lindquist 2004), which is

reminiscent of the increase of frequency of $[PSI^+]$ *de novo* appearance in PFAR-enriched cells (Fig. 1A). Altogether, these data suggest that Hsp104p and PFAR chaperon activities may present some redundancy for $[PSI^+]$ amyloid formation and propagation. In order to challenge this hypothesis, we first evaluated if PFAR enrichment was able to sustain $[PSI^+]$ propagation in the complete absence of Hsp104p. $[PSI^+]$ was lost despite PFAR enrichment in *ltv1Δ-hsp104Δ* and *yar1Δ-hsp104Δ* strains, indicating that PFAR can not entirely compensate Hsp104p deletion and that the redundancy of Hsp104p and PFAR chaperon activities, if any, may only be partial. We previously observed that GdnHCl hardly cured $[PSI^+]$ in PFAR-enriched strains (Fig. S1B, bottom right filter), as the red halos appearing around filters on which GdnHCl was spotted were markedly smaller for *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutants than for the *WT* strain (Fig. S4). These data are a first indication that PFAR enrichment may partially compensate Hsp104p inhibition by GdnHCl. We thus propose a model in which the protein folding activities of Hsp104p and the ribosome (PFAR) may together sustain $[PSI^+]$ propagation in a complementary manner (Fig. 2A). According to experimental data, solely modifying Hsp104p or PFAR chaperon activities (inhibition or increase) alters $[PSI^+]$ propagation (Fig. 2B). If PFAR and Hsp104p display partially redundant activities, the reduction of one of them should be compensated by the enrichment of the other one, and *vice versa* (Fig. 2C & 2D).

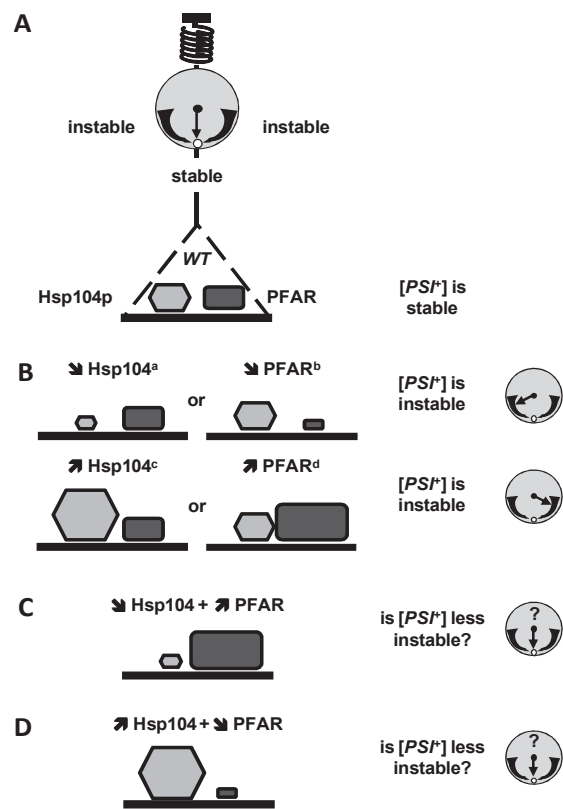


Figure 2. Sketch representing the possible interplay between protein folding activities of Hsp104p and the ribosome for $[PSI^+]$ propagation. (A) Proposed model picturing Hsp104p and PFAR that may together sustain $[PSI^+]$ propagation in a partially redundant manner. (B) $[PSI^+]$ propagation is similarly affected by the inhibition of Hsp104p (left panel) and PFAR (right panel), or by the enrichment in Hsp104p (left panel) and PFAR (right panel). ^a Hsp104p inhibition by GdnHCl (Paushkin, Kushnirov et al. 1996; Ferreira, Ness et al. 2001; Ness, Ferreira et al. 2002; Cox, Ness et al. 2003; Kryndushkin, Alexandrov et al. 2003; Liebman and Chernoff 2012). ^b PFAR inhibition by 6AP (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008). ^c heat shock or Hsp104p overexpression (Helsen and Glover 2012; Wickner, Edskes et al. 2013). ^d *ltv1Δ* or *yar1Δ* PFAR-enriched strains (this paper, Figs. 3 and 4). (C, D) According to our model picturing a partial redundancy between Hsp104p activity and PFAR, the reduction of the activity one of them should be compensated by the enrichment of the activity of other one, and *vice versa*.

According to this model, $[PSI^+]$ propagation should be sustained despite PFAR enrichment if Hsp104p activity is reduced (Fig. 2C). To test this hypothesis, we first evaluated the behaviour of $[PSI^+]$ in PFAR-enriched *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutants in which Hsp104p was inhibited by GdnHCl. Contrary to the complete curing of $[PSI^+]$ observed for the *WT* strain in the presence of GdnHCl, Hsp104p partial inhibition by GdnHCl caused an 8 to 10-fold increase of

[PSI⁺] stability in *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains over untreated [PSI⁺] cells (Fig. 3A). These data indicate that the instability of [PSI⁺] caused by PFAR strengthening can be compensated by a partial reduction of Hsp104p activity.

In order to further evaluate the capacity of PFAR to compensate the reduction of Hsp104p activity, we exploited the power of yeast genetics to create diploid *HSP104* haploinsufficient [PSI⁺] weak strains, thereby avoiding the use of GdnHCl. The rationale is that if PFAR enrichment can compensate a partial loss of Hsp104p activity, [PSI⁺] should be more stable in PFAR-enriched strains in which one of the alleles of *HSP104* has been deleted than in strains containing two alleles of *HSP104*. The expression level of proteins involved in [PSI⁺] propagation (Hsp104p and Sup35p) was stable in these diploid strains (Fig. S5). As expected, *ltv1Δ/ltv1Δ* and *yar1Δ/yar1Δ* diploid strains displayed a high proportion of [psi⁻] colonies compared to the *WT* strain (Table S1 & Fig. 3B, panels a, c & e), which is in accordance with [PSI⁺] instability observed in *ltv1Δ* and *yar1Δ* haploid strains (Fig. 1B). *HSP104/hsp104Δ* strain produced a large quantity of [psi⁻] colonies with a red/white sectored phenotype, i.e. colonies containing a majority of red sectors (Table S2), indicating that *HSP104* haploinsufficiency in a [PSI⁺] weak strain leads to a massive impairment of prion propagation (Fig. 3B, panels a & b; Fig. 3C). On the contrary, despite the global percentage of [psi⁻] colonies was similar for *HSP104* haploinsufficient strains enriched or not in PFAR (Table S2), PFAR enriched strains produced a large quantity of sectored [psi⁻] colonies with a white/red phenotype, i.e. colonies containing only few red sectors (Fig. 3B, panels c-f; Fig. 3C). These data suggest that [PSI⁺] loss was clearly reduced in haploinsufficient *HSP104/hsp104Δ* strains enriched in PFAR compared to *HSP104/hsp104Δ* strain. Altogether, these data show that PFAR enrichment enables [PSI⁺] propagation when Hsp104p level is not high enough to sustain [PSI⁺] propagation by itself (Fig. 3D).

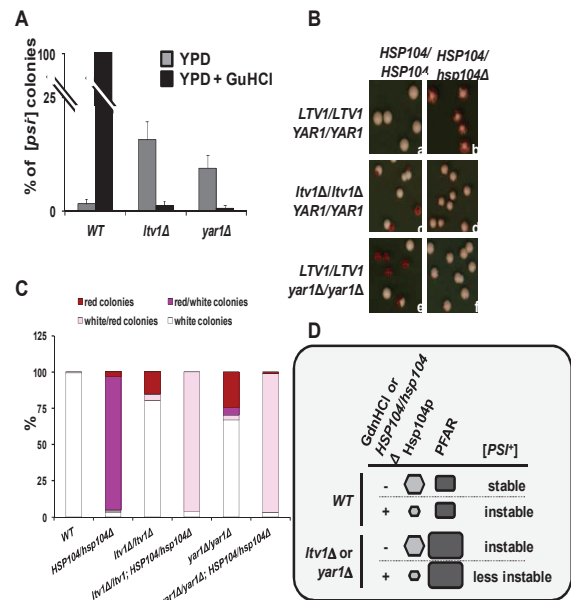


Figure 3. The reduction of Hsp104p activity compensates [PSI⁺] loss caused by PFAR enrichment. (A) The stability of [PSI⁺] in the presence of GdnHCl was evaluated by scoring [psi⁻] red or sectored colonies on YPD medium supplemented with 0.5 M GdnHCl as a percentage of total cells for *WT*, *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains. Averages of three experiments are shown, with error bars. (B) The stability of [PSI⁺] was evaluated in diploid *WT* (*HSP104/HSP104*, *LTV1/LTV1*, *YAR1/YAR1*, panel a), *HSP104* haploinsufficient (*HSP104/hsp104Δ*, *LTV1/LTV1*, *YAR1/YAR1*, panel b), PFAR-enriched (*HSP104/HSP104*, *ltv1Δ/ltv1Δ*, panel c, and *HSP104/HSP104*, *yar1Δ/yar1Δ*, panel e) and *HSP104* haploinsufficient PFAR-enriched (*HSP104/hsp104Δ*, *ltv1Δ/ltv1Δ*, panel d, and *HSP104/hsp104Δ*, *yar1Δ/yar1Δ*, panel f) strains. (C) Proportion of [PSI⁺] red colonies, [psi⁻] red colonies, [psi⁻] white/red and red/white sectored colonies produced by the diploid strains described in (B). [PSI⁺] stability was evaluated by scoring [psi⁻] red or sectored colonies on YPD medium as a percentage of total cells. Averages of four experiments are shown, with error bars. (D) Sketch illustrating the data obtained in panels A, B and C in the light of the model depicted in Fig. 2C

After showing PFAR enrichment can compensate Hsp104p deficiency, we sought to decipher if Hsp104p enrichment could compensate PFAR weakness. According to our model, [PSI⁺] propagation should be sustained despite Hsp104p enrichment if PFAR is reduced (Fig. 2D). It has recently been shown that a moderate (39°C) heat shock quickly induces Hsp104p overexpression and impairs prion segregation during the divisions following resumption of cell proliferation, due to an alteration of the proper balance between Hsp104p and other stress-inducible heat shock proteins like Hsp70p (Newnam, Birchmore et al. 2011). As previously described, a moderate heat shock induced an early overexpression of

Hsp104p (Fig. S6A) and massively destabilizes $[PSI^+]$ compared to non heat shocked cells (Fig. S6B). $[PSI^+]$ stability in *WT* cells was clearly less affected by heat shock when cells were treated by 6AP (Fig. 4A, 4B). $[PSI^+]$ was even more stable when heat shocked cells were treated by both GdnHCl and 6AP. In the same spirit, $[PSI^+]$ massive loss induced by heat-shock in the PFAR-enriched strain *yar1Δ* was partially reduced by 6AP treatment (Fig. S7). Altogether, these data indicate that PFAR and Hsp104p bear partially redundant protein folding activities. A tight equilibrium between both Hsp104p and PFAR chaperon activities seems to be necessary for the proper propagation of $[PSI^+]$ (Fig. 2).

PFAR possesses a protein remodeling capacity similar to that of Hsp104p.

As our data suggest that PFAR and Hsp104p are both involved in $[PSI^+]$ propagation in a partially redundant manner, we next wondered if PFAR may also possess a protein remodelling capacity similar to that of Hsp104p in heat-shocked cells. For that purpose, we monitored the *in vivo* refolding of Luciferase after a heat shock treatment in yeast. Luciferase refolding was slightly more efficient in *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutants than in the *WT* strain (Fig. 4C), which correlates with the enrichment of these strains in 60S subunits bearing PFAR. Remarkably, *ltv1Δ* and *yar1Δ* mutants in which *HSP104* has been deleted were still able to refold Luciferase, whereas *hsp104Δ* mutant was clearly not (Fig. 4C). These data suggest that, like Hsp104p, PFAR may also possess a protein remodelling capacity similar to Hsp104p in heat shocked cells.

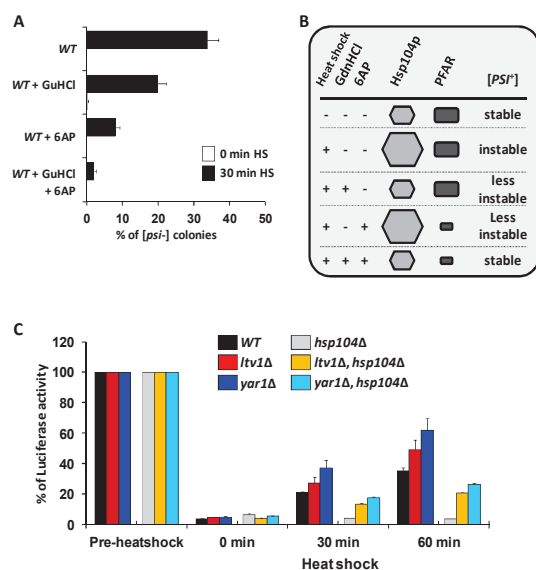


Figure 4. (A) PFAR inhibition compensates $[PSI^+]$ loss in cells overexpressing Hsp104p. *WT* $[PSI^+]$ cells were pre-treated by DMSO, 100 μ M 6AP for 2 hours, 1 mM GdnHCl for 15 min or by both

100 μ M 6AP and 1 mM GdnHCl before being heat-shocked (HS) at 39 °C. Aliquots of cells were collected after 30 min, 50 to 100 cells were spread on 10 plates and $[PSI^+]$ stability was evaluated by scoring $[psi^-]$ red or sectorized colonies as a percentage of total cells for DMSO-, 6AP-, GdnHCl-, 6AP and GdnHCl-treated cells. Averages of three experiments are shown, with error bars. (B) Sketch illustrating the data obtained in the light of the model depicted in Fig. 2D. (C) PFAR possesses a protein remodeling capacity similar to that of Hsp104p in heat shocked cells. *WT*, *ltv1Δ*, *yar1Δ*, *hsp104Δ*, *ltv1Δ/hsp104Δ* and *yar1Δ/hsp104Δ* $[psi^-]$ cells were heat shocked at 49 °C for 15 min. Aliquots of cells were harvested after specified post-heat shock incubation periods of time, and Luciferase activity was measured. Averages of three experiments are shown, with error bars.

DISCUSSION

Here, we report a direct link between the protein folding activity of the ribosome (PFAR) and $[PSI^+]$ *de novo* formation and propagation. Our data constitute a major breakthrough in the understanding of the general *in trans* mechanisms of prion propagation. We showed that PFAR enrichment is deleterious for $[PSI^+]$ propagation but beneficial for $[PSI^+]$ *de novo* formation. These data are not contradictory as it has previously been determined that *de novo* formation and propagation call for different mechanisms (Derkatch, Bradley et al. 2000; Zhou, Derkatch et al. 2001; Bradley and Liebman 2004). Indeed, GdnHCl and excess of Hsp104p, which are known to impair $[PSI^+]$ propagation, do not prevent the *de novo* induction of $[PSI^+]$ by Sup35p overexpression in $[psi^-][PIN^+]$ strains. Like Sup35p overexpression in $[psi^-][PIN^+]$ cells (Derkatch, Chernoff et al. 1996; Zhou, Derkatch et al. 2001), PFAR enrichment induces *de novo* appearance of weak or strong $[PSI^+]$ variants. These data highlight the potential implication of PFAR in *de novo* formation of $[PSI^+]$ during which Hsp104p role is not essential *in vivo*.

Our data showed that the reduction of the activity of Hsp104p can be compensated by the enrichment of the activity of PFAR, and *vice versa*. These data suggest that Hsp104p and the domain V of the ribosome bear partially redundant chaperon activities both necessary for $[PSI^+]$ propagation. PFAR may thus represent, together with Hsp104p, the first cellular component involved in prion propagation described in yeast so far. As no Hsp104p homologous protein bearing a desagregase activity has been described in mammalian cells so far, we propose that PFAR may fulfil this type of desagregase activity necessary for prion *de novo* formation and propagation in mammals. Of note, whereas the yeast prions occupy the same cellular compartment than the ribosome, it is not the case for PrP aggregates. Therefore it is possible to envision that PFAR is indirectly

involved in prion propagation, for instance by affecting a cellular factor required for prion replication / maintenance that may rely on PFAR for its proper folding. In addition, it has been shown that conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation can occur in the cytoplasm. It has recently been observed that PrP^{Sc} accumulates in the cytoplasm in response to inhibition of the 26S proteasome (Dron, Dandoy-Dron et al. 2009). Therefore, the possibility of a direct involvement of the ribosome in the conversion process remains a viable hypothesis.

The cellular role of PFAR is currently undeciphered. If PFAR indeed presents an *in vivo* activity on a wide range of substrate proteins as was demonstrated *in vitro* (Das, Das et al. 2008), it is expected that it may fulfill some cellular function. An indirect *in vivo* assay for PFAR based on the measurement of the enzymatic activity of β -Galactosidase in *E. coli* cells in the presence of various types of antibiotics has been set up (Chattopadhyay, Pal et al. 1999). When antibiotics are added to bacteria expressing β -Galactosidase, protein synthesis stopped immediately, but the effects on β -Galactosidase activity differed depending on the type of antibiotic used. The antibiotics binding to the large subunit of the ribosome such as chloramphenicol immediately and totally blocks the accumulation of β -Galactosidase activity. In contrast, in the presence of antibiotics binding to the small subunit like streptomycin, β -Galactosidase activity continues to increase before reaching a plateau. This residual increase of β -Galactosidase activity was proposed to be due to the ability of the ribosome to assist the folding of β -Galactosidase enzymes that were synthesized just before protein synthesis was inhibited by the antibiotics (Chattopadhyay, Pal et al. 1999; Voisset, Thuret et al. 2008). This assay indicates that antibiotics like chloramphenicol, which bind to the large subunit of the ribosome, inhibit PFAR *in vitro* while streptomycin, which binds to the small subunit, does not affect PFAR (Chattopadhyay, Pal et al. 1999; Voisset, Thuret et al. 2008). Using this assay, 6AP and GA were shown to be the first compounds to selectively inhibit PFAR without affecting the peptidyl-transferase activity of the ribosome (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008). Indeed, in the presence of both 6AP or GA and streptomycin, β -Galactosidase activity was shown to be totally abolished, as observed upon the addition of chloramphenicol, which inhibits both protein synthesis and PFAR (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008; Voisset, Thuret et al. 2008). The Luciferase refolding assay we performed in yeast, which is similar to the *E. coli*-based assay, clearly shows that in the absence of Hsp104p activity, PFAR can efficiently participate in the refolding of

proteins that were damaged upon heatshock. Thus, beside the potential demonstration that PFAR is directly involved in prion propagation, 6AP and GA are at any rate the only known specific inhibitors of PFAR thus constituting precious and original tools to study this as yet largely unknown function of the ribosome (Voisset, Saupe et al. 2009).

Because of the numerous similarities shared by a number of amyloid-based diseases (Brundin, Melki et al. 2010; Frost and Diamond 2010; Goedert, Clavaguera et al. 2010), including neurodegenerative diseases, there are a growing number of evidences that they share partially overlapping aetiology. Among these evidences are the fact that we recently observed that some of our anti-prion compounds present noticeable activity in models for other protein aggregation-based diseases. For example, the ability of 6AP & GA to interfere with aggregation was observed in cell-based models for Huntington's (M. Blondel & A. Bertolotti, European patent application).

In addition, 6AP & GA have been shown to have a beneficial effect on a drosophila-based model for OPMD (Oculopharyngeal muscular dystrophy). OPMD is an inherited dominant myodegenerative disease caused by extension of a polyalanine tract in the PABPN1 protein that accumulates as amyloid fibres (Barbezier, Chartier et al. 2011). In the drosophila OPMD model, both 6AP & GA suppress OPMD typical features ranging from amyloid fibres formation within the nuclei of muscular cells to degenerescence of muscular cells. This suppressive effect occurs even if the drugs are given after the appearance of the phenotype and is mimicked by large deletions of rDNA locus. In addition, a synergistic effect was observed between smaller deletions of the rDNA (which have no effect on the OPMD phenotype) locus and subeffective concentrations of the drugs. Finally, *in vitro* synthesized domain V of drosophila is able to catalyze the ability of mutated PABPN1 to form amyloid fibres *in vitro* (Barbezier, Chartier et al. 2011). Taken together, these data highlight the role of PFAR in protein aggregation.

MATERIAL AND METHODS

Yeast strains and plasmids

Itv1 Δ , *yar1 Δ* and *hsp104 Δ* strains were constructed on the basis of the 74D694 *WT* [*PSI⁺*] weak strain, as described in the *SI Material and Methods*.

BSM1 complete ORF (YPL217C) cloned in a Gateway vector under the control of a *GAL1*

promotor (Open Biosystems, plasmid 28A6) is issued from the Yeast ORF collection developed by E. Phizicky and M. Snyder (Gelperin, White et al. 2005).

Polysome gradients

100 U OD₂₆₀ of RNA were loaded on the top of 10-40 % sucrose gradients, as described in *SI Material and Methods* and (Loar, Seiser et al. 2004; Seiser, Sundberg et al. 2006).

Yeast-based anti-prion assay

This assay was performed as previously described (Bach, Talarek et al. 2003; Bach, Tribouillard et al. 2006). Briefly, *WT*, *ltv1Δ* and *yar1Δ* [*PSI*⁺] cells were spread on plates containing YPD solid medium supplemented with 200 μM GdnHCl. Individual compounds were applied to filter as described in *SI Material and Methods*.

Pulse chase.

5 ml of exponentially growing cultures of *WT*, *ltv1Δ* and *yar1Δ* [*PSI*⁺] cells were grown in the presence of radiolabelled [³⁵S] methionine (PerkinElmer Life Sciences) for 10 min, and then chased in medium containing 50 mM cold methionine and cysteine for 15 min before harvesting. Protein extracts were prepared as described above and analyzed by 2D-gel electrophoresis followed by autoradiography.

Electrophoresis, Western blots and antibodies

Exponentially growing cells were lysed and proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot using 1/1000 rabbit anti-Sup35p serum (Made by Eurogentec according to (Patino, Liu et al. 1996)), 1/10,000 mouse monoclonal anti-Hsp104p (kind gift of J. Glover, Montreal), 1/5000 anti-HA (Clontech), 1/5000 mouse anti-Actin (Calbiochem) or anti-GAPDH (Abcam), as described in *SI Material and Methods*.

Frequency of spontaneous conversion from [*psi*⁻] to [*PSI*⁺]

Conversion from [*psi*⁻] to [*PSI*⁺] in *WT*, *ltv1Δ* and *yar1Δ* strains was assessed as previously described (Derkatch, Chernoff et al. 1996; Chernoff, Uptain et al. 2002). Briefly, 3 millions of *WT*, *ltv1Δ* and *yar1Δ* cells were spread onto synthetic medium lacking adenine (SD-Ade), as described in *SI Material and Methods*. We used [*psi*⁻] [*PIN*⁺] cells for this set of experiment as [*PIN*⁺], the prion form of the Rnq1 protein, is needed for [*PSI*⁺] *de novo* formation (Derkatch, Bradley et al. 2000). True [*PSI*⁺] colonies were identified by velveteen replica plating on YPD

and YPD + 2 mM GdnHCl (Derkatch, Chernoff et al. 1996).

Prion stability

50 to 100 [*PSI*⁺] exponentially growing cells were spread onto YPD medium and incubated at 29°C. Once colonies were formed, the loss of [*PSI*⁺] was monitored by scoring red and sectored [*psi*⁻] colonies. Comparisons between different strains and/or conditions were always performed within the same experiments.

Site-directed methylation of rRNA by snoRNA

snoRNA site-directed methylation was performed as previously described on the basis of the yeast natural snoRNA snR38 (Liu and Fournier 2004). PFAR-snoRNAs were created as described in *SI Material and Methods*. PFAR-snoRNAs were then subcloned into p424 under the control of the strong constitutive *GPD* promoter. *WT* [*PSI*⁺] weak yeast cells were transformed by PFAR-snoRNAs encoding plasmid, an empty p424-*GPD* plasmid and the plasmid pBL150 encoding the yeast natural snoRNA snR38 as controls (Liu and Fournier 2004).

Prion stability after a moderate heat shock

WT, *ltv1Δ* and *yar1Δ* [*PSI*⁺] cells were grown in liquid YPD medium over night at 29°C and diluted to OD₆₀₀=0.1, followed by incubation at 29°C for an additional 2 h with shaking in order to obtain exponential cultures. Then, cultures were moved to 39 °C. Aliquots were taken after specified periods of time. Serial dilutions were prepared (1:25,000 dilution), and cells were spread for [*PSI*⁺] stability assay onto YPD medium and incubated at 29 °C (Newnam, Birchmore et al. 2011). Once colonies were formed, the loss of [*PSI*⁺] was monitored by scoring red and sectored [*psi*⁻] colonies.

Luciferase *in vivo* assay

Recovery of heat-inactivated Luciferase was performed using [*psi*⁻] *WT*, *ltv1Δ*, *yar1Δ*, *hsp104Δ*, *hsp104Δ/ltv1Δ* and *hsp104Δ/yar1Δ* 74D-694 strains transformed with plasmid which codes for the constitutive expression of a temperature-sensitive Luciferase polypeptide. Transformants were exponentially grown at 30°C. Luciferase was heat inactivated by incubating cells at 46°C for 20 min or kept at 30°C for the same period of time as control. Luciferase activity was measured immediately after the heat treatment, and then cells were left to recover at 25°C for various times up to 180 min before the Luciferase activity was measured by the addition of n-decylaldehyde and luminescence was quantified in a luminometer. The luciferase activity was then expressed as a

percentage of the activity before the 46°C heat treatment.

Acknowledgements

We thank M Fournier & S Herman for snoRNA, H  l  ne Simon, B Baratte & Vincent Guen, J  r  my Delesques for excellent technical assistance, Liebman for RNQ1, J Glover for Hsp104 antibody, Emmanuelle Masson, Sylvia Redon et Paul Gu  guen for oligonucleotide sequencing.

SI MATERIAL AND METHODS

Yeast strains and genetic manipulations

The yeast strain used in this study was 74-D694 [*Mata*, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3D200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*] (Chernoff, Lindquist et al. 1995; Bach, Talarek et al. 2003; Bach, Tribouillard et al. 2006). Yeast were grown and used as previously described (Bach, Tribouillard et al. 2006). [*PSI⁺*] results from the prion form of the cellular translation termination factor Sup35p. In [*psi⁻*] cells, Sup35p is under a soluble form and causes the premature termination of *ADE1* translation at this UGA codon. If Ade1p is not produced, one intermediate compound in this pathway, named AIR (P-ribosylaminoimidazole), accumulates in the cell. AIR itself is not red, but cells that are growing aerobically oxidize it to a red pigment. [*psi⁻*] cells are thus unable to grow on a medium lacking adenine (-Ade medium) and have a red phenotype on YPD media as AIR accumulates, oxidizes and thus confers a red color to yeast cells. When Sup35p activity is partially inactivated by aggregation into amyloid fibres, it is therefore incompletely functional in the process of termination (for review, see (Liebman and Chernoff 2012)). In [*PSI⁺*] cells, Sup35p is partially sequestered under its prion state, thus allowing readthrough of the *ADE1* UGA stop codon (nonsense suppression). Ade1p is thus produced in [*PSI⁺*] cells, converts AIR into a colorless compound, allowing colonies to grow on media lacking adenine (-Ade) and to be white or pink (instead of red) on YPD. As for PrP, variants of yeast prions have also been described. They are based on the same protein sequence but present different biological or biochemical properties due to structural differences (Tanaka, Chien et al. 2004; Liebman and Chernoff 2012): [*PSI⁺*] strong variant has a larger proportion of aggregated Sup35p than weak variant, thus allowing a more efficient translational readthrough than the weak variant,

which is therefore pinker (Liebman and Chernoff 2012). As the overall stability of strong [*PSI⁺*] is much higher than the stability of weak [*PSI⁺*], our experiments were performed with the weak [*PSI⁺*] variant, in which [*PSI⁺*] destabilization (appearance of [*psi⁻*] red colonies) was easier to detect.

Standard genetic manipulations were as described (Guthrie and Fink 1991). The mutant *ltv1Δ*, *yar1Δ* and *hsp104Δ* strains were constructed by replacing WT genes in 74-D694 [*PSI⁺*] weak by PCR amplification of the heterologous *Escherichia coli kan^r* or *Schizosaccharomyces pombe his5+* genes as selection markers (Longtine, McKenzie et al. 1998) using the primers described in **Table S1**, designed to replace the entire coding region of *LTV1*, *YAR1* and *HSP104* genes from the ATG to the stop codon. The *ltv1Δ* strain (*LTV1::KanMx*) was constructed by replacing the *LTV1* gene by the *kan^r* marker using primers LTV1-F and LTV1-R. The *yar1Δ* [*PSI⁺*] strain (*YAR1::his5*) was constructed by replacing the *YAR1* gene by the *his5+* marker using primers YAR1-F and YAR1-R. The *hsp104Δ-K* and *hsp104Δ-H* strains were constructed by replacing the *HSP104* gene by either *kan^r* (*HSP104::KanMx*) or *his5+* (*HSP104::his5*) markers, respectively, using primers HSP104-F and HSP104-R. After transformation of the yeast strain with the deletion cassette by the lithium acetate procedure, successful gene replacement was demonstrated by analytical PCR on genomic DNA using primers LTV1-Fbis and LTV1-Rbis, YAR1-Fbis and YAR1-Rbis, HSP104bis-F and HSP104bis-R (**Table S1**).

Diploid WT (*HSP104/HSP104*, *LTV1/LTV1*, *YAR1/YAR1*), *HSP104* haploinsufficient (*HSP104/hsp104Δ*, *LTV1/LTV1*, *YAR1/YAR1*), PFAR enriched (*HSP104/HSP104*, *ltv1Δ/ltv1Δ* and *HSP104/HSP104*, *yar1Δ/yar1Δ*) and PFAR enriched *HSP104* haploinsufficient (*HSP104/hsp104Δ*, *ltv1Δ/ltv1Δ* and *HSP104/hsp104Δ*, *yar1Δ/yar1Δ*) strains were obtained by mating *HSP104*, *HSP104::KanMx*, *HSP104::his5*, *LTV1::KanMx* and *YAR1::his5* haploid strains.

Polysome gradients

A total of 18 OD₆₀₀ of exponentially growing cells were treated for 10 min with 10 µg/ml of cycloheximide, harvested by centrifugation and washed cell pellets were resuspended in 150 µl lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 200 µg/ml heparin, 50 µg cycloheximide, 1 mM DTT, 40 U/ml RNase inhibitor, antiproteases cocktail (Roche), in DEPC-treated water). After the addition of 425-600 µm glass beads (Sigma Aldrich), cells were

lysed by vortexing for 30 sec followed by 30 sec ice-cooling for six times and then centrifuged for 5 min at 2300 g at 4°C. Supernatants were recovered, centrifuged at 9300 g for 10 min at 4°C and assayed for RNA content at OD₂₆₀. 100 U OD₂₆₀ of RNA were loaded on the top of 10-40 % sucrose gradients, centrifuged for 3h at 41600 rpm using a SW55ti swing rotor (Beckman coulter). 200 µl fractions were collected, and OD₂₆₀ was measured on 1/10 diluted fractions (Loar, Seiser et al. 2004; Seiser, Sundberg et al. 2006).

Yeast-based antiprion assay

An aliquot of an exponentially growing cultures (170 µl of 0.5 OD₆₀₀ culture of *WT* [*PSI*⁺] strains and 340 µl of 0.5 OD₆₀₀ culture of *ltv1Δ* and *yar1Δ* [*PSI*⁺] mutants) was spread homogeneously using sterile glass beads (≈ 3 to 5 mm diameter) on square (12 cm x 12 cm) Petri plates containing YPD solid medium supplemented with 200 µM GdnHCl, as previously described (Bach, Talarek et al. 2003; Bach, Tribouillard et al. 2006). Small sterile filters (Thermo-Fisher) were then placed on the agar surface and individual compounds were applied to each filter. DMSO, the vehicle, was applied to the top left filter as a negative control, and GdnHCl solubilised in water was applied to the bottom right filter as a positive control. The Petri plates were then incubated four days at 25°C and scanned using a Snap Scan1212 (Agfa). When a compound is active against [*PSI*⁺] prion, a halo of red colonies appears around the filter to which it was spotted whereas colonies remain white in case of inactive compounds.

Electrophoresis, Western blots and antibodies

A total of 6 OD₆₀₀ of exponentially growing cells were harvested by centrifugation and cell pellets were resuspended in lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.2 % Triton X-100, antiproteases cocktail (Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After the addition of 425-600 µm glass beads (Sigma Aldrich), cells were lysed by vortexing for 30 sec followed by 30 sec ice-cooling for six times and then centrifuged for 3 min at 800 g at 4°C. Supernatants were recovered, assayed for protein content using the non interfering protein assay kit (Calbiochem). Protein extracts were analyzed by 10 % SDS-PAGE (precast NuPAGE, Invitrogen) and transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes (Whatman). Membranes were blocked with PBS 1X / 0.1 % Igepal containing 5 % fat-free milk and 0.5% BSA, and incubated over night at 4°C with the indicated primary antibodies. The membranes were then washed with fresh PBS 1X / 0.1 %

Igepal and incubated for 45 min with secondary antibodies (goat anti-rabbit or goat anti-mouse, Biorad; goat anti-mouse IgM, Calbiochem) conjugated to horseradish peroxidase at a 1/3000 dilution, and analyzed by Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham) using a Vilber-Lourmat Photodocumentation Chemistart 5000 imager. The rabbit anti-Sup35p serum was obtained by immunization of rabbits using the antigenic peptide 55–68 of Sup35p (Eurogentec), according to (Patino, Liu et al. 1996).

Frequency of spontaneous conversion from [*psi*-] to [*PSI*⁺]

The *de novo* formation of [*PSI*⁺] from [*psi*-] cells was monitored on -Ade media where [*PSI*⁺] appearance was scored as growth (see above), as previously described (Derkatch, Chernoff et al. 1996; Chernoff, Uptain et al. 2002). Briefly, 3 millions cells from exponentially growing cultures (0.8 OD₆₀₀ cultures) of *WT*, *ltv1Δ* and *yar1Δ* [*psi*-] [*PIN*⁺] strains were spread onto 10 plates of synthetic medium lacking adenine (SD-Ade), and grown for 2 weeks at 29°C on this selective medium. To distinguish [*PSI*⁺] colonies from chromosomal suppressor mutations, Ade⁺ colonies were subjected to treatment with the antiprion drug GdnHCl as genuine white/pink [*PSI*⁺] cells switch to [*psi*] red cells when [*PSI*⁺] is cured by GdnHCl, whereas Ade⁺ spontaneous mutants keep a white color in the presence of GdnHCl (Derkatch, Chernoff et al. 1996). The number of colonies that underwent a colour change was scored for each replica plate. The total number of cells really spread was determined by plating 100 µl of a 1/40,000 dilution of the [*psi*-] [*PIN*⁺] cultures spread on SD-Ade onto rich YPD medium.

Site-directed methylation of rRNA by snoRNA

The snoRNAs we used correspond to the RNA moiety of snoRNA:proteins complexes named box C/D snoRNPs (small nucleolar RiboNucleoParticles) that are involved in 2'-O-methylation post-transcriptional maturation of rRNAs and other RNA produced in the nucleolus (Kiss-Laszlo, Henry et al. 1996; Kiss 2002). The specific guide sequence of snR38 was replaced by a 14 nucleotides sequence targeting one of the nucleotides of 25S domain V we identified as involved in PFAR (Pang, Kurella et al. 2013). Primers were designed to create snoRNAs specifically target nucleotides T2954, T2862, G2863, T2873, C2876, T2832 and G2957 of the domain V of rRNA 25S (PFAR-snoRNAs; **Table S1**). PFAR-snoRNAs were amplified from plasmid pBL143 (Liu and Fournier 2004) using each specific primer and BLO-38 primer (**Table S1**). PFAR-snoRNAs PCR products were digested by Bgl II and Nde I and cloned into

pBL150 (Liu and Fournier 2004). PFAR-snoRNAs were then subcloned into p424 plasmid using BamH I and Sac I restriction enzymes under the control of the strong constitutive *GPD* promoter. *WT* [*PSI*⁺] yeast cells were transformed by p424-*GPD* encoding PFAR-snoRNAs, an empty p424-*GPD* plasmid, and the plasmid pBL150 encoding the natural snoRNA snR38 as controls (Liu and Fournier 2004). [*PSI*⁺] stability was then scored on YPD. The snoRNA encoded by pBL143 previously described as targeting a nucleotide essential for protein synthesis (U1757 on rRNA 18S, (Liu and Fournier 2004)) was used as a positive control which induced cell death (data not shown). Note that none of the 7 nucleotides of the yeast 25S rRNA targeted by our custom PFAR-snoRNAs carries a natural post-translational modification (Piekna-Przybylska, Decatur et al. 2008).

RT Q-PCR

Total yeast cellular RNA were extracted using RNAeasy and RNase-free DNase kits (QIAGEN). cDNA synthesis was carried out from 1 µg of DNA-free RNA using Superscript II (Invitrogene) using 18S-F, 25S-F and Actin-F primers (Table S1). cDNA samples were subjected to quantitative PCR with 18S-F and 18S-R, 25S-F and 25S-R and Actin-F and Actin-R primers (Table S1), using QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) in the Abiprism 7000 Sequence Detection System (Applied).

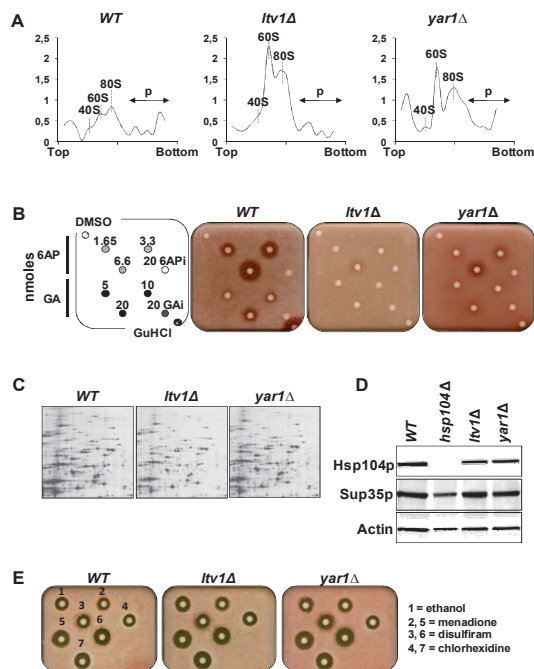


Figure S1. Characterisation of PFAR-enriched *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutant strains.

(A) Polysome profiles of *WT*, *Itv1Δ* and *yar1Δ* strains showing that *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutant strains displayed elevated levels of free 60S subunits, as well as an impoverishment in 40S subunits compared to the *WT* strain. 60S:40S ratios were 2.28 for the *WT* strain, 4.03 and 5.09 for *Itv1Δ* and *yar1Δ* strains, respectively. **(B)** Sensitivity of *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutants to 6AP and GA, two antiprion drugs that were shown to specifically inhibit PFAR (Tribouillard-Tanvier, Dos Reis et al. 2008; Reis, Pang et al. 2011; Pang, Kurella et al. 2013). [*PSI*⁺] *WT*, *Itv1Δ* and *yar1Δ* strains, all growing as white colonies, were spread on YPD medium supplemented with 200 µM GdnHCl. Small filters were then placed on the agar surface and various amounts of 6AP and GA were applied to each filter, except for the top left filter on which DMSO, the compound vehicle was added (negative control) and for the bottom right filter on which 3 µmoles of GdnHCl were added (positive control). This colorimetric assay is based on a colour change: white [*PSI*⁺] cells turned red around the filter on which an antiprion compound has been spotted. The size of the red halos is proportional to the efficiency of [*PSI*⁺] loss. As previously described, a red halo appeared around filters on which 6AP and GA were spotted, indicating these compounds are able to cure the *WT* strain of [*PSI*⁺]. The red halos appearing around filters on which 6AP and GA were spotted were markedly smaller for *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutants than for the *WT* strain, suggesting that 6AP and GA were titrated by the excess of their target. [*PSI*⁺] curing by the positive control GdnHCl was also less efficient on *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutants. **(C)** As Ltv1p and Yar1p are involved in ribosome biogenesis, translation profiles of *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutants were analyzed by 2D-gel electrophoresis. For that purpose, proteins of exponentially growing yeast cells were radiolabelled with [³⁵S] methionine, cells were harvested and lysates were analyzed by 2D-SDS-PAGE followed by autoradiography. **(D)** Lysates of exponentially growing *WT* and *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutant cells were analyzed by SDS-PAGE for the expression of Hsp104p and Sup35p. Actin was used as a loading control. **(E)** Permeability of [*PSI*⁺] *WT*, *Itv1Δ* and *yar1Δ* strains was analyzed. Cells were spread on YPD medium and small filters were placed on the agar surface. 10 nmoles (filters 2, 3, 4) and 20 nmoles (filters 1, 5, 6, 7) of ethanol, menadione, disulfiram and chlorhexidine were applied to each filter. The non-growing halos caused by the four toxic compounds spotted on *WT*, *Itv1Δ* and *yar1Δ* strains had similar diameters, indicating that the reduced sensitivity to 6AP, GA and GdnHCl of [*PSI*⁺] prion in *Itv1Δ* and *yar1Δ* mutants was not due to a change in membrane permeability.

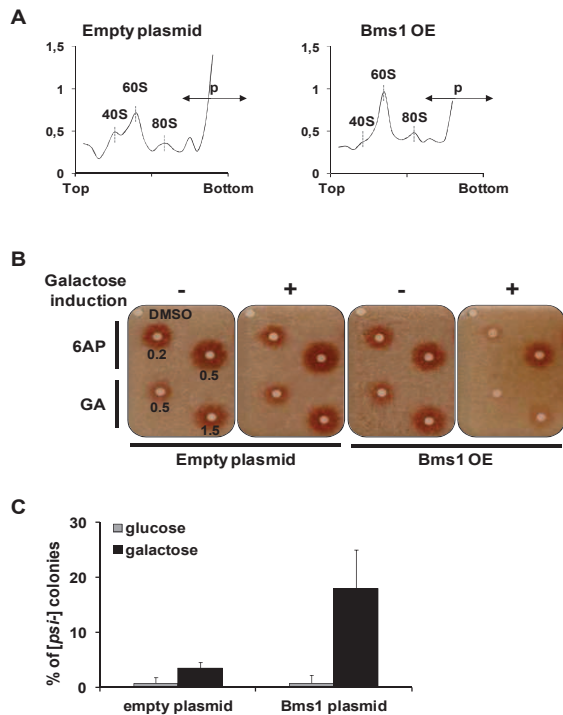


Figure S2. PFAR enrichment induced by Bms1p overexpression reduces $[PSI^+]$ stability. Bms1p overexpression has been shown to result in optimized yields of functional membrane and soluble protein targets (Bonander, Darby et al. 2009). It is an essential nucleolar protein that is evolutionarily conserved throughout the eukaryotic kingdom and has been suggested to have a regulatory role in the biogenesis of the 40S subunit (Wegierski, Billy et al. 2001; Perez-Fernandez, Martin-Marcos et al. 2011). $[PSI^+]$ WT weak strain was transformed either by a plasmid expressing *BMS1* under the control of a Galactose-induced promoter (plasmid 28A6) or by the empty vector p416-GAL1 as a control. **(A)** Polysome profiles of WT $[PSI^+]$ strain transformed by an empty plasmid (left panel) or a plasmid allowing the overexpression of Bms1p (right panel). Cells overexpressing Bms1p display an elevated level of free 60S subunits, as well as an impoverishment in 40S subunits compared to the strain transformed by the empty plasmid. 60S:40S ratio was 1.48 for the WT strain transformed by the empty vector p416-GAL1, and 2.69 for the WT strain overexpressing Bms1p. **(B)** WT $[PSI^+]$ cells transformed by an empty plasmid (left panel) or by the plasmid allowing the overexpression of Bms1p (right panels) were spread on glucose- (-) or 2% galactose-containing medium (+) supplemented with 200 μ M GdnHCl. Small filters were then placed on the agar surface and various amounts of 6AP and GA were applied to each filter, except for the top left filter where DMSO was added (negative control). The size of the red halos is proportional to the efficiency of $[PSI^+]$ cure. **(C)** The stability of $[PSI^+]$ was evaluated by scoring $[psi^-]$ red or sectored colonies issued from $[PSI^+]$ cells on medium containing glucose (grey bars) or galactose (black bars). Averages of three experiments are shown, with error bars.

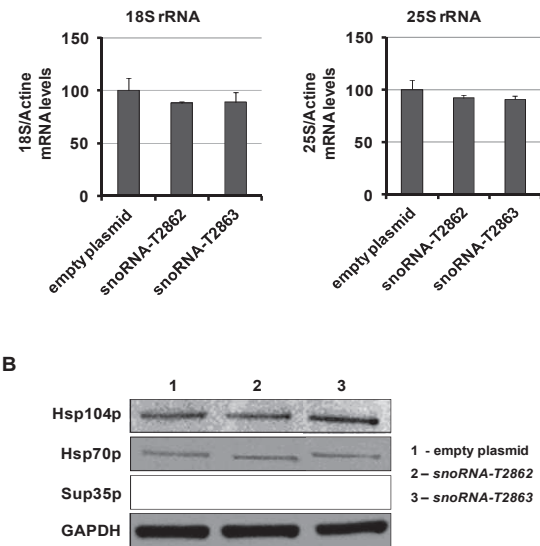


Figure S3. PFAR-snoRNA targeting T2862 nucleotide does not disturb 18S:25S ratio nor protein expression. **(A)** The relative abundance of amplified 18S and 25S mRNA was calculated, using Actin as a control for normalization in WT $[PSI^+]$ cells transformed with an empty vector or plasmids encoding snoRNAs targeting nucleotide T2862 and T2863. **(B)** The quantity of Sup35p and Hsp104p, which expression levels may disturb $[PSI^+]$ propagation, was not modified in cells expressing the PFAR-snoRNA T2862. GAPDH was used as a loading control.

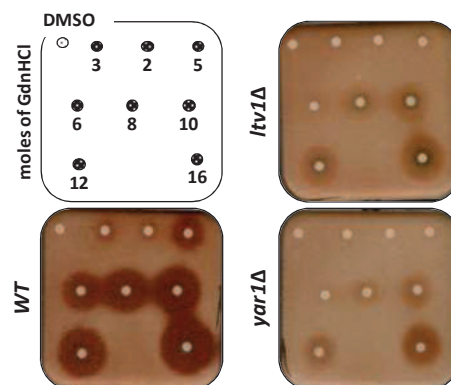


Figure S4. $[PSI^+]$ is less efficiently cured by GdnHCl in PFAR-enriched strains than in the WT strain. $[PSI^+]$ WT, *Itv1Δ* and *yar1Δ* strains were spread on YPD medium. Small filters were then placed on the agar surface and various amounts of GdnHCl were applied to each filter, except for the top left filter where DMSO was added (negative control). The size of the red halos is proportional to the efficiency of $[PSI^+]$ curing.

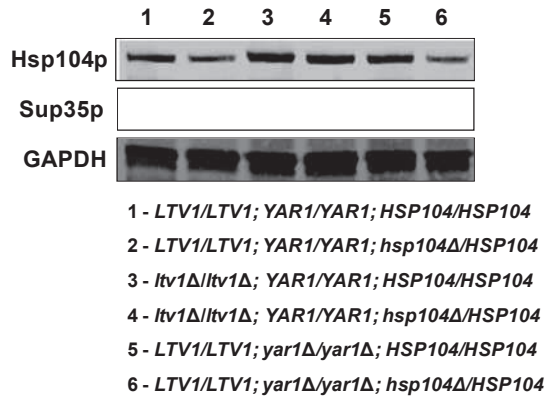


Figure S5. The quantity of Sup35p and Hsp104p, which expression levels may disturb $[PSI^+]$ propagation, was not modified in diploid strains in which 2 copies of *LTV1*, *YAR1* or 1 copy of *HSP104* have been deleted. Lysates of exponentially growing 2n yeast cells were analyzed by SDS-PAGE for the expression of Hsp104p and Sup35p. GAPDH was used as a loading control.

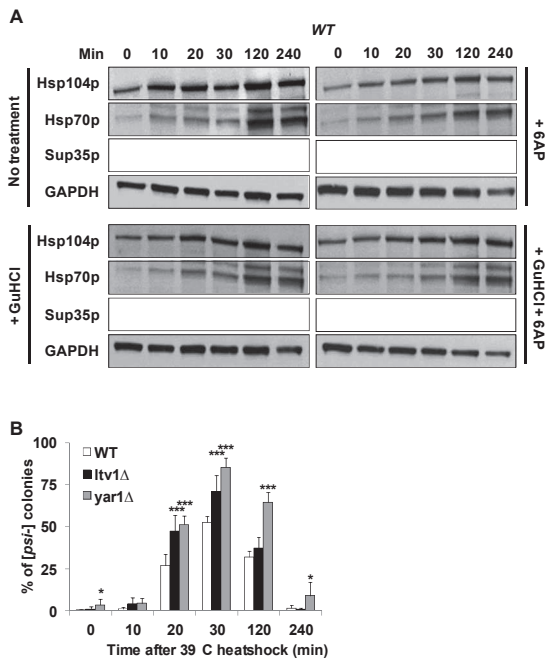


Figure S6. Hsp104p and Hsp70p expression and $[PSI^+]$ stability in heat-shocked cells. *WT* $[PSI^+]$ cells were submitted to a moderate heat shock at 39°C. (A) Cells harvested at indicated times were lysed and proteins were immunoblotted using anti-Hsp104p, anti-Hsp70p, and anti-Sup35p antibodies. Anti-GAPDH antibodies were used to ensure similar loading. These data are representative of 3 different

experiments. (B) Cells harvested at indicated times were spread on YPD medium to score for $[psi^-]$ colonies. The average of three experiments is shown, with error bars.

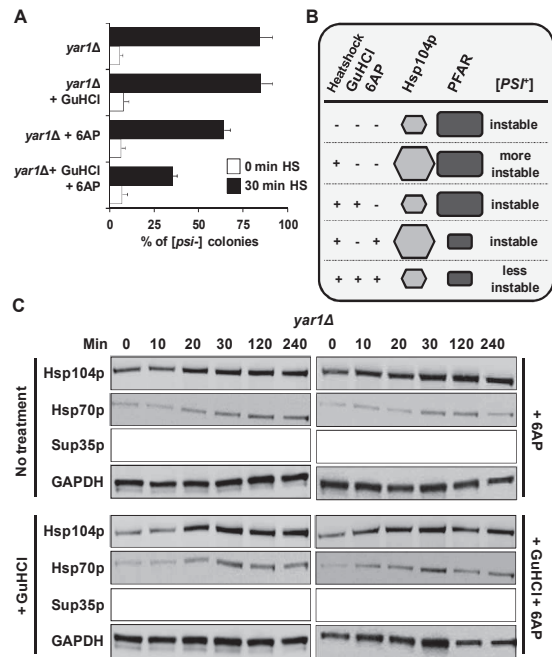


Figure S7. PFAR inhibition compensated $[PSI^+]$ loss in PFAR-enriched *yar1Δ* cells overexpressing Hsp104p. (A) *yar1Δ* $[PSI^+]$ cells were treated by DMSO, 200 μM 6AP for 2 hours, 1 mM GdnHCl for 15 min or by both 200 μM 6AP and 1 mM GdnHCl before being heat-shocked at 39 °C. Aliquots of cells were collected after 30 min, 50 to 100 cells were spread on 10 plates and $[PSI^+]$ stability was evaluated by scoring $[psi^-]$ red or sectorized colonies as a percentage of total cells for DMSO-, 6AP-, GdnHCl-, or 6AP and GdnHCl-treated cells. Averages of three experiments are shown, with error bars. (B) Sketch illustrating the data obtained in the panel A, in the light of the model depicted in Fig. 2D. (C) Cells treated as described in (A) and harvested from 0 to 120 min after heat shock were lysed and proteins were immunoblotted using anti-Hsp104p, anti-Hsp70p, and anti-Sup35p antibodies. Anti-GAPDH antibodies were used to ensure similar loading. These data are representative of 3 different experiments.

REFERENCES

1. Griffith JS (1967) Self-replication and scrapie. (Translated from eng) *Nature* 215(5105):1043-1044 (in eng).
2. Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. (Translated from eng) *Science* 216(4542):136-144 (in eng).
3. Liebman SW & Chernoff YO (2012) Prions in yeast. (Translated from eng) *Genetics* 191(4):1041-1072 (in eng).
4. Reidy M & Masison DC (2011) Modulation and elimination of yeast prions by protein chaperones and co-chaperones. (Translated from eng) *Prion* 5(4):245-249 (in eng).
5. Winkler J, Tyedmers J, Bukau B, & Mogk A (2012) Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. (Translated from eng) *J Struct Biol* 179(2):152-160 (in eng).
6. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, & Lindquist S (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. (Translated from eng) *Nature* 372(6505):475-478 (in eng).
7. Sanchez Y & Lindquist SL (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. (Translated from eng) *Science* 248(4959):1112-1115 (in eng).
8. Wickner RB, et al. (2013) Amyloids and yeast prion biology. (Translated from eng) *Biochemistry* 52(9):1514-1527 (in eng).
9. Cox B, Ness F, & Tuite M (2003) Analysis of the generation and segregation of propagons: entities that propagate the [PSI⁺] prion in yeast. (Translated from eng) *Genetics* 165(1):23-33 (in eng).
10. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, & Kushnirov VV (2003) Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. (Translated from eng) *J Biol Chem* 278(49):49636-49643 (in eng).
11. Ness F, Ferreira P, Cox BS, & Tuite MF (2002) Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 22(15):5593-5605 (in eng).
12. Helsen CW & Glover JR (2012) Insight into molecular basis of curing of [PSI⁺] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104). (Translated from eng) *J Biol Chem* 287(1):542-556 (in eng).
13. Bach S, et al. (2003) Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21(9):1075-1081.
14. Bach S, et al. (2006) A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* 39(1):72-77.
15. Tribouillard-Tanvier D, et al. (2008) Protein folding activity of ribosomal RNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs. *PLoS ONE* 3(5):e2174.
16. Tribouillard-Tanvier D, et al. (2008) Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PLoS ONE* 3(4):e1981.
17. Pang Y, et al. (2013) The antiprion compound 6-Aminophenanthridine inhibits protein folding activity of the ribosome by direct competition. (Translated from Eng) *J Biol Chem* (in Eng).
18. Das D, et al. (2008) Role of the ribosome in protein folding. (Translated from eng) *Biotechnol J* 3(8):999-1009 (in eng).
19. Voisset C, Thuret JY, Tribouillard-Tanvier D, Saupe SJ, & Blondel M (2008) Tools for the study of ribosome-borne protein folding activity. (Translated from eng) *Biotechnol J* 3(8):1033-1040 (in eng).
20. Chattopadhyay S, Das B, & Dasgupta C (1996) Reactivation of denatured proteins by 23S ribosomal RNA: role of domain V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8284-8287.
21. Chattopadhyay S, et al. (1999) Protein folding in *Escherichia coli*: role of 23S ribosomal RNA. *Biochim Biophys Acta* 1429(2):293-298.
22. Das B, Chattopadhyay S, Bera AK, & Dasgupta C (1996) In vitro protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA. *Eur J Biochem* 235(3):613-621.
23. Basu A, et al. (2008) Protein folding following synthesis in vitro and in vivo: association of newly synthesized protein with 50S subunit of *E. coli* ribosome. (Translated from eng) *Biochem Biophys Res Commun* 366(2):592-597 (in eng).
24. Loar JW, et al. (2004) Genetic and biochemical interactions among Yar1, Ltv1 and Rps3 define novel links between environmental stress and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. (Translated from eng) *Genetics* 168(4):1877-1889 (in eng).
25. Seiser RM, et al. (2006) Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. (Translated from eng) *Genetics* 174(2):679-691 (in eng).
26. Bradley ME & Liebman SW (2004) The Sup35 domains required for maintenance of weak, strong or undifferentiated yeast [PSI⁺] prions. (Translated from eng) *Mol Microbiol* 51(6):1649-1659 (in eng).
27. Derkatch IL, et al. (2000) Dependence and independence of [PSI⁺] and [PIN⁺]: a two-prion system in yeast? (Translated from eng) *EMBO J* 19(9):1942-1952 (in eng).
28. Zhou P, Derkatch IL, & Liebman SW (2001) The relationship between visible intracellular aggregates that appear after overexpression of Sup35 and the yeast prion-like elements [PSI⁺] and [PIN⁺]. (Translated from eng) *Mol Microbiol* 39(1):37-46 (in eng).
29. Bonander N, et al. (2009) Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield. (Translated from eng) *Microb Cell Fact* 8:10 (in eng).
30. Samanta D, et al. (2008) Protein folding by domain V of *Escherichia coli* 23S rRNA: specificity of RNA-protein interactions. (Translated from eng) *J Bacteriol* 190(9):3344-3352 (in eng).
31. Petes TD (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(1):410-414 (in eng).
32. Decatur WA, Liang XH, Piekna-Przybylska D, & Fournier MJ (2007) Identifying effects of snoRNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome. (Translated from eng) *Methods Enzymol* 425:283-316 (in eng).
33. Liu B & Fournier MJ (2004) Interference probing of rRNA with snoRNPs: a novel approach for functional mapping of RNA in vivo. (Translated from eng) *RNA* 10(7):1130-1141 (in eng).
34. Cavaille J, Nicoloso M, & Bachellerie JP (1996) Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides.

- (Translated from eng) *Nature* 383(6602):732-735 (in eng).
35. Liu B, Ni J, & Fournier MJ (2001) Probing RNA in vivo with methylation guide small nucleolar RNAs. (Translated from eng) *Methods* 23(3):276-286 (in eng).
 36. Liu B, Liang XH, Piekna-Przybylska D, Liu Q, & Fournier MJ (2008) Mis-targeted methylation in rRNA can severely impair ribosome synthesis and activity. (Translated from eng) *RNA Biol* 5(4):249-254 (in eng).
 37. Grimminger V, Richter K, Imhof A, Buchner J, & Walter S (2004) The prion curing agent guanidinium chloride specifically inhibits ATP hydrolysis by Hsp104. (Translated from eng) *J Biol Chem* 279(9):7378-7383 (in eng).
 38. Jung G, Jones G, & Masison DC (2002) Amino acid residue 184 of yeast Hsp104 chaperone is critical for prion-curing by guanidine, prion propagation, and thermotolerance. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15):9936-9941 (in eng).
 39. Jung G & Masison DC (2001) Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: a possible explanation for its effect in curing yeast prions. (Translated from eng) *Curr Microbiol* 43(1):7-10 (in eng).
 40. Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN, & Ter-Avanesyan MD (1996) Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. (Translated from eng) *EMBO J* 15(12):3127-3134 (in eng).
 41. Shorter J & Lindquist S (2004) Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. (Translated from eng) *Science* 304(5678):1793-1797 (in eng).
 42. Newnam GP, Birchmore JL, & Chernoff YO (2011) Destabilization and recovery of a yeast prion after mild heat shock. (Translated from eng) *J Mol Biol* 408(3):432-448 (in eng).
 43. Derkatch IL, Chernoff YO, Kushnirov VV, Inge-Vechtomov SG, & Liebman SW (1996) Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. (Translated from eng) *Genetics* 144(4):1375-1386 (in eng).
 44. Dron M, Dandoy-Dron F, Farooq Salamat MK, & Laude H (2009) Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrPSc into aggresomes within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells. (Translated from eng) *J Gen Virol* 90(Pt 8):2050-2060 (in eng).
 45. Voisset C, Saupe SJ, Galons H, & Blondel M (2009) Procedure for identification and characterization of drugs efficient against mammalian prion: from a yeast-based antiprion drug screening assay to in vivo mouse models. (Translated from eng) *Infect Disord Drug Targets* 9(1):31-39 (in eng).
 46. Brundin P, Melki R, & Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. (Translated from eng) *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4):301-307 (in eng).
 47. Frost B & Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. (Translated from eng) *Nat Rev Neurosci* 11(3):155-159 (in eng).
 48. Goedert M, Clavaguera F, & Tolnay M (2010) The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. (Translated from eng) *Trends Neurosci* 33(7):317-325 (in eng).
 49. Barbezier N, et al. (2011) Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. (Translated from eng) *EMBO Mol Med* 3(1):35-49 (in eng).
 50. Gelperin DM, et al. (2005) Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. (Translated from eng) *Genes Dev* 19(23):2816-2826 (in eng).
 51. Patino MM, Liu JJ, Glover JR, & Lindquist S (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. (Translated from eng) *Science* 273(5275):622-626 (in eng).
 52. Chernoff YO, Uptain SM, & Lindquist SL (2002) Analysis of prion factors in yeast. (Translated from eng) *Methods Enzymol* 351:499-538 (in eng).
 53. Ferreira PC, Ness F, Edwards SR, Cox BS, & Tuite MF (2001) The elimination of the yeast [PSI+] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. (Translated from eng) *Mol Microbiol* 40(6):1357-1369 (in eng).

V.2 Identification de nouveaux composés antiprion et de leurs cibles cellulaires

Actuellement, il n'y a pas de traitement efficace contre les maladies à prion qui sont toujours fatales. Le variant de la MCJ peut être accidentellement transmis par transfusion sanguine (Lefrere JJ and Hewitt P 2009), ce qui menace la santé publique lors d'un greffe d'organe, d'une transfusion sanguine etc. Nous avons donc besoin de nouvelles thérapies efficaces contre les maladies à prion et aussi pour comprendre les mécanismes de prionisation.

Le deuxième but de ma thèse est d'identifier de nouveaux composés antiprion. Nous avons utilisé une méthode de criblage *in vivo* basée sur la levure *S. cerevisiae* qui est simple d'utilisation, peu coûteuse et ne nécessite pas de contrainte de sécurité particulière. Le principe de cette stratégie (figure 29) est de chercher, parmi des collections de petites molécules, des composés capables de convertir les colonies blanches [*PRION+*] en colonies rouges [*prion-*], donc potentiellement capables de curer les prions de levure [*PSI+*] et [*URE3*]. Les composés interférant avec le système rapporteur qui rendent les levures rouges sans pour autant avoir une activité antiprion sont éliminés lors d'un test de confirmation. L'activité antiprion des composés nouvellement identifiés est ensuite testée contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo* en culture cellulaire (MovS6) afin d'obtenir des composés agissant à la fois sur les prions de levure et le prion de mammifère PrP^{Sc}. Enfin, les molécules antiprion les plus intéressantes sont sélectionnées pour tester *in vivo* leur activité antiprion dans un modèle murin de maladies à prions (en collaboration avec V. Béringue, INRA Jouy en Josas).

A partir des collections commerciales ou de chimiothèques académiques, nous avons identifiés plusieurs nouveaux composés antiprion. Parmi eux :

- L'Imiquimod (IQ) issu de la chimiothèque Prestwick.
- La Flunarizine issue de la chimiothèque Tebu-bio.

Ces molécules sont actives à la fois contre les prions de levure ([*PSI+*] et [*URE3*]) et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo* et *in vivo* dans un modèle murin de maladies à prion. Cela confirme la conservation de mécanismes de prionisation chez la levure et les mammifères. De plus, leur activité antiprion est liée à l'inhibition

spécifique de PFAR qui est donc une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des maladies à prions.

Les molécules antiprion nouvellement identifiées à partir des chimiothèques sont provisoirement classées en deux catégories selon les résultats obtenus lors de tests complémentaires dans lesquels l'activité antiprion de ces molécules a été évaluée contre le prion [PSI⁺] des souches *WT*, *Itv1Δ* et *yar1Δ* enrichies en PFAR. Le principe est que : une molécule antiprion n'agissant pas contre la PFAR donnerait une activité similaire tant contre le prion [PSI⁺] du *WT* que dans les souches mutantes enrichies en PFAR.

- La première catégorie de molécules est donc composée des molécules antiprion dont la cible d'action n'est vraisemblablement pas l'activité PFAR. ces composés seront intéressants pour l'identification de nouveaux acteurs cellulaires impliqués dans les mécanismes de prionisation.
- La deuxième catégorie regroupe des composés antiprion qui ont une forte chance d'agir sur la PFAR. Ces molécules sont utilisées pour les études Structure-Activité afin de trouver des molécules possédant des activités biologiques plus intéressantes (meilleure activité, faible toxicité, effet indésirable éliminé..).

En parallèle, nous avons effectué des études de RSA autour du GA et de la 6P, qui ont été antérieurement isolées (Tribouillard-Tanvier et al. 2008), afin d'identifier des molécules antiprion plus intéressantes. Les études sur les molécules antiprion sont réalisées en collaboration avec :

- H. Galons (Paris) et F. Bihel (Strasbourg) pour les études structure-activité
- S. Sanyal et Y. Pang (Uppsala, Suède) pour l'analyse de l'activité anti-PFAR des composés identifiés.

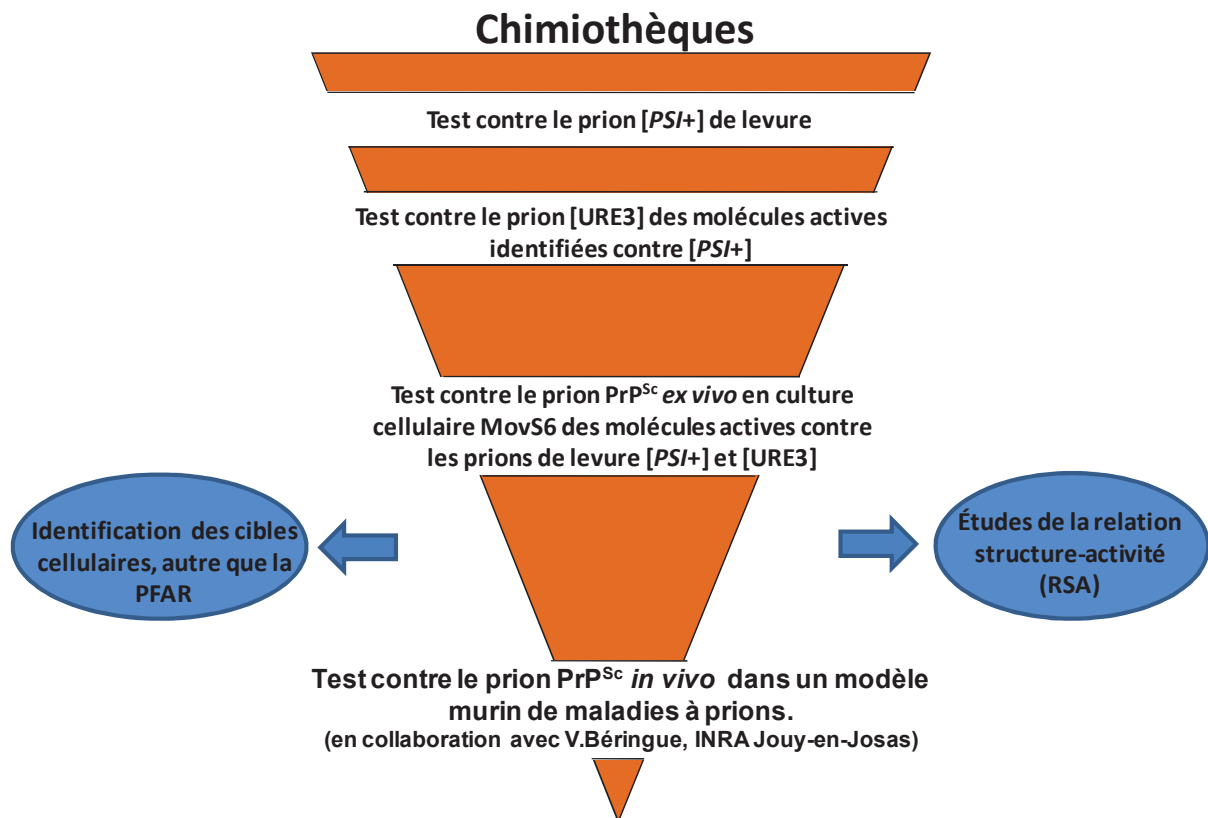


Figure 29. Stratégie d'identification de nouveaux composés antiprion à partir de chimiothèques.

V.2.1 Imiquimod, un agoniste du récepteur Toll-like 7, est actif contre les prions

L'Imiquimod (IQ), un agoniste du récepteur Toll-like 7 (TLR7), est utilisé comme médicament dans le traitement des maladies cutanées telles que les verrues au niveau des zones génitales et anales (Schofer H 2007). L'IQ n'agit pas directement sur les virus causant les verrues mais par l'activation de la réponse immunitaire innée via la stimulation de TLR7 (Torres, Storey et al. 2007). Il est également utilisé pour traiter une affection de la peau du visage et du cuir chevelu appelée kératose actinique et contre certains types de cancers de la peau : les carcinomes basocellulaires superficiels (Lacarrubba, Potenza et al. 2011; Serra-Guillen, Nagore et al. 2012). Nous avons montré que l'IQ est également active contre les prions de levure et de mammifère. L'IQ a été identifiée lors du criblage de la chimiothèque Prestwick réalisé par Nathalie Desban. L'IQ possède une forte activité antiprion contre les deux prions de levure [PSI+] et [URE3], ce qui se traduit par la capacité à

convertir les colonies blanches [*PRION+*] en colonies rouges [*prion-*] dans un criblage colorimétrique (figure 1B, article 2). Nous avons vérifié que le changement de couleur de blanche en rouge est bien causé par l'activité antiprion de l'IQ et non par interférence avec le système colorimétrique de l'essai (figure S1, article 2). L'activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} de l'IQ a également été évaluée *ex vivo* en culture de cellule MovS6. Après 6 jours de traitement des cellules MovS6 infectées par le prion, PrP^{Sc} est détectée par sa résistance à la protéinase K. Par ailleurs, nous avons vérifié que l'IQ ne diminue pas la quantité de PrP totale mais est capable d'éliminer la PrP^{Sc} avec une IC₅₀ de 5 µM (figure 1C, article 2).

Nous avons ensuite évalué l'activité antiprion de l'IQ *in vivo* dans un modèle murin de maladies à prions en collaboration avec Vincent Béringue (INRA Jouy Josas). Pour cela, les souris transgéniques exprimant la PrP ovine (tgOv) ont été utilisées. Deux groupes de douze souris ont été traités par l'IQ ou le DMSO (contrôle). 30 minutes après avoir été infectées par le prion (souche 127S) par inoculation intrapéritonéale, les souris sont quotidiennement injectées par du DMSO ou par 25 mg/kg d'IQ 6 jours par semaine pendant 30 jours, puis tous les 3 jours jusqu'à l'apparition des premiers signes cliniques dans le groupe contrôle. A ce moment là, le traitement est arrêté. L'IQ a un effet bénéfique sur les souris infectées par le prion : Il augmente de 10% le temps de survie en comparaison au groupe contrôle (figure 2A, article 2). Le niveau de PrP^{Sc} dans la rate des souris traitées par l'IQ reste inchangé à 56 jours et à la fin du traitement (figure 2B et 2C, article 2), ce qui suggère que l'IQ pourrait retarder l'invasion neuronale du prion 127S.

L'équipe d'Hervé Galons (Université Paris Descartes) a mis au point une nouvelle voie de synthèse de l'IQ qui permet la synthèse de nouveaux dérivés jusqu'alors difficiles à obtenir (figure 3, article 2). Ces dérivés originaux de l'IQ qui ont été synthétisés puis testés pour leur activité antiprion contre les prions de levure ainsi que contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo* en culture cellulaire (MovS6). Cette étude de la relation structure-activité de l'IQ a permis d'identifier quatre composés actifs (4b, 4c, 8a et 8b) ainsi qu'un dérivé inactif (4d) (figure 4, article 2). Nous remarquons que l'activité de ces dérivés contre les prions de levure est parallèle à celle contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo*. Par exemple, la substitution d'un groupement phényle dans la structure de l'IQ par un groupement pyridine supprime complètement l'activité antiprion (4d). Par contre, l'addition d'un groupement méthyle en position 8 est associée à une légère augmentation de l'activité antiprion (4b),

alors que l'addition d'un chlore à cette position diminue l'activité antiprion (4c et 8b). Ce parallèle de la RSA observée entre le système de levure et de mammifère suggère que ces dérivés ciblent une voie conservée de la prionisation. Nous avons ensuite testé si l'activité antiprion de l'IQ et de ses dérivés actifs est directement associée à leur activité d'agoniste de TLR7/8.

L'activité antiprion de l'IQ n'est pas due à son activité d'agoniste de TLR7

Dans le but de déterminer si l'activité antiprion de l'IQ et de ses dérivés est directement liée à une activité agoniste de TLR7, nous avons d'abord évalué l'activité antiprion potentielle des composés agonistes de TLR7 et TLR8 commerciaux tels que le Gardiquimod, la Loxoribine, le R-848 (agonistes de TLR7), le CL-075 et le CL-097 (agonistes de TLR7/8). Parmi ces cinq composés, seul le CL-075 présente une activité contre les prions de levure [*PS*/+] et [*URE3*] (figure 5, article 2). Le CL-075 et le Gardiquimod sont légèrement actifs contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6). D'autre part, la capacité d'agoniste de TLR7/8 de l'IQ et de ses dérivés a été évaluée. Le composé R-848 a été utilisé comme contrôle positif. Seuls l'IQ, 4as et R-848 ont une activité d'agoniste du TLR7. Par contre, aucun des dérivés de l'IQ synthétisés au cours de cette étude n'est capable de stimuler le TLR8 (figure 5D, article 2). Nous pouvons donc conclure que l'activité antiprion de l'IQ et de ses dérivés n'est pas due à leur activité comme agonistes des récepteurs TLR7/8. De plus, chez la levure *S. cerevisiae*, il n'existe pas de récepteurs de type TLR7, ce qui renforce la conclusion sur la différence entre l'activité antiprion et la capacité d'agoniste des TLR de l'IQ et de ses dérivés.

L'IQ et ses dérivés inhibent spécifiquement l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR)

La structure de l'IQ est proche de celle de la 6AP, le composé antiprion qui cible spécifiquement l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) (Bach 2003). Nous avons montré que l'activité antiprion de l'IQ n'est pas liée à son activité d'agoniste de TLR7. Ainsi, comme la 6AP, son activité antiprion est probablement liée à la capacité de moduler PFAR. En collaboration avec S. Sanyal et Y. Pang (Uppsala, Suède), des expériences de repliement assisté *in vitro* de la protéine

Anhydrase Carbonique humaine (ACh) ont été réalisées pour tester l'activité anti-PFAR de l'IQ. L'ACh dénaturée est diluée dans du tampon en absence ou en présence de ribosome 70S d'*E. coli*, ce qui permet son repliement assisté. Le repliement de l'ACh dénaturée est évalué par la réapparition de son activité enzymatique. L'ACh dénaturée est capable d'auto-repliement, ce qui restaure environ 25% de son activité initiale. Grâce à la PFAR portée par le ribosome d'*E. coli*, l'ACh peut récupérer jusqu'à 55% de son activité initiale. En présence de l'IQ ou de son dérivé actif 4b, le repliement des protéines assisté par la PFAR est inhibé (figure 6A et 6B, article 2). De plus, aucun de ces composés n'affecte l'auto-repliement de l'ACh (figure 6C, article 2). En outre, le composé 4d, inactif contre les prions, n'inhibe pas la PFAR. Enfin, l'IQ et le composé 4b n'inhibent pas la fonction peptidyl transferase qui est responsable de la synthèse de protéine du ribosome, contrairement à la cycloheximide, un inhibiteur connu de la traduction (figure 6D, article 2). L'IQ et son dérivé 4b inhibent donc spécifiquement l'activité chaperon de protéines du ribosome et cette inhibition est strictement parallèle avec leur capacité à inhiber les prions de levure et de mammifères.

Ce travail fait l'objet de l'article 2: « **The Toll-like receptor agonist imiquimod is active against prions.** Oumata N, Nguyen P.H, Beringue V, Soubigou F, Pang Y, Desban N, Massacrier C, Morel Y, Paturol C, Contesse M.A, Bouaziz S, Sanyal S, Galons H, Blondel M and Voisset C. PLoS ONE, August 2013, volume 8, issue 8, e72112.

The Toll-Like Receptor Agonist Imiquimod Is Active against Prions

Nassima Oumata^{1¶}, Phu hai Nguyen^{2¶}, Vincent Beringue³, Flavie Soubigou², Yanhong Pang⁴, Nathalie Desban⁵, Catherine Massacrier⁶, Yannis Morel⁶, Carine Paturel⁶, Marie-Astrid Contesse², Serge Bouaziz⁷, Suparna Sanyal⁴, Hervé Galons¹, Marc Blondel^{2¶}, Cécile Voisset^{2¶}

1 Laboratoire de Chimie Organique 2, INSERM U1022, Université Paris Descartes, Paris, France, **2** Institut National de la Santé et de la recherche Médicale UMR1078, Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé ; Etablissement Français du Sang (EFS) Bretagne ; CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Brest, France, **3** Virologie Immunologie Moléculaires, UR992, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France, **4** Department of Cell and Molecular Biology, BMC, Uppsala University, Uppsala, Sweden, **5** Protein Phosphorylation & Disease Laboratory, CNRS UPS2682, Roscoff, France, **6** Innate Pharma, Marseille, France, **7** UMR 8015 CNRS, Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France

Abstract

Using a yeast-based assay, a previously unsuspected anti-prion activity was found for imiquimod (IQ), a potent Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist already used for clinical applications. The anti-prion activity of IQ was first detected against yeast prions [*PSI*⁺] and [URE3], and then against mammalian prion both *ex vivo* in a cell-based assay and *in vivo* in a transgenic mouse model for prion diseases. In order to facilitate structure-activity relationship studies, we conducted a new synthetic pathway which provides a more efficient means of producing new IQ chemical derivatives, the activity of which was tested against both yeast and mammalian prions. The comparable anti-prion activity of IQ and its chemical derivatives in the above life forms further emphasizes the conservation of prion controlling mechanisms throughout evolution. Interestingly, this study also demonstrated that the anti-prion activity of IQ and IQ-derived compounds is independent from their ability to stimulate TLRs. Furthermore, we found that IQ and its active chemical derivatives inhibit the protein folding activity of the ribosome (PFAR) *in vitro*.

Citation: Oumata N, Nguyen Ph, Beringue V, Soubigou F, Pang Y, et al. (2013) The Toll-Like Receptor Agonist Imiquimod Is Active against Prions. PLoS ONE 8(8): e72112. doi:10.1371/journal.pone.0072112

Editor: Ilia V Baskakov, University of Maryland School of Medicine, United States of America

Received: June 4, 2013; **Accepted:** July 11, 2013; **Published:** August 16, 2013

Copyright: © 2013 Oumata et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by an Agence Nationale de la Recherche "blanche" from the French government, a Contrat Jeune Chercheur from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the SSF-Dalen (Sweden-France Bilateral Collaboration) Program (to MB & SS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: CM, YM and CP are or were employed by Innate Pharma. The authors' collaboration with Innate Pharma was based on their expertise on agonists of TLR7/8 receptors, and so the authors acknowledge their scientific and technical contributions by adding their names to the author list. There are no patents, products in development or marketed products with Innate Pharma to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: cecile.voisset@univ-brest.fr (CV); marc.blondel@univ-brest.fr (MB)

¶ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Prions are infectious agents that have been affecting human and animal health for centuries. Prion diseases, also named transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are invariably fatal and no treatment is currently available. Today, the ability of the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease to be transmitted by blood transfusion is well documented [1]. In face of potential new TSE outbreaks due to this or other secondary infection routes [2], our current therapeutics are limited. More efficient therapies are urgently needed.

As a result of the life span increase, age-related neurodegenerative diseases impose a considerable burden on our societies. Many such diseases are proteinopathies, defined as conditions in which accumulation of a protein in a misfolded form leads to neuronal degeneration. The misfolded proteins present in these neurodegenerative diseases as well as in related systemic (non-neuronal) diseases, assemble into highly ordered supramolecular assemblies called amyloids. Amyloids are partially resistant to proteolytic degradation and can template the further recruitment of protein or peptide monomers into the polymers. These templating abilities are reminiscent of those of prion diseases and suggest that

propagation of neurodegenerative disorders may occur in a "prion-like" manner through mechanisms similar to those that underlie prion pathogenesis [3–8]. A better understanding of the mechanisms of prion propagation is therefore crucial for the development of therapeutic strategies to prevent the propagation of misfolded proteins in the brain and in other organs.

Our previous studies have detected compounds active against yeast and mammalian prions [9–12]. Briefly, compounds from chemical libraries have been tested for their ability to cure primarily [PSI⁺] (primary screening) and then [URE3] (secondary screening) yeast prions. Compounds displaying an antiprion activity against both [PSI⁺] and [URE3] yeast prions have been further tested for their ability to clear pathogenic mammalian prion protein PrP^{Sc} in a cell-based assay using chronically prion infected MovS6 cells [12,13]. Drugs that have a potent antiprion activity in both yeast- and *ex vivo* cell-based assays, and that display a limited or no toxicity *ex vivo*, have then been tested *in vivo* in a mouse model for prion-based diseases. These compounds have also been used to characterize their cellular targets [11]. The initial steps of the screening strategy are based on two yeast prions that are related neither in sequence nor function and have no link with PrP. Thus, isolated compounds active against yeast and mammalian prions should most probably target cellular prionisation mechanisms and not the prion proteins themselves. We have indeed isolated compounds able to inhibit prion propagation in both yeast and mammalian systems [9–12], indicating that at least part of prionisation mechanisms are preserved from yeast to mammals. Thus, the use of such a screening process as a complement to animal-based models is highly fruitful and has been successfully used for other pathologies [14]. This screening procedure has allowed the identification of two active drugs, 6-aminophenanthridine (6AP) and Guanabenz (GA), that have proven to be valuable tools to identify a novel cellular mechanism potentially involved in the prion replication cycle, i.e. the protein folding activity of the ribosome (PFAR, [11,13,15,16]).

Here, by testing a library of drugs already on the market, we found Imiquimod (IQ), a potent Toll-like receptor agonist, to be active against both yeast and mammalian prions. We also set up a new and efficient synthesis pathway of IQ to ease its production and to initiate the synthesis of its new derivatives so far difficult to produce. The antiprion activity of prepared IQ chemical derivatives as well as other TLR7/8 agonists such as gardiquimod was evaluated against yeast and mammalian prions. The potential of IQ chemical derivatives to stimulate TLR7/8 was also assessed. These observations revealed that antiprion activity of the tested compounds do not overlap with their agonist activity on TLR7/8 receptors. Furthermore, we found that IQ and its chemical derivatives, acting as antiprions, were specific inhibitors of the protein folding activity of the ribosome, in addition to the already known TLR7 agonist activity of IQ.

Results and Discussion

Imiquimod is active against yeast and mammalian prions

In order to identify new antiprion compounds, we used the yeast-based screening method we previously described [9,10]. Briefly, [PSI⁺] or [URE3] yeast cells were spread on Petri dishes containing solid agar-based rich medium. Compounds were loaded onto individual filters placed on top of agar surface and dishes were further incubated for three days at 25°C. [PSI⁺] or [URE3] yeast strains form white colonies. Upon the addition of the compound to the filter, compound's antiprion activity was detected readily and rapidly when a halo of red [psi⁺] or [ure3-0] colonies appeared around the filter. The strength of this method lies on its ability to produce in one simple step, a full gradient of the compounds from active at sub-toxic concentrations to toxic at high concentrations. The BIOMOL's FDA Approved Drug Library was chosen because it allows drug repositioning. Twelve positive compounds active against [PSI⁺] and [URE3] yeast prions were identified, among which some compounds have previously been described for their antiprion activity, e.g. guanabenz [16] and amiodarone [17]. One of the original hits identified was Imiquimod (1-*iso*-butyl-1H-imidazo[4,5-*c*] quinolin-4-amine, IQ, Figure 1A). IQ has potent antiviral and antitumor properties and is used in a large diversity of cutaneous diseases like warts on the skin of the genital and anal areas [18], and is also used to treat actinic keratoses, a skin condition of the face and scalp, and superficial basal cell carcinoma a type of skin cancer [19,20]. IQ does not show a direct activity against the viruses that cause warts [21]. It appears to act via activation of the local innate immune response, through Toll-like receptor 7 (TLR7) stimulation. However its precise molecular mechanism of action remains unclear [22]. IQ displayed a strong activity against [PSI⁺] prion, and was also active against [URE3] yeast prion (Figure 1B). Then we verified whether IQ was readily curing [PSI⁺] and [URE3] prions and did not interfere with the colorimetric assay [10]. For that purpose, cells from red halos, induced by IQ loading, were streaked onto drug-free YPD medium. They mainly formed red colonies, which emphasized IQ is readily able to eliminate [PSI⁺] and [URE3] yeast prions, similar to the GuHCl positive control (Figure S1A).

IQ was then tested for its ability to clear PrP^{Sc} in the mammalian MovS6 cell-based assay [23]. MovS6 cells are murine peripheral neuroglial cell line expressing the ovine PrP gene under the control of its endogenous promoter. These cells are chronically infected by the 127S sheep scrapie prion [23,24] and therefore allows rapid *ex vivo* testing of molecules against mammalian prions. After 6 days of treatment of prion-infected MovS6 cells with a 0 to 20 μM range of concentration of IQ, PrP^{Sc} was detected on the basis of its proteinase K (PK) resistance. For this purpose, a fraction of cell lysates was treated by PK to discriminate PrP^{Sc} proteins, i.e. partially resistant to PK treatment, from total proteins (PrP^{tot}). PK treated and untreated cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunostained using specific anti-PrP antibodies. Upon IQ treatment, PrP^{Sc} band intensity was greatly reduced, in a dose-dependent manner, with an IC₅₀ around 5 μM (Figure

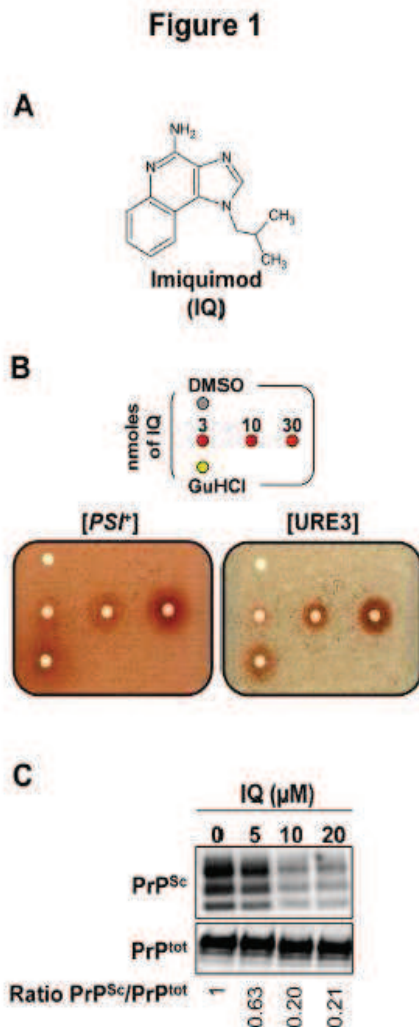


Figure 1. Imiquimod (IQ) is active against both yeast and mammalian prions. **A.** Molecular structure of IQ. **B.** *[PSI⁺]* (left panel) and *[URE3]* (right panel) strains were spread on YPD medium supplemented with 200 and 800 μM GuHCl, respectively. Small filters were then placed on the agar surface and increasing amounts of IQ were applied to each filter, except for the top left filter where DMSO, the compounds vehicle was added (negative control) and for the bottom left filter where GuHCl was added (positive control). The apparition of a halo of red colonies around a filter indicates that a compound active against *[PSI⁺]* or *[URE3]* prions has been spotted, whereas colonies remain white in case of inactive compounds. **C.** Scrapie-infected MovS6 cells were treated for six days with increasing amounts of IQ and then lysed. Cell lysates were then subjected to PK digestion to specifically reveal PrP^{Sc} by immunoblot. The effect of IQ on the steady-state level of PrP (PrP^{tot}) was determined on the same MovS6-treated cell lysates in the absence of PK treatment (lower panel). Ratios of Western blot PrP^{Sc}/PrP^{tot} signals are indicated below each lane. The blot shown is representative of three independent experiments which all produced similar results.

doi:10.1371/journal.pone.0072112.g001

1C, upper panel). On the contrary, the basal level of PrP^{tot} (PrP^C + PrP^{Sc}) from cell lysates not treated by PK remained unchanged upon IQ treatment (Figure 1C, lower panel), indicating that IQ does not act by decreasing the basal level of PrP.

Activity of IQ in a Mouse Model for Prion Diseases

We next evaluated the antiprion activity of IQ *in vivo* in a mouse model for prion disease. IQ has been authorized for topical use as the lesions treated are external and bounded, but several *in vivo* trials have previously been performed on various animal species in which IQ exhibited only moderate toxicity (reviewed in 25). To evaluate the *in vivo* potential of IQ against prions, we used transgenic mice expressing ovine PrP [26]. 30 min after the onset of intraperitoneal inoculation of prions, 12 mice were intraperitoneally injected with DMSO (control group) and 12 mice were injected with 25 mg/kg of IQ solubilised in DMSO (IQ group). Mice were then treated 6 days per week for 30 days and then every 3 days from day 31 at the same dose. Mice from both groups were treated until the appearance of the first clinical signs in mice from the control group at day 90, at which time treatment was stopped for mice of both groups. The effect of IQ on mice survival time was assessed on 9 mice per group, as 3 mice from both group were euthanized when still healthy at mid-infection (at 56 days post-inoculation, Figure 2B) for further analysis of the PrP^{Sc} content of the spleen. IQ treatment was beneficial compared to DMSO treatment, as the mean survival time of the IQ group mice increased by approximately 10%, with a good statistical significance of the difference observed between the two types of regimen (9 mice per group, $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test; Figure 2A). This effect is quite noticeable given the negative results obtained following treatment of mice with quinacrine (QC) and chlorpromazine (CPZ), two compounds already used for treatment of malaria and psychotic disorders, respectively. Indeed, despite being active against mammalian prion in cell-based assays, QC and CPZ turned out to be inactive both in mouse models for prion diseases and in patients in compassionate treatments of CJD [27,28]. IQ thus presents a significant effect on the survival time of Tg338 mice, an animal model that might be difficult to cure, due to the high infectious load inoculated and to the high level of expression of PrP. We expect that IQ effects should be more noticeable in a less stringent model [29]. PrP^{Sc} accumulation in the spleen was assessed in mice euthanized at mid-infection (3 mice per group) (Figure 2B) and at terminal stage (4 mice per group) (Figure 2C) [26]. IQ did not affect significantly spleen PrP^{Sc} level, although it showed a beneficial effect on mouse survival, suggesting that IQ may delay 127S prion neuroinvasion phase. Hence, this study suggests a potential novel therapeutic indication of imidazoquinolines compounds such as IQ for the treatment of prion-based diseases in mammals, including humans.

A new synthesis pathway for IQ and its chemical derivatives

IQ belongs to the imidazoquinolines class of bioactive compounds. It is commercialized under different brand names

Figure 2

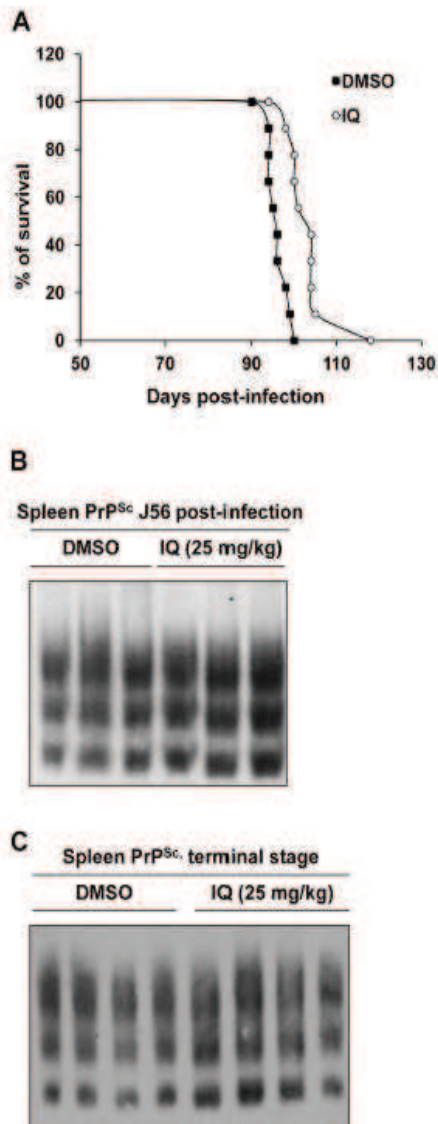


Figure 2. IQ extends survival time in a mouse model for prion diseases. Transgenic mice overexpressing ovine PrP were intraperitoneally infected with scrapie. 12 mice were treated with DMSO (control group) and 12 mice were treated with IQ solubilised in DMSO (IQ group) until the appearance of the first clinical signs in mice from the control group at day 90. **A.** Survival time of mice treated with DMSO (control group) or mice treated with IQ (IQ group). **B, C.** Effects of IQ on PrP^{Sc} accumulation in scrapie-infected mouse spleens. The spleen of 3 mice euthanized at 56 days post-inoculation (**B**) and the spleen of 4 mice euthanized at terminal stage (**C**) from both control and IQ groups were analyzed for PrP^{Sc} content. The PrP^{Sc} content of spleens was determined by Western blot. The same amount of spleen tissue proteins was loaded on each well.

doi: 10.1371/journal.pone.0072112.g002

(Aldara®, Zyclara® and Beselna®). The imiquimod series continues to be the subject of intensive drug discovery studies in regard to the broad therapeutic potencies of immune enhancers. IQ contains an imidazoquinoline moiety which is found in other biologically active compounds such as modulators of the A3 adenosine receptor [30] and anticancer drugs used for the treatment of melanomas [31]. IQ analogues such as Gardiquimod, R-848 and Loxoribine have recently entered clinical trials. Several routes to synthesize IQ have been previously reported and patented. The simplest one was proposed by V. Nakkada [32]. Briefly, the process consisted of heating of 4-chloro-1-isobutyl-1H-imidazole[4,5-c] quinoline with formamide. In most of the previously described methods, the imidazole ring is formed during the last steps of the process precursored by quinolines derivatives. In the presented method, the central pyridine ring of the tricyclic system is formed during the last step. This new simple synthesis route allows to obtain IQ and other aminoimidazoquinolines, as well as structurally related amino pyrazoloquinoline by allowing a Suzuki-Miyaura coupling between a 2-aminoarylboronic ester and a iodoimidoimidazole (Figure 3). The biaryl intermediate was easily converted into a tricyclic aromatic compound under basic conditions. This method, a model for short synthesis pathway of IQ (Figure 3A), was further extended to pyrazoloquinolines (Figure 3B). The cyanoaminoimidazole **1** was obtained using a known procedure [33]: Aminomalononitrile was reacted with triethylformate followed by the addition of iso-butylamine (Figure 3A). In the second step, the iodination was achieved using diiodomethane containing *iso*-amylnitrite (*iso*-pentylnitrite) leading to iodoimidazonitrile **2** (Figure 3A). The Suzuki coupling was then performed under classical reaction conditions using ortho-aminoboronic acid to obtain biarylaminonitriles **3**. Several approaches were investigated for the final cyclisation step. It was efficiently achieved upon heating sodium amide in toluene. The final compounds **4** could be isolated as free bases or hydrochlorides salts (Figure 3A). The same approach was also used for the synthesis of the previously unknown amino pyrazoloquinolines. Aminopyrazolonitrile **5** can be efficiently prepared by the reaction of hydrazines with ethoxymethylene aminonitrile (Figure 3B). They were converted into the corresponding iodo pyrazolonitrile **6** under the same conditions as for the synthesis of **3**. The coupling of **6** with 2-aminoboronic ester led to the intermediate biaryl **7** which was then converted into aminopyrazolo[4,3-c] quinolines. The new synthesis pathway described here now allows easy synthesis of IQ and efficient synthesis of IQ derivatives to date hard to achieve.

Activity of chemical derivatives of IQ

The new synthesis pathway described above enabled the production of a first set of IQ chemical derivatives, i.e. a first corpus of structure-activity relationship (SAR). The five original chemical derivatives of IQ obtained (Figure 4A) were tested against both yeast and mammalian prions using respectively the yeast-based ([PS^h] and [URE3] prions) and MovS6-based assays described above (Figure 4B & 4C). We also checked that the red halos induced by IQ's chemical derivatives corresponded to [PS^h] and [URE3] cured cells (Figure S1B).

Figure 3

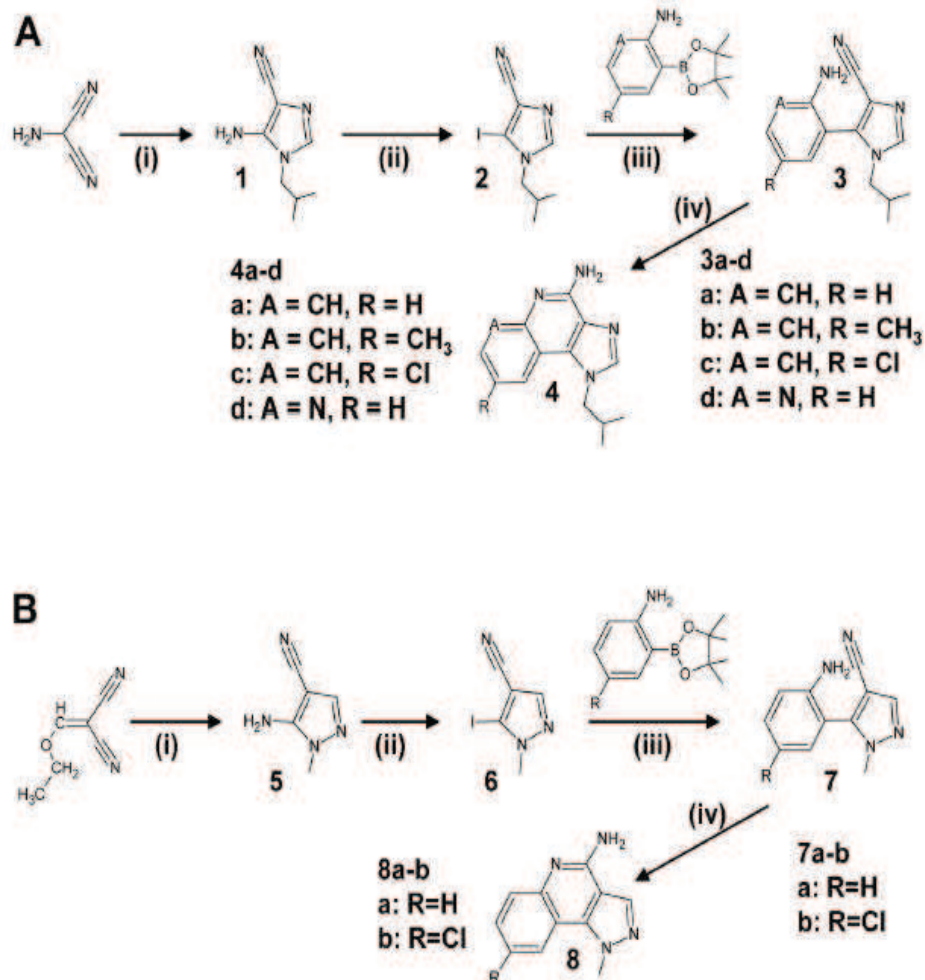


Figure 3. Reagents and conditions for the preparation of IQ and its chemical derivatives. A. (i) Step 1: CH(OEt)₃, CH₃CN 30 min reflux; Step 2: (*iso*-butylamine) 12h 20°C; (ii) CH₂I₂, *iso*-pentyl nitrite; (iii) 2N Na₂CO₃, Pd[(P(C₆H₅)₃)₄], dioxane; (iv) NaNH₂, toluene, 2h at 80 °C. B. (i) CH₃NHNH₂, NEt₃, THF, 60 °C; (ii) CH₂I₂, *iso*-pentyl nitrite; (iii) 2N Na₂CO₃, Pd[(P(C₆H₅)₃)₄], dioxane, 80 °C; (iv) NaNH₂, toluene.

doi: 10.1371/journal.pone.0072112.g003

This structure/activity relationship study allowed the identification of four active (**4b**, **4c**, **8a**, **8b**) as well as one inactive (**4d**) derivatives which constitutes a valuable negative control (Figure 4B & 4C). Interestingly, activity of the various derivatives of IQ in the Mov56 cell-based assay paralleled their activity against yeast prions. For example, the replacement of a phenyl or substitution of phenyl by a pyridine completely abolished the antiprion activity (**4d**) whereas a methyl in position 8 was associated with a slight increase of antiprion activity (**4b**) (Figure 4B & 4C). On the contrary, a chlorine group in the same position slightly reduced the antiprion activity

of the bioactive compounds (**4c** & **8b**). These parallels in SAR in both yeast and mammalian cells strongly support the idea that these drugs target a conserved pathway.

Antiprion activity of IQ does not involve its agonist activity on Toll-like receptors 7/8

In order to determine if the antiprion activity of IQ and its chemical derivatives could be linked to their agonist activity on Toll-like receptors (TLRs), we first tested the potential antiprion activity of commercially available TLR7 and TLR8 agonists

Figure 4

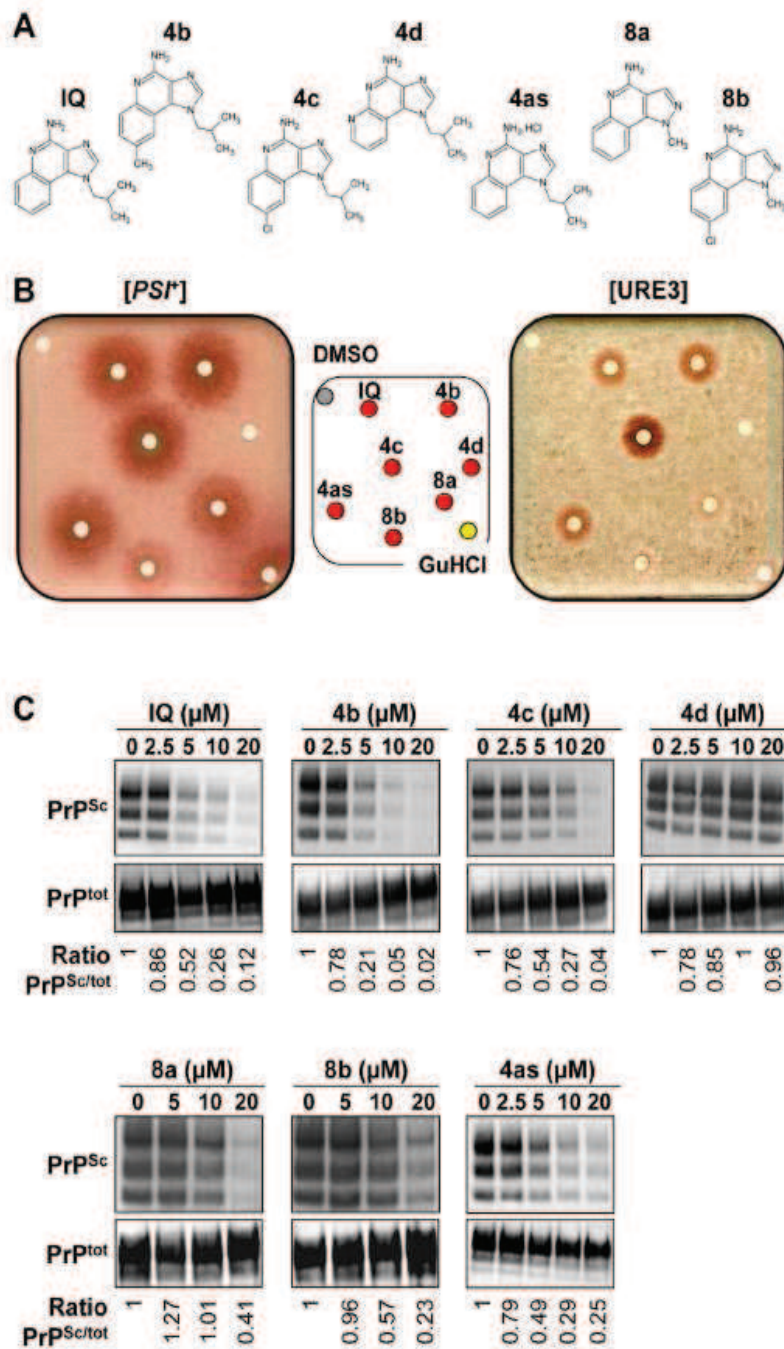


Figure 4. Activity of the chemical derivatives of IQ. **A.** Chemical structures of the 5 derivatives of IQ. **4as** corresponds to the hydrochloride of IQ. **B.** STRg6 [*PSI*⁺] and SB34 [*URE3*] strains were spread on YPD medium supplemented with 200 and 800 μM GuHCl, respectively. 50 nmol of IQ and of its 5 chemical derivatives were spotted on filters as described in Figure 1B. The top left filter correspond to DMSO and the bottom right filter was spotted with GuHCl (positive control). **C.** Activity of IQ and its chemical derivatives against PrP^{Sc} in the MovS6 cell-based system described in Figure 1C. Ratios of Western blot PrP^{Sc}/PrP^{tot} signals are indicated below each lane. The blot shown is representative of three independent experiments which all produced similar results.

doi: 10.1371/journal.pone.0072112.g004

which are pharmacologically and chemically close to IQ such as Gardiquimod, Loxoribine and R-848 (TLR7 agonists), and CL-075 and CL-097 (TLR7/8 agonists) (Figure 5A). Indeed, like IQ, these TLR7 or TLR7/8 agonists are used in various preclinical tests to stimulate the innate and acquired immune responses. As shown in Figure 5B, only one of the five TLR7/8 agonists tested, CL-075, exhibited some antiprion activity against both $[PSI^+]$ and $[URE3]$ yeast prions. CL-097 was slightly active only against $[URE3]$. In addition, only Gardiquimod and CL-075 displayed a very modest activity against PrP^{Sc} in MovS6 cells (Figure 5C). Next, the capacity of IQ and its chemical derivatives **4b** and **4c** to activate TLR7 and TLR8 was evaluated. As shown on the left panel of Figure 5D, IQ/**4as** and the TLR7/8 agonist R-848 activated cells through TLR7 whereas **4b**, **4c**, and **4d** had no agonist activities on TLR7. Contrary to R-848, neither IQ nor **4as**, **4b**, **4c**, and **4d** were able to activate TLR8 receptor (Figure 5D, right panel). Thus the antiprion activity of IQ and its chemical derivatives does not parallel their agonist activity on TLR7/8. In addition, the antiprion activity of IQ against *S. cerevisiae* prions cannot be due to its agonist activity on TLR7 since yeast does not contain this type of receptors. Altogether, these results suggest that the antiprion activity of IQ does not involve the same mechanism than the one responsible for its capacity to trigger immune responses.

Recent data suggested that IQ could exert its effect by increasing the level of the opioid growth factor receptor (OGFr) [34]. Our data showed that the antiprion activity of IQ and its chemical derivatives is independent from their ability to stimulate TLRs. This provides another example where IQ's beneficial effects may be independent of its capacity to trigger the innate immune system.

IQ and its chemical derivative **4b inhibit the protein folding activity of the ribosome**

IQ is structurally quite close to 6AP, an antiprion compound we engineered in the course of a structure/activity relationship study we led around phenanthridine [9]. 6AP is a specific inhibitor of the protein folding activity of the ribosome (PFAR), which is an RNA-based activity borne by the domain V of the large rRNA of the large subunit of the ribosome [13,35–39]. This activity of the ribosome is still poorly understood but is preserved throughout evolution, from prokaryotes to eukaryotes. Since IQ antiprion activity is not linked to its TLR7 agonist activity, we wondered if this drug might, like 6AP, modulate PFAR. Human Carbonic Anhydrase (hCA) was used as a substrate for *in vitro* assisted folding experiments. Denatured hCA was diluted in native buffer either alone (to determine self-folding efficiency) or in the presence of preparations of *E. coli* 70S ribosome. The correct refolding of hCA was assessed by following the reappearance of its enzymatic activity in comparison to the native hCA. Self-folding restored about 25% of hCA activity. PFAR borne by *E. coli* ribosomes restored about 55% of hCA activity in the absence or presence of DMSO (Figure 6A). In the presence of IQ and its chemical derivative **4b**, the protein folding activity of 70S ribosomes was greatly inhibited (Figure 6A & 6B) whereas the self-folding of hCA was not affected (Figure 6C). This inhibition

was specific since **4d** compound, which presented no antiprion activity, also showed no inhibition of PFAR (Figure 6A). As the main function of the ribosome is protein synthesis, the effect of IQ and **4b** on translation was also assessed *in vivo* in yeast. None of the tested compounds exhibited a significant effect on global protein synthesis, in contrast with cycloheximide (CHX), a known inhibitor of global translation, which completely inhibited protein synthesis at the tested concentration (Figure 6D). Therefore, at concentrations at which they exhibit antiprion activity, neither IQ nor **4b** affected protein synthesis *in vivo* in yeast whereas, like 6AP [11], they are specific inhibitors of the protein folding activity of the ribosome. Taken together, these results indicate that IQ and **4b** are specific inhibitors of PFAR, and that their ability to inhibit PFAR paralleled their antiprion activity. They also confirm that PFAR might be involved in prion propagation both in yeast and mammals. Our recent data confirm that PFAR is involved in prion propagation in yeast (CV, PN, FS & MB unpublished data). In addition to their potential therapeutic application, 6AP, GA and IQ are currently the sole PFAR specific inhibitors. They can be regarded as precious tools for explaining the biological role of PFAR which has only been partially explored to date, in particular, in prion diseases, and more generally in amyloid-based diseases [13].

Materials and Methods

Yeast strains and culture media

Yeast strains used in this study were STRg6 (74-D694, *Mata*, *erg6::TRP1*, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3Δ200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*, $[PSI^+]$) and SB34 (*Mata*, *erg6::TRP1*, *dal5::ADE2*, *ade2-1*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*, *ura2::HIS*, $[URE3]$) and were grown and used as previously described [9].

Commercially available compounds

BIOMOL's FDA-Approved Drug Library (Enzo Life Sciences) is a collection of 640 FDA-approved molecules all in use in the clinics selected to maximize chemical and pharmacological diversity. The compounds are supplied as 2 mg/ml DMSO solutions. IQ and GuHCl were purchased from Sigma Aldrich. CL-075, CL-097, Gardiquimod and Loxoribine powders were purchased from InvivoGen. R-848 was purchased from IMGEX (1 mg/ml in water).

Yeast-based antiprion screening assay

This assay was performed as previously described [9,10]. Briefly, an aliquot of an exponentially growing culture (340 μ l of 0.55 OD₆₀₀ culture of STRg6 or 170 μ l of 0.55 OD₆₀₀ culture of SB34 strains) was spread homogeneously using sterile glass beads on square plates (12 x 12 cm) containing YPD solid medium supplemented with 200 μ M (for $[PSI^+]$ STRg6 strains) or 800 μ M Guanidine hydrochloride (for SB34 $[URE3]$ strain). Small sterile filters (Thermo-Fisher) were then placed on the agar surface and individual compounds were applied to each filter. DMSO, the vehicle compound, was applied to the top left filter as a negative control, and 10 μ l of 300 mM GuHCl solubilized in DMSO was applied to the bottom right filter as a positive control. 2 μ l of each of the 640 compounds of the

Figure 5

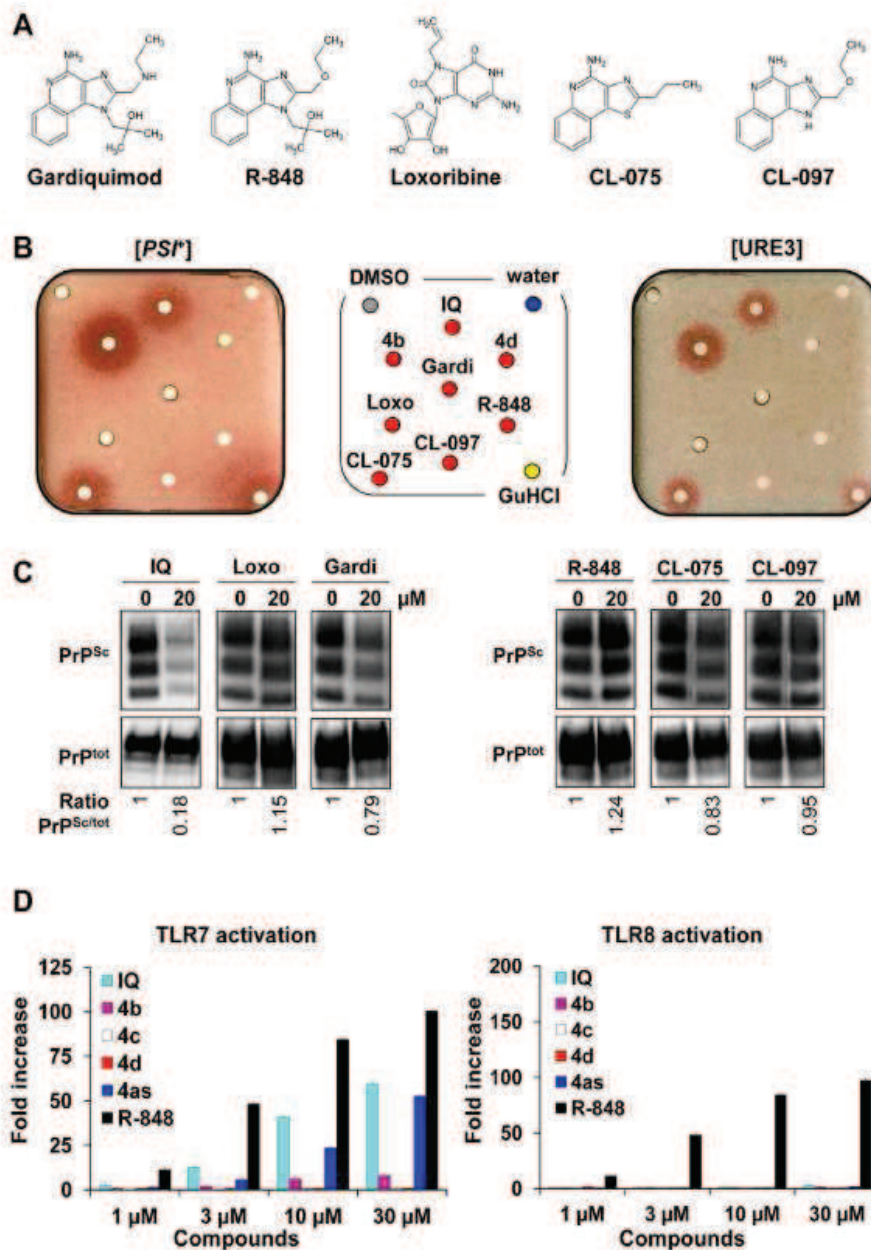


Figure 5. Antiprion activity of some TLR7/8 agonists related to IQ. **A.** Structures of Gardiquimod, R-848, Loxoribine, CL-075 and CL-097, five other known TLR7/8 agonists. **B.** These five TLR7/8 agonists were tested against both [PSI⁺] and [URE3] yeast prions (50 nmoles of compounds per filter, 5 nmoles for CL-075) as described in Figure 1B. **C.** Evaluation of the activity of Gardiquimod (Gardi), R-848, Loxoribine (Loxo), CL-075 and CL-097 against mammalian prion using the MovS6 cell-based assay. Ratios of Western blot PrP^{Sc}/PrP^{tot} signals are indicated below each lane. The blot shown is representative of two independent experiments which all produced similar results. **D.** The potential of IQ chemical derivatives 4b, 4c and 4d as TLR7 (left panel) and TLR8 (right panel) agonists was also evaluated *ex vivo*. Briefly, 293XL-hTLR7 and 293XL-hTLR8 cells transiently transfected with an NF- κ B inducible reporter plasmid were incubated with compounds at indicated concentrations and Luciferase production, which reflects the activation of the receptor, was quantified. Experiments were performed two (TLR8) or three (TLR7) times in duplicates.

doi: 10.1371/journal.pone.0072112.g005

Figure 6

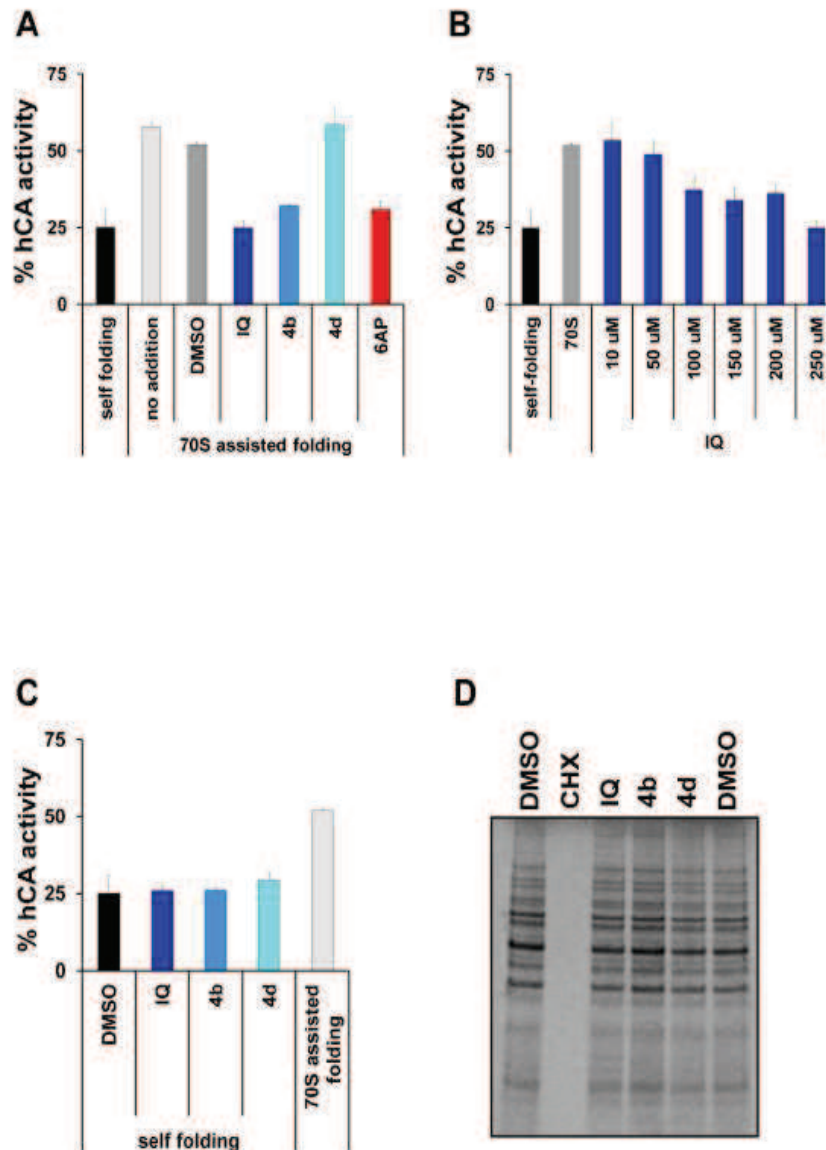


Figure 6. *in vitro* specific anti-PFAR activity of IQ and its chemical derivative 4b. **A.** The effect of the various drugs on ribosome-assisted folding of GuHCl-denatured hCA was evaluated. Correct refolding was assessed by measuring the recovery of hCA enzymatic activity as a function of time in comparison to that of the native enzyme stored undiluted on ice (normalized to 100%). Self-refolding of hCA was about 25%, the refolding with 70S ribosome increased to 55% due to PFAR. In the presence of 250 μ M of IQ and 4b, PFAR was fully inhibited, whereas 250 μ M 4d showed no inhibitory effect. 250 μ M 6AP was used as a positive control [11]. **B.** IQ inhibits PFAR in a dose-dependent manner. **C.** IQ and its chemical derivatives (250 μ M) do not affect the self-folding of GuHCl-denatured hCA. **D.** The effect of the indicated compounds (100 μ M) on global *in vivo* translation in living yeast cells was evaluated. Briefly, various drugs or DMSO alone were added to yeast cells in exponential growth in YPD rich medium at a final concentration of 100 μ M. After 20 minutes, radiolabelled [35 S] methionine/cystein was added for 20 minutes. The cells were lysed and analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. Error bars correspond to standard deviations.

doi: 10.1371/journal.pone.0072112.g006

BIOMOL chemical library, or 50 nmoles of IQ chemical derivatives 4b-d, or 50 nmoles of TLR7 and TLR7/8 agonists Gardiquimod, R-848, Loxoribine and CL-097, or 5 nmoles of CL-075 were applied on each of the remaining filters. Plates were then incubated 5 days at 25°C and scanned using a Snap Scan 121s2 (Agfa).

PrP^{Sc} clearance assay in MovS6 cells

Experiments were performed as previously described [23]. Briefly, MovS6 cells chronically infected with ovine 127S prion strain were treated for six days with the indicated concentrations of compounds and then lysed (0.5% Na deoxycholate, 0.5% Triton X-100, 5 mM Tris-HCl pH 7.4). To distinguish between cellular (PrP^C) and pathological forms of PrP^{Sc}, 250 µg of cell lysates were digested by proteinase K (PK) as PrP^{Sc} is partially resistant to proteolysis. The detection of PrP^{Sc} was performed on 25 µg of crude cell lysate. Proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE (Invitrogen) and transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes (Whatman). Membranes were incubated for two hours with 1:40 000 anti-PrP antibody (Sha31, Bertin pharma). The membranes were then washed with fresh PBS 1X / 0.1% Igepal and incubated for 45 min with 1:3000 secondary HRP-conjugated antibodies (Biorad), and analyzed by Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare) using a Vilber-Lourmat Fusion SL image acquisition system which allows precise quantification of the signals.

Ethics Statement

Animal experiments were carried out in strict accordance with EU directive 2010/63 and were approved by the author's institution local ethics committee (Comethea, INRA Agroparitech ethics committee, permit number 12/034). All efforts were made to minimize suffering.

Mouse model for prion-based disease

Experiments were performed as previously described [40]. 24 mice overexpressing ovine PrP (tg338 line [24]) were infected intraperitoneally with 100 µl of the 127S scrapie strain at 0.02% (w/v) dose. This strain has an intracerebral infectious titre of 10⁹ ID₅₀ U/g of brain [24]. 12 mice (IQ group) were then intraperitoneally injected with a dose of 100 µl of 2.5 mg/ml IQ solubilized in 8% DMSO (25 mg/kg) 30 min after 127S injection, and 12 infected mice were intraperitoneally injected with 100 µl of 8% DMSO (control group). Mice were then treated 6 days per week for 30 days and then every 3 days from day 31 at the same dose. The treatment was stopped around day 90 post-infection, when the first symptoms appeared in mice from the control group. Mice were euthanized at terminal stage according to ethics rules. At mid-treatment (56 days post-infection), 3 of 12 mice from both control and IQ groups were euthanized. Spleens were also collected from 4 mice euthanized at terminal stage of disease. Spleens collected at mid-treatment and at terminal stage of disease from euthanized mice were analyzed for PrP^{Sc} content, as previously described [2,16]. Briefly, spleen tissues were homogenized at 20% (w/v) in 5% glucose with a Rylolyser (Hybaid). PrP^{Sc} was extracted according to the Biorad test protocol, by using 200 mg/ml PK for 10 min. at 37°C. After

denaturation in Laemmli buffer, proteins were analyzed by SDS-PAGE (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with 0.1 mg/ml Sha31 anti-PrP antibody. The equivalent of 1 mg of spleen tissue was loaded onto the gels. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence (GE Healthcare).

Chemical Methods

The synthesis methods for the compounds **1**, **2**, **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **5**, **6**, **7a**, **7b**, **8a** and **8b** are described in Methods S1.

¹H-NMR, ¹³C-NMR spectra, IR spectra and microanalyses are available upon request.

TLR7 and TLR8-based assays

293XL-hTLR7 cells and 293XL-hTLR8 cells (Invivogen) were transiently transfected with an NF-κB inducible reporter plasmid (Clontech). On day 0, cells were seeded overnight at 5.10⁵ cells/mL on 6 well plates. On day 1, cells were transfected for 6 hours by pNFκB-luc plasmid using FuGENE® 6 Reagent (Roche) as recommended by the manufacturer. Transfected cells were further incubated overnight at 37°C, followed by a 24h incubation with different compounds at the indicated concentrations. The presence of Luciferase was revealed using Steady Glo Luciferase assay system (Promega). The light emitted by Luciferase activation in each well was quantified as "Count Per Second" (CPS) on a Victor apparatus (Perkin-Elmer). Fold increase was quantified as the ratio between experimental CPS (stimulus) and spontaneous CPS (medium).

Translation assay

A yeast culture grown at 29°C in YPD (OD_{600 nm} = 0.6 in exponential phase of growth) was incubated with the indicated compounds (100 µM) or the corresponding volume of DMSO for 20 min at 29°C at which time [³⁵S] methionine and cysteine were added for 20 min (PerkinElmer Life Sciences). Cells were then harvested and lysed (lysis buffer: 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, antiproteases cocktail (Roche), 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride). Crude extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE (Invitrogen). The gel was dried and analyzed using a Typhoon 9400 Phosphorimager (GE Healthcare).

In vitro ribosome assisted protein folding assay

70S *E. coli* ribosomes were prepared using sucrose gradient zonal ultracentrifugation as described previously [41]. For the *in vitro* refolding experiments described in [15], human Carbonic Anhydrase (hCA) at a concentration of 30 µM was denatured by an overnight treatment at room temperature with 6 M GuHCl and 30 nM EDTA. To allow refolding, hCA was diluted 100 times at a final concentration of 300 nM in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl and 5 mM magnesium acetate for 30 min with or without 70S ribosomes at a final concentration of 300 nM, in the absence or presence of compounds. The refolding of hCA, as a function of the native enzyme activity (normalized to 100%), was followed by a colorimetric assay measuring the increase of OD₂₀₀ with time

when hCA substrate, para-nitrophenyl acetate (pNPA), was added directly to the refolding mix at a final concentration of 500 μ M. To check if drugs may affect hCA self-folding, denatured hCA was diluted 100 times at a final concentration of 300 nM in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl and 5 mM magnesium acetate for 30 min in the presence of compounds, in the absence of 70 ribosomes.

Acknowledgements

We thank Gaëlle Friocourt and Olivier Billant for critical reading of the manuscript, Zarrin Alavi, INSERM CIC 0502, CHRU of Brest, for proof-reading of this manuscript and for her precious advice, H el ene Simon for her excellent technical assistance, Laetitia Guedeveille, Laetitia Herzog, Fabienne Reine and Emilie Jaumain for expert animal care and excellent technical assistance, Blandine Baratte for help with radioactivity handling and Vincent Guen for help with the Typhoon.

References

- Lefr ere JJ, Hewitt P (2009) From mad cows to sensible blood transfusion: the risk of prion transmission by labile blood components in the United Kingdom and in France. *Transfusion* 49: 797-812. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02044.x. PubMed: 19170997.
- Langevin C, Andr eoletti O, Le Dur A, Laude H, B eringue V (2011) Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 41: 219-225. doi: 10.1016/j.nbd.2010.09.010. PubMed: 20875860.
- Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 301-307. doi: 10.1038/nrm2873. PubMed: 20308987.
- Frost B, Diamond MI (2009) The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. *Prion* 3: 74-77. doi: 10.4161/pri.3.2.8754. PubMed: 19448400.
- Frost B, Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11: 155-159. PubMed: 20029438.
- Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M (2010) The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 33: 317-325. doi: 10.1016/j.tins.2010.04.003. PubMed: 20493564.
- Miller G (2009) Neurodegeneration. Could they all be prion diseases? *Science* 326: 1337-1339. doi: 10.1126/science.326.5958.1337. PubMed: 19965731.
- Soto C, Estrada L, Castilla J (2006) Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci* 31: 150-155. doi: 10.1016/j.tibs.2006.01.002. PubMed: 16473510.
- Bach S, Talarek N, Andrieu T, Vierfond JM, Mettey Y et al. (2003) Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21: 1075-1081. doi: 10.1038/nbt855. PubMed: 12910243.
- Bach S, Tribouillard D, Talarek N, Desban N, Gug F et al. (2006) A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* 39: 72-77. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.04.005. PubMed: 16750390.
- Tribouillard-Tanvier D, Dos Reis S, Gug F, Voisset C, B eringue V et al. (2008) Protein folding activity of ribosomal RNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs. *PLOS ONE* 3: e2174. doi: 10.1371/journal.pone.0002174. PubMed: 18476094.
- Voisset C, Saupe SJ, Galons H, Blondel M (2009) Procedure for identification and characterization of drugs efficient against mammalian prion: from a yeast-based antiprion drug screening assay to in vivo mouse models. *Infect Disord Drug Targets* 9: 31-39. doi: 10.2174/1871526510909010031. PubMed: 19200013.
- Voisset C, Thuret JY, Tribouillard-Tanvier D, Saupe SJ, Blondel M (2008) Tools for the study of ribosome-borne protein folding activity. *Biotechnol J* 3: 1033-1040. doi: 10.1002/biot.200800134. PubMed: 18683165.
- Couplan E, Aiyar RS, Kucharczyk R, Kabala A, Ezkurdia N et al. (2011) A yeast-based assay identifies drugs active against human

Supporting Information

Methods S1. (DOC)

Figure S1. Cells from red halos surrounding filters on which IQ (A) or IQ, 4b, 4c, 4d, 8a, 8b (B) was loaded were streaked on drug-free YPD medium. Cells surrounding filters on which DMSO and GuHCl were loaded were used as negative and positive controls, respectively. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MB CV HG VB YM CP. Performed the experiments: PN NO VB FS YP ND CM MAC CV SB. Analyzed the data: MB CV HG VB SS CP YM. Wrote the manuscript: CV MB HG VB SB.

- mitochondrial disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11989-11994. doi: 10.1073/pnas.1101478108. PubMed: 21715656.
- Reis SD, Pang Y, Vishnu N, Voisset C, Galons H et al. (2011) Mode of action of the antiprion drugs 6AP and GA on ribosome assisted protein folding. *Biochimie* 93: 1047-1054. doi: 10.1016/j.biochi.2011.03.002. PubMed: 21396977.
- Tribouillard-Tanvier D, B eringue V, Desban N, Gug F, Bach S et al. (2008) Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PLOS ONE* 3: e1981. doi: 10.1371/journal.pone.0001981. PubMed: 18431471.
- Klingenstein R, L ober S, Kujala P, Godsav S, Leliveld SR et al. (2006) Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J Neurochem* 98: 748-759. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03889.x. PubMed: 16749906.
- Sch ofer H (2007) Evaluation of imiquimod for the therapy of external genital and anal warts in comparison with destructive therapies. *Br J Dermatol* 157 Suppl 2: 52-55. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.06274.x. PubMed: 18067633.
- Lacarubba F, Potenza MC, Gurgone S, Micali G (2011) Successful treatment and management of large superficial basal cell carcinomas with topical imiquimod 5% cream: a case series and review. *J Dermatol Treat* 22: 353-358. doi: 10.3109/09546634.2010.548503. PubMed: 21781010.
- Serra-Guillen C, Nagore E, Hueso L, Traves V, Messegue F et al. (2012) A randomized pilot comparative study of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus imiquimod 5% versus sequential application of both therapies in immunocompetent patients with actinic keratosis: clinical and histologic outcomes. *J Am Acad Dermatol* 66: e131-137.
- Torres A, Storey L, Anders M, Miller RL, Bulbulian BJ et al. (2007) Immune-mediated changes in actinic keratosis following topical treatment with imiquimod 5% cream. *J Transl Med* 5: 7. doi: 10.1186/1479-5876-5-7. PubMed: 17257431.
- Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL (2012) Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* 12: 168-179. PubMed: 22301850.
- Archer F, Bachelin C, Andreoletti O, Besnard N, Perrot G et al. (2004) Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol* 78: 482-490. doi: 10.1128/JVI.78.1.482-490.2004. PubMed: 14671128.
- Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D et al. (2001) Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol* 75: 5977-5984. doi: 10.1128/JVI.75.13.5977-5984.2001. PubMed: 11390599.
- Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA (1999) Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 21: 1-14. doi: 10.3109/08923979909016391. PubMed: 10411278.

26. Beringue V, Adjou KT, Lamoury F, Maignien T, Deslys JP et al. (2000) Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol* 74: 5432-5440. doi:10.1128/JVI.74.12.5432-5440.2000. PubMed: 10823847.
27. Collins SJ, Lewis V, Brazier M, Hill AF, Fletcher A et al. (2002) Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* 52: 503-506. doi:10.1002/ana.10336. PubMed: 12325081.
28. Barret A, Tagliavini F, Forloni G, Bate C, Salmona M et al. (2003) Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 77: 8462-8469. doi:10.1128/JVI.77.15.8462-8469.2003. PubMed: 12857915.
29. Dirikoc S, Priola SA, Marella M, Zsürger N, Chabry J (2007) Nonpsychoactive cannabidiol prevents prion accumulation and protects neurons against prion toxicity. *J Neurosci* 27: 9537-9544. doi:10.1523/JNEUROSCI.1942-07.2007. PubMed: 17804615.
30. Kim Y, de Castro S, Gao ZG, Ijzerman AP, Jacobson KA (2009). Novel: 2 and 4-substituted 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine derivatives as allosteric modulators of the A3 adenosine receptor. *J Med Chem* 52: 2099-2108.
31. Khier S, Deleuze-Masquéfa C, Moarbes G, Gattaccoca F, Margout D et al. (2010) Pharmacology of EAPB0203, a novel imidazo[1,2-a]quinoxaline derivative with anti-tumoral activity on melanoma. *Eur J Pharm Sci* 39: 23-29. doi:10.1016/j.ejps.2009.10.006. PubMed: 19854270.
32. Naddaka V, Saeed S, Montvilski D, Zelikovitch L, Arad O et al. (2008) Process for preparing Imiquimod. US Patent 7323568, Application number 11/298,711 Bnei-Brak, IL: Assignee Chemagis Ltd.
33. Peinador C, Quintela J, Moreira M (1997) A Short and Facile Synthesis for Heteromine A. *Tetrahedron* 53: 8269-8272. doi:10.1016/S0040-4020(97)00492-4.
34. Zagon IS, Donahue RN, Rogosnitzky M, McLaughlin PJ (2006) Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit cell proliferation independent of immune function. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 968-979. doi:10.3181/0802-RM-58. PubMed: 16480416.
35. Chattopadhyay S, Das B, Dasgupta C (1996) Reactivation of denatured proteins by 23S ribosomal RNA: role of domain V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8284-8287. doi:10.1073/pnas.93.16.8284. PubMed: 8710862.
36. Das B, Chattopadhyay S, Bera AK, Dasgupta C (1996) In vitro protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA. *Eur J Biochem* 235: 613-621. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00613.x. PubMed: 8654409.
37. Das D, Das A, Samanta D, Ghosh J, Dasgupta S et al. (2008) Role of the ribosome in protein folding. *Biotechnol J* 3: 999-1009. doi:10.1002/biot.200800098. PubMed: 18702035.
38. Kudlicki W, Coffman A, Kramer G, Hardesty B (1997) Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins. *Fold Des* 2: 101-108. doi:10.1016/S1359-0278(97)00014-X. PubMed: 9135982.
39. Sanyal SC, Bhattacharyya D, Das Gupta C (2002) The folding of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase. Equilibrium and kinetic studies. *Eur J Biochem* 269: 3856-3866. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03085.x. PubMed: 12153583.
40. Le Dur A, Beringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TL et al. (2005) A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16031-16036. doi:10.1073/pnas.0502296102. PubMed: 16239348.
41. Ederth J, Mandava CS, Dasgupta S, Sanyal S (2009) A single-step method for purification of active His-tagged ribosomes from a genetically engineered *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 37: e15. PubMed: 19074194.

V.2.2 La Flunarizine possède une activité antiprion

La Flunarizine (Sibelium[®]), une molécule antiprion issue de la chimiothèque Tebu-bio criblée par Flavie Soubigou. Elle est utilisée pour le traitement prophylactique de la migraine, les maladies vasculaires périphériques occlusives, les vertiges d'origine centrale et périphérique et comme adjuvant dans le traitement de l'épilepsie. La Flunarizine est un médicament classé comme un bloqueur des canaux calciques. Elle bloque l'entrée du calcium et aussi l'activité des récepteurs de l'histamine H1 (activité antihistaminique H1). Ce composé limite les dommages cellulaires dus à la surcharge de calcium en bloquant sélectivement l'entrée du calcium dans les cellules. Elle empêche les contractions du muscle lisse vasculaire et protège les cellules du cerveau contre les effets de l'hypoxie. Nous avons montré que la Flunarizine est également active contre les prions de levure [*PSI+*] et [*URE3*] et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6). De plus, la Flunarizine augmente le pourcentage de survie des souris infectées par le prion ovin dans un traitement tardif (i). Sur la base moléculaire de la Flunarizine, des dérivés ont été synthétisés par l'équipe d'Hervé Galons (Université René Descartes, Paris 5). Certains dérivés de la Flunarizine possèdent une activité antiprion qui est supérieure à celle de la Flunarizine. Enfin, nous avons également montré que l'activité antiprion de la Flunarizine corrèle parfaitement avec la capacité à inhiber l'activité PFAR (ii). De façon intéressante, les molécules présentant une activité antihistaminique que nous avons testées possèdent aussi une activité antiprion, l'activité antihistaminique semble aussi corrélée avec l'activité antiprion (iii). Ces travaux seront prochainement publiés dans un journal à comité de lecture.

(i) La Flunarizine est active contre les prions de levure et de mammifère

Nos résultats ont montré que la Flunarizine est active contre les prions de levure ([*PSI+*] et [*URE3*]) et le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6). En effet, la Flunarizine est capable de convertir les colonies blanches [*PRION+*] en colonies rouges [*prion-*] dans le criblage basée sur le modèle de levure. En culture

cellulaire (MovS6), la Flunarizine présente une forte activité antiprion, son IC₅₀ est inférieure à 2,5 µM (figure 30).

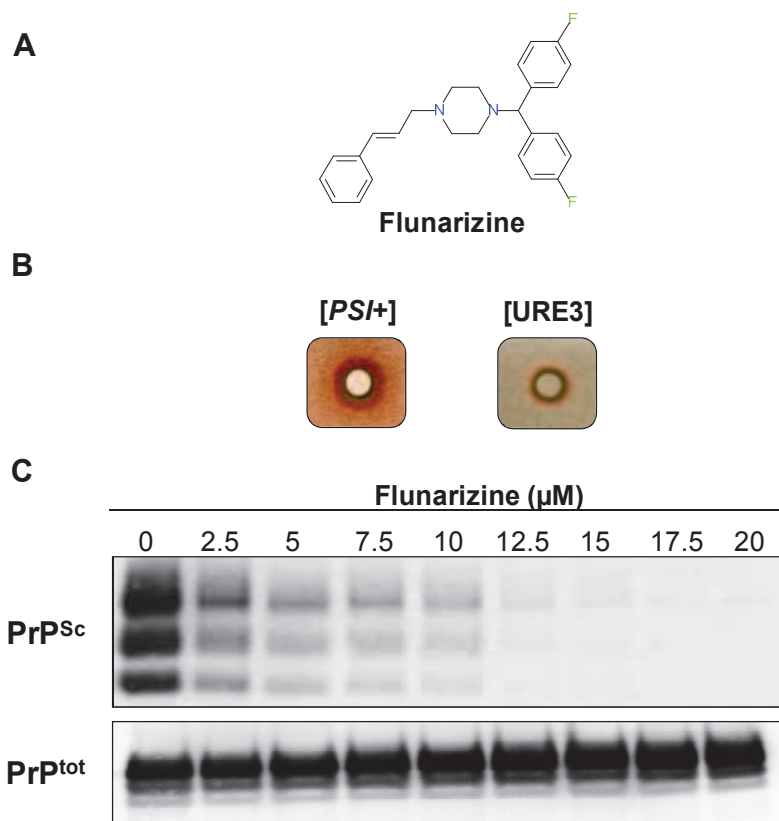


Figure 30. L'activité antiprion de la Flunarizine.

- (A) Structure de la Flunarizine.
- (B) Activité de la Flunarizine contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3]. Les levures Strg6 [PSI⁺] et SB34 [URE3] ont été étalées sur les milieux YPD + 200 µM GuHCl et 1/2YPD + 800 µM GuHCl, respectivement. 5 µl à 10 µM de la Flunarizine ont été déposés sur les filtres. La Flunarizine est capable de convertir les colonies blanches [PRION⁺] en colonies rouges [prion⁻].
- (C) Activité de la Flunarizine contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire. Les cellules infectées par le prion PrP^{Sc} (MovS6) ont été traitées par la Flunarizine à des concentrations croissantes pendant 6 jours. Les cellules ont été lysées, traitées par la protéinase K pour révéler spécifiquement la PrP^{Sc} par western - blot. L'effet de la Flunarizine sur le niveau de la PrP^{tot} a été déterminé sur les mêmes cellules traitées par la Flunarizine en absence de digestion par la protéinase K.

L'activité antiprion de la Flunarizine a ensuite été testée dans le modèle murin infecté par la PrP^{Sc} en collaboration avec Vincent Béringue (INRA Jouy-en-Josas). Le modèle murin utilisé correspond à des souris transgéniques permettant une propagation « rapide » des maladies à prion (Vilette, Andreoletti et al. 2001 ; Vilotte, Soulier et al. 2001). Ces souris transgéniques expriment la protéine PrP^{VRG} ovine à un taux élevé dans un contexte génétique déficient en PrP endogène (souris tgOV). Suite à l'injection intracérébrale du prion ovine (souche ovine 127S), les souris tgOv développent des symptômes neurologiques associés à une encéphalopathie

spongiforme à partir de 70 jours post-infection et accumulent des protéines sous forme prion PrP^{Sc}. Les souris infectées ont été traitées par la Flunarizine dans un « traitement tardif ». À partir du 40^{ème} jour après l'infection par le prion, la Flunarizine à 4 mg/ml a été injectée à un groupe de 10 souris. Les souris du groupe contrôle ont été traitées par du DMSO. Le traitement tardif par la Flunarizine a permis d'augmenter le temps de survie des souris infectées par le prion par rapport aux souris du groupe contrôle qui sont toutes mortes au 72^{ème} jour après l'infection par le prion (figure 31). La Flunarizine est donc un bon candidat médicament pour un traitement tardif des maladies à prion. A noter que la Flunarizine n'a pas d'effet sur la survie des souris infectées par le prion dans un traitement précoce dans lequel la Flunarizine a été injectée 30 minutes après l'infection intrapéritonéale par le prion. Le temps de survie des souris infectées du groupe contrôle ou traitées par la Flunarizine était similaire. L'activité antiprion de la Flunarizine contre le prion PrP^{Sc} est actuellement traitée en cours d'évaluation dans un test organotypique dans lequel des tranches de cerveau de souris sont infectées par le prion en culture (en collaboration avec Sophie Halliez et Vincent Béringue, INRA Jouy en Josas).

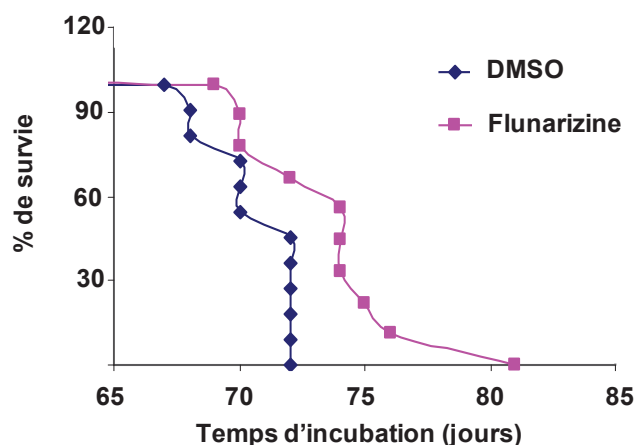


Figure 31. Traitement tardif de souris infectées par PrP^{Sc} par la Flunarizine.

Les souris ont été infectées par du prion ovine (souche ovine127S). À partir du 40^{ème} jour de l'infection par le prion, La Flunarizine à 4 mg/ml a été injecté à 10 souris. Les souris du groupe contrôle ont été traitées par du DMSO. Le % de survie correspond au nombre de souris survivantes.

(ii) La Flunarizine et ses dérivés inhibent la PFAR

Sur la base moléculaire de la Flunarizine, des dérivés ont été synthétisés par l'équipe d'Hervé Galons (Université René Descartes, Paris 5). Les structures de dérivés de la Flunarizine sont gardées confidentielles pour notre collaboration avec le laboratoire

de Servier. L'activité antiprion de ces dérivés a également été testée contre les prions de levure et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire. On constate qu'il y a peu de molécules possédant une activité contre le prion [PSI⁺] (figure 32). Le PSI 336 possède une activité contre le [PSI⁺] similaire à celle de la Flunarizine, les autres dérivés sont moins actifs comme les dérivés PSI 332, PSI 336, PSI 337, PSI 338 et PSI 350. De plus, ces dérivés actifs contre [PSI⁺] sont également actifs contre [URE3] mais avec une faible activité. Les halos de toxicité qui pourraient masquer leur activité antiprion. Ces dérivés actifs contre les prions de levure de la Flunarizine sont également capables d'éliminer le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6) (figure 32B). Seul le PSI 337 possède une activité contre PrP^{Sc} supérieure à celle de la Flunarizine, son IC₅₀ est inférieure à 1 µM.

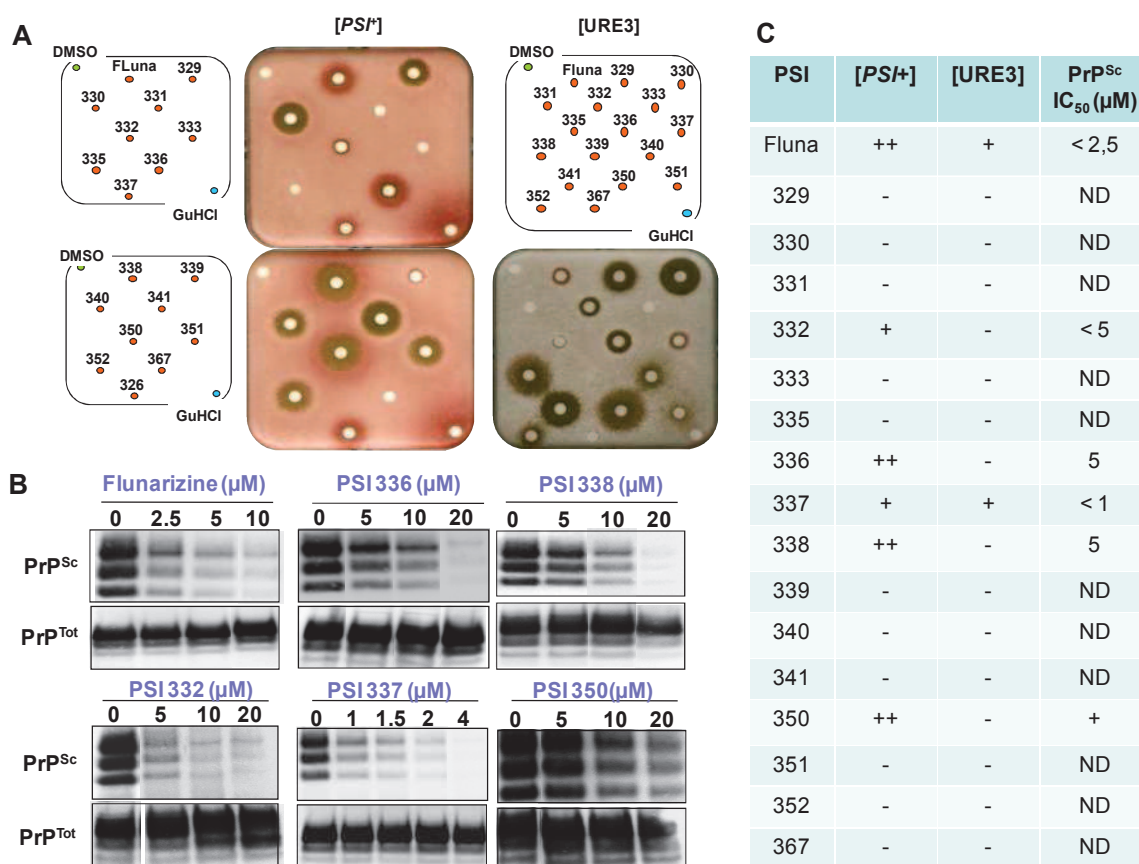


Figure 32. L'activité antiprion de la Flunarizine (PSI 326) et de ses dérivés.

- (A) Activité contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3]. Les levures Strg6 [PSI⁺] et SB34 [URE3] ont été étalées sur les milieux YPD + 200 µM GuHCl et ½ YDP + 800 µM GuHCl, respectivement. 5µl de chaque molécule à 10 µM ont été déposés sur les filtres. DMSO (10 µl) et GuHCl (10 µl à 300 µM) ont été utilisés comme contrôle négatif et contrôle positif.
- (B) Activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire. Les cellules infectées par le prion ont été traitées par les molécules à des concentrations croissantes. Après 6 jours d'incubation, les cellules ont été lysées. Une quantité de 250 µg de protéines a été traitée par la protéinase K pour la détection de PrP^{Sc} et 25 µg de protéines totales sans digestion enzymatique ont été utilisés comme contrôle (PrP^{tot}).
- (C) Tableau récapitulatif de l'activité antiprion de dérivés de la Flunarizine (ND : Non Déterminé).

Enfin, l'activité anti-PFAR de la Flunarizine et de son dérivé le plus actif, le PSI 337, a ensuite été évaluée *in vitro*. La figure 33 montre une activité anti-PFAR de ces deux composés. Ils inhibent la renaturation des protéines hCA assistée par des ribosomes entiers (70S) d'*E.coli* (en collaboration avec S. Sanyal et Y. Pang, Uppsala, Suède). A une concentration de 200 μM , ils inhibent complètement le repliement assisté porté par le ribosome. Ces résultats suggèrent que l'activité antiprion de la Flunarizine et de son dérivé est également due à leur activité anti-PFAR.

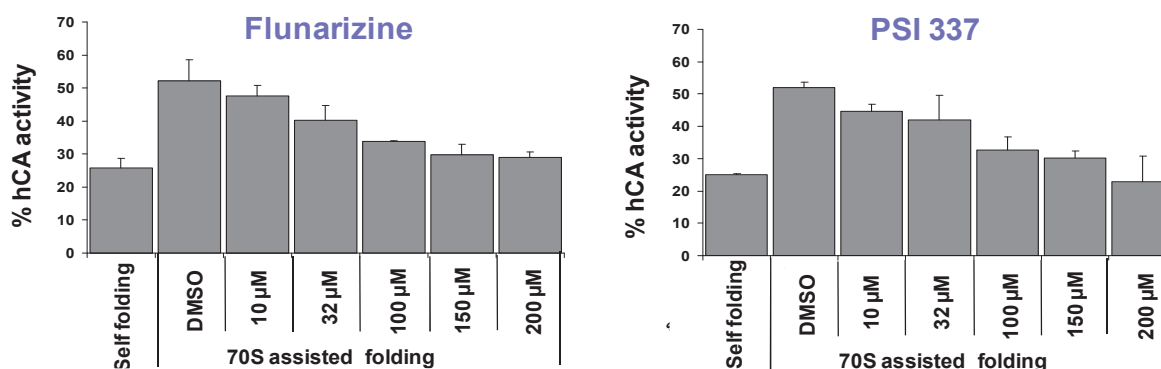


Figure 33. La Flunarizine et son dérivé PSI 337 inhibent l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) *in vitro*.

Les protéines ACh ont été dénaturées par le GuHCl. Environ 25 % des enzymes se renaturent spontanément pour atteindre leur conformation active (self folding). La présence du ribosome entier d'*E. coli* (70S) permet d'augmenter jusqu'à 60 % la fraction protéique renaturée (assisted folding). La Flunarizine et le PSI 337 inhibent l'activité chaperon de protéines du ribosome et cette inhibition totale de PFAR est observée à 200 μM .

(iii) L'activité antiprion de la Flunarizine est parallèle avec son activité antihistaminique

La Flunarizine est active contre les prions de levure et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo*. Elle est aussi capable de prolonger le temps de survie des souris infectées par le prion dans un traitement tardif. Son activité antiprion est liée à la capacité d'inhiber l'activité PFAR. Or, la Flunarizine est un antagoniste du calcium qui bloque physiquement les canaux calciques de type T (Celia M. Santi, 2002). C'est également un antagoniste des récepteurs H1 (activité antihistaminique). Un antihistaminique est un médicament qui sert à réduire ou à éliminer les effets de l'histamine, médiateur chimique endogène libéré, entre autres, au cours des réactions allergiques, par action sur les récepteurs de l'histamine. Afin de déterminer

si l'activité inhibitrice des canaux calciques de type T et l'activité antihistaminique de la Flunarizine corrélient avec son activité antiprion, nous avons testé l'activité antiprion des dérivés fonctionnels de la Flunarizine tels que la Cinnarizine (structuralement proche de la Flunarizine, antagoniste des récepteurs H1 et inhibiteur des canaux calciques de type T) ; l'Haloperidol et l'Ethosuximide (inhibiteurs des canaux calciques de type T) ; le Doxépin et la Diphenhydramine (antagoniste des récepteurs H1).

Toutes les molécules antihistaminiques testées sont capables d'éliminer PrP^{Sc} *ex vivo* en culture cellulaire (MovS6), malgré l'absence d'effet contre les prions de levure de certaines molécules (figure 34). La Cinnarizine et le Doxépin, les antihistaminiques, sont actifs à la fois contre les prions de levure [PS/+] et [URE3] et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture (figure 34). La Diphenhydramine est inactive contre les prions de levure, mais possède une activité contre PrP^{Sc} *ex vivo*. Cette absence d'activité contre les prions de levure pourrait être due à l'imperméabilité de la membrane cellulaire de la levure pour cette molécule. Dans les cas de bloqueurs des canaux calciques, l'Haloperidol n'est pas active contre les prions de levure mais active contre la PrP^{Sc} *ex vivo*. Cette absence d'activité chez la levure pourrait être due à un masquage de son activité par le grand halo de toxicité de l'Haloperidol. Par contre, l'Ethosuximide est inactive contre les prions de levure et de mammifère PrP^{Sc}. L'activité antiprion de la Flunarizine et de ses dérivés fonctionnels semble donc être parallèle avec leur activité antagoniste des récepteurs H1. Cette conclusion a été renforcée par l'identification de molécules tricycliques antihistaminiques tels que la Trimeprazine, l'Imipramine et la Desloratadine qui, issues de la chimiothèque de Strasbourg, sont également capables d'éliminer le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo* (figure 35). L'activité antiprion contre PrP^{Sc} de ces molécules antihistaminiques pourrait être liée à la capacité de stimuler l'autophagie permettant ainsi de diminuer le taux de PrP^{Sc} comme dans le cas de l'Astemizole, un antihistaminique qui a récemment été identifié pour son activité antiprion (Karapetyan et al. 2013). Il est donc intéressant d'établir le lien entre l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) et l'activité antagoniste de récepteur H1, cela nous éclairerait les mécanismes contrôlant la prionisation dans lesquels la PFAR est impliquée.

Un manuscrit de ce travail est en cours de rédaction et sera publié dans un journal à comité de lecture.

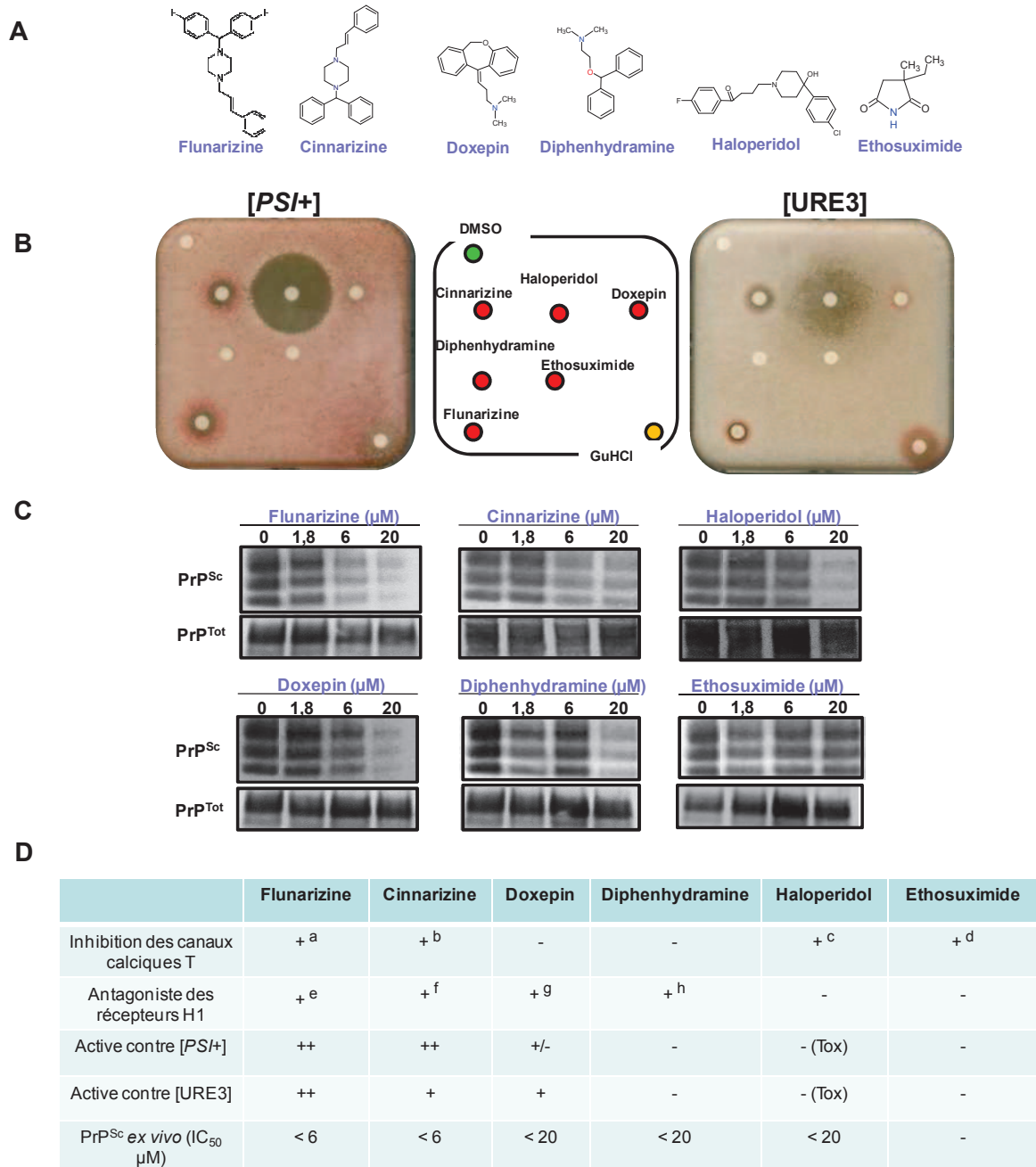


Figure 34. L'activité antiprion de molécules antihistaminiques H1 et de molécules inhibitrices des canaux calciques.

- (A) Structure de la Flunarizine et de ses dérivés fonctionnels : Cinnarizine (antihistaminique H1 et inhibitrice des canaux calciques) ; Haloperidol et Ethosuximide (inhibitrice des canaux calciques) ; Doxepin et Diphenhydramine (antihistaminique H1).
- (B) L'activité contre les prions de levure. Les souches *Strg6* [PSI+] et SB34 [URE3] ont été étalées sur les milieux riches YPD et ½ YPD contenant 200 μM et 800 μM de GuHCl, respectivement. Sur chaque filtre, 5 μL de molécules à 10 μM ont été déposés. DMSO et GuHCl ont été utilisés comme contrôle négatif et contrôle positif.
- (C) L'activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire. Les cellules MovS6, infectées par le prion, ont été traitées avec les molécules pendant 6 jours. Après lyse cellulaire, 250 μg de protéines ont été digérés par la protéinase K, ce qui permet de révéler la PrP^{Sc}. 25 μg de protéines sans traitement par la PK ont été utilisés comme contrôle.
- (D) Tableau récapitulatif de l'activité antiprion des dérivés fonctionnels de la Flunarizine. L'activité antihistaminique semble être parallèle avec l'activité antiprion contre la PrP^{Sc}. (^a et ^c. CM. Santi et al, 2002 ; ^b. B N singh 1986 ; ^d. Goren M G and Onat F 2007. ^e. ^f. ^g. et ^h. Estelle F, Simons 2011)

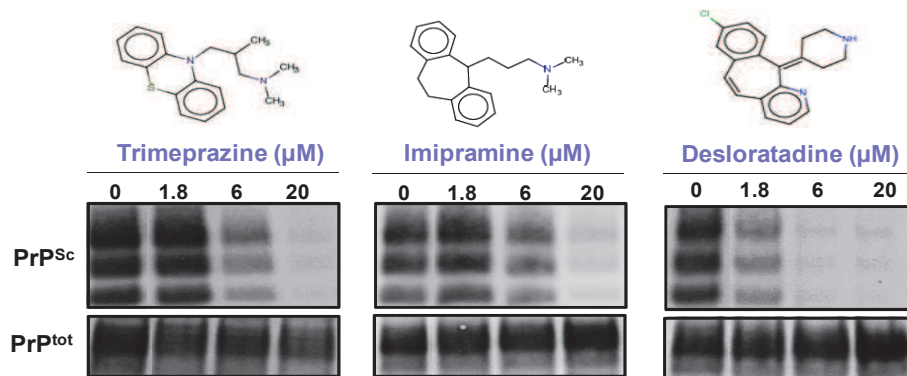


Figure 35. L'activité contre le prion PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6) de molécules antihistaminiques issues de la chimiothèque de Strasbourg (RFM2). Ces molécules tricycliques ne possèdent pas d'activité contre les prions de levure (*PSI+*) et [URE3] mais elles sont capables d'éliminer la PrP^{Sc} *ex vivo* en culture cellulaire (MovS6).

V.2.3 Identification de nouvelles molécules antiprion à partir de chimiothèques de composés originaux

Afin d'identifier plus de nouvelles molécules antiprion, nous avons également réalisé le criblage des molécules issues d'une chimiothèque industrielle appartenant à Sanofi / Aventis telle que la chimiothèque SYN et de chimiothèques académiques telles que les chimiothèques RFM1/2 et CNS de Strasbourg.

V.2.3.1 Chimiothèque SYN

La chimiothèque SYN a été constituée par Sanofi-Aventis et regroupe de 250 composés actifs contre l' α -synuclein, une protéine impliquée dans la maladie de Parkinson. Nous avons voulu identifier des molécules actives à la fois contre les prions et contre l'effet toxique de l' α synuclein. Ces molécules seraient utilisées comme des outils pour étudier les mécanismes de mauvais repliement de protéines en général. Malheureusement, aucune molécule antiprion de cette chimiothèque SYN n'a été identifiée ni dans les systèmes de levure, ni en culture cellulaire (MovS6).

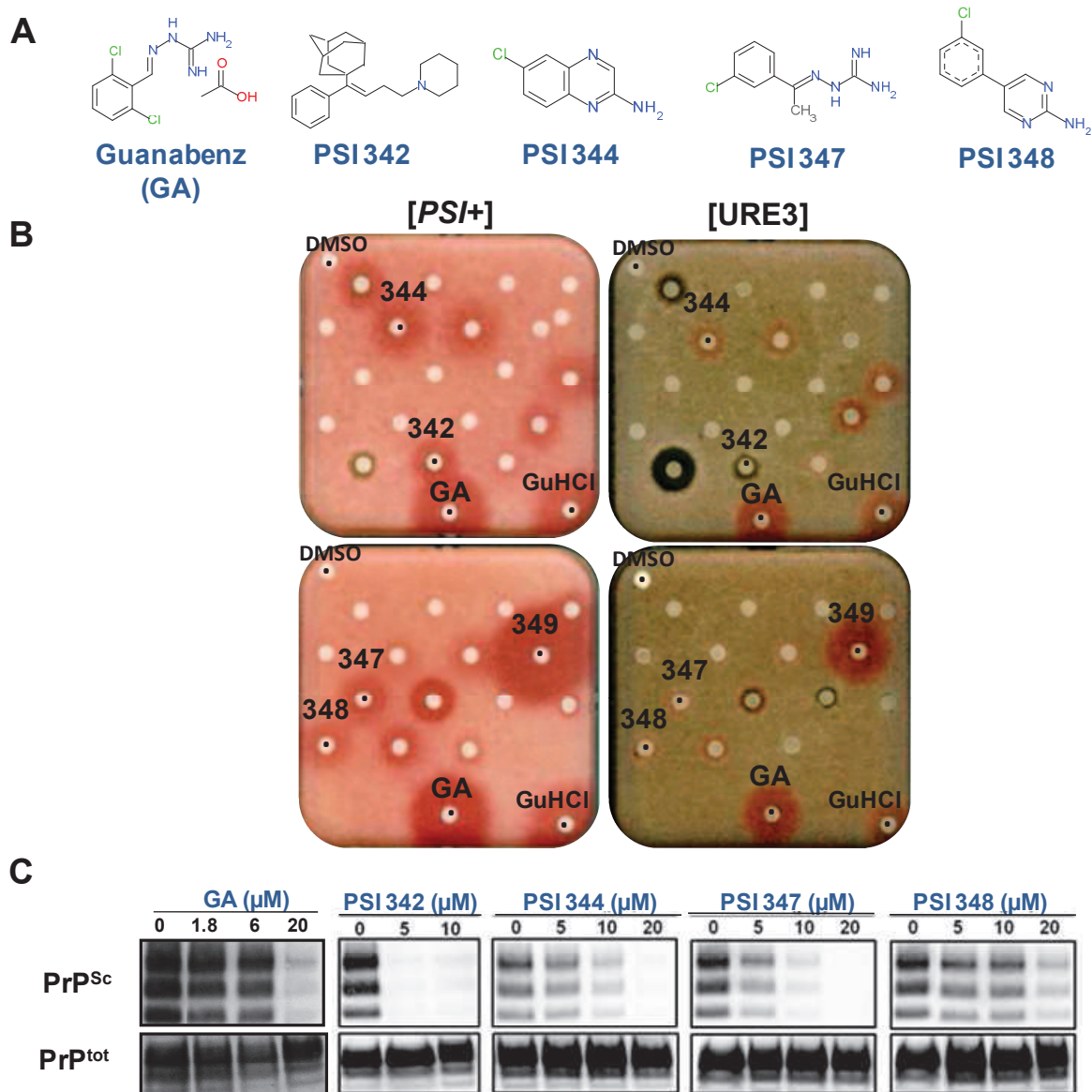
V.2.3.2 Chimiothèques de Strasbourg (RFM1/2 et CNS)

Nous avons réalisé le criblage de plus de 6000 molécules à partir de différentes chimiothèques de la faculté de Strasbourg. Parmi les hits identifiés, certains pourraient agir contre la PFAR. Les RSA autour de ces molécules serviraient à obtenir des molécules antiprion plus efficaces. Si les molécules antiprion ne soient pas des inhibiteurs de PFAR, elles serviraient d'outils pour l'identification de leurs cibles cellulaires :

- RFM1 (880 molécules de la famille arginine) et RFM2 (640 dérivés de 4 molécules antiprion identifiées à partir de la chimiothèque RFM1 assemblés à partir de composés synthétisés par le laboratoire de J.J Bourguignon et F. Bihel),
- CNS (4800 molécules de chimiothèque Nationale de Strasbourg).

(i) La chimiothèque RFM1

La chimiothèque RFM1, une chimiothèque composée de molécules originales synthétisées par le laboratoire de J.J Bourguignon et F. Bihel à Strasbourg, est une collection de 880 molécules qui sont structurellement proche du Guanabenz. Nous avons identifié 18 molécules ayant une activité contre le prion [*PSI*/+] dont 14 sont également actives contre le prion [*URE3*]. Parmi les 14 molécules actives à la fois contre les prions de levure [*PSI*/+] et [*URE3*], 8 des molécules les plus prometteuses ont été sélectionnées pour tester leur activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire. Ces molécules sont nommées de PSI 342 à PSI 349. Parmi ces 8 molécules, 4 sont actives contre le prion de mammifère PrP^{Sc}, il s'agit de PSI 342, PSI 344, PSI 347 et PSI 348 (figure 37). Dans la structure du PSI 342, il y a un cycle d'amantadine qui est utilisé comme médicament contre la grippe et dans le traitement de la maladie de Parkinson. Le PSI 349 présente une activité antiprion très forte en levure qui se traduit par un halo rouge de grand diamètre mais est inactive contre le PrP^{Sc}. Il est possible que cette molécule affecte le système rapporteur rouge/blanc chez la levure. Ces 4 molécules actives ont été utilisées comme bases pour des études de RSA.



(ii) La chimiothèque RFM2

Sur les bases de ces 4 molécules actives, nos collaborateurs de Strasbourg, Frédéric Bihel et Jean-Jacques Bourguignon, ont synthétisé de nouveaux composés et collectés dans leurs collections d'autres composés de structures proches qu'ils ont assemblé dans la chimiothèque nommée RFM2. Cette chimiothèque a été criblée par Olivier Billant (Stage de M1). 29 molécules issues de la RFM2 possédant une activité antiprion contre les prions de levure ont été identifiées. Parmi ces molécules, il y a des médicaments, notamment le PSI 393 (Metixène), un anticholinergique utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson. Nous avons montré que le PSI 393 est également actif contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6). De Plus, ce composé inhibe spécifiquement la PFAR. La Metixène pourrait être un bon outil dans les études du rôle universel de la PFAR dans les maladies associées à un mauvais repliement de protéine, notamment la maladie de Parkinson. L'activité antiprion de ces 29 molécules a ensuite été évaluée dans le test contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6). Certaines molécules sont très actives avec une IC₅₀ inférieure à 5 µM (tableau 13).

(iii) La chimiothèque CNS

En parallèle, nous avons aussi criblé la chimiothèque nationale de Strasbourg (CNS) qui fait partie de la collection nationale. Parmi les 4800 composés testés, nous avons donc identifié 15 molécules qui sont actives à la fois contre les prions de levure [PSI+] et [URE3] et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture (tableau 14). Il faut remarquer que de nombreuses molécules antiprion issues de la chimiothèque CNS possèdent une longue chaîne de carbone d'où la facilité de traverser les membranes cellulaires. Elles sont considérées comme des « frequent hitter », et sont donc peu intéressantes pour nos études. Les molécules actives contre les prions [PSI+] et [URE3] sont également actives contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire, ce qui valide la conservation entre les prions de levure et de mammifère.

Tableau 13. Activité antiprion des 29 hits identifiés issus de la chimiothèque RFM2.

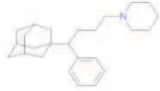
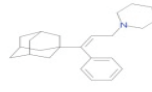
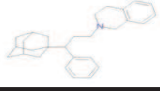
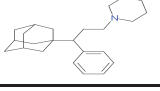
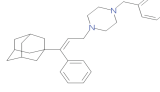
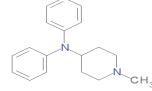
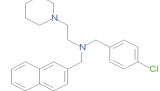
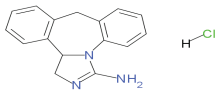
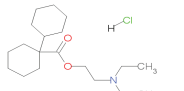
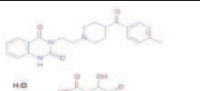
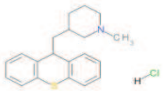
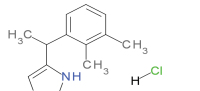
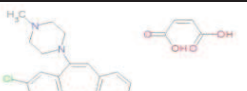
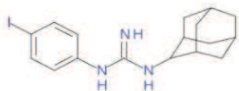
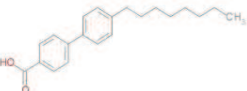
Molécules	Structure	Levure		PrP ^{Sc} ex vitro (MovS6)	
		[PSI +]	[URE3]	IC ₅₀ (μM)	Toxicité (μM)
PSI 383		+++	+/-	< 5	10
PSI 384		+++	++	< 5	20
PSI 385		++	+/-	< 1	10
PSI 386		++++	+	< 5	10
PSI 387		+++	+	< 5	Non
PSI 388		+	-	< 10	Non
PSI 389		++	-	< 5	10
PSI 390		++	++	-	Non
PSI 391		+	+/-	< 5	Non
PSI 392		+	+	-	Non
Metixene		+	+	< 5	20
PSI 394		++	+	-	Non
PSI 395		+	+/-	< 5	Non
PSI 396		+/-	-	< 5	20
PSI 397		+/-	-	-	Non

Tableau 13 (suite)

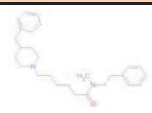
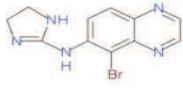
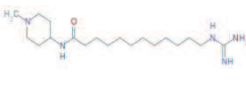
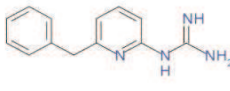
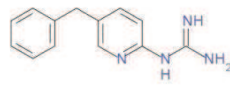
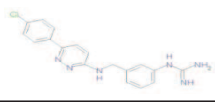
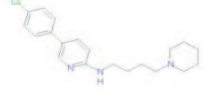
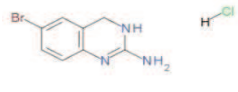
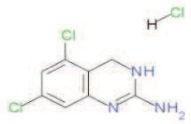
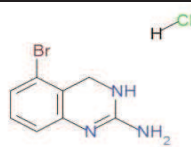
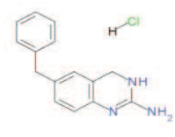
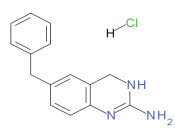
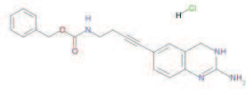
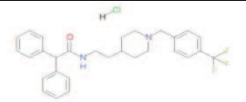
Molécules	Structure	Levure		PrP ^{Sc} ex vitro (MovS6)	
		[PSI +]	[URE3]	IC ₅₀ (μM)	Toxicité (μM)
PSI 398		+	+/-	-	Non
PSI 399		+/-	++	-	Non
PSI 400		++	++	-	Non
PSI 401		+/-	++	< 20	Non
PSI 402		+	+	-	Non
PSI 403		+	+	-	Non
PSI 404		+	-	< 5	20
PSI 405		+++++	+++++	-	Non
PSI 406		++++	++++	-	Non
PSI 407		+++	+++	-	Non
PSI 408		+++	+	10	Non
PSI 409		+	+	< 20	Non
PSI 410		++	+	-	Non
PSI 411		+	+	< 5	20

Tableau 14. Activité antiprion des 21 hits issus de la chimiothèque CNS.

Molécules	Structure	Levure		PrP ^{Sc} ex vitro (MovS6)	
		[PSI +]	[URE3]	IC ₅₀ (μM)	Toxicité (μM)
PSI 354		+++	+++	< 20	Non
PSI 355		++	-	-	Non
PSI 356		++	-	< 5	10
PSI 357		+++	+	< 5	Non
PSI 358		++	-	-	Non
PSI 359		++	+	< 5	20
PSI 360		++	+	< 10	Non
PSI 361		++	+	-	Non
PSI 362		++	-	-	Non
PSI 363		++	+	< 20	Non
PSI 364		++	-	-	Non
PSI 412		++	++	< 10	Non
PSI 413		++	++	< 5	20
PSI 414		+++	+++	< 5	Non
PSI 415		++	++	< 5	Non
PSI 416		++	++	< 5	Non
PSI 417		++	++	< 5	10
PSI 418		+++	+++	< 10	Non
PSI 419		+++	+++	< 5	Non
PSI 420		+++	+++	< 10	Non
PSI 421		+++	+++	-	Non

V.2.3.3 Les tests complémentaires dans la recherche des molécules agissant sur des cibles cellulaires, autres que la PFAR

Les molécules actives identifiées à partir des chimiothèques de Strasbourg RFM1/2 et CNS peuvent agir sur l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) ou sur d'autres cibles cellulaires encore inconnues. Nous avons classé les molécules actives en 2 catégories selon les tests complémentaires : la catégorie 1 regroupe les molécules n'agissant probablement pas contre PFAR et la catégorie 2 regroupe des molécules probablement anti-PFAR. L'identification des nouvelles cibles cellulaires de molécules antiprion pourrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes contrôlant la prionisation chez la levure en particulier et chez les eucaryotes en général. Les tests complémentaires permettant de classer les composés antiprion dans les catégories 1 ou 2 sont les suivants :

- (i) Les souches enrichies en PFAR (*Itv1Δ* et *yar1Δ*) ont été utilisées pour évaluer l'activité des molécules actives contre le prion [*PSI+*]. L'augmentation de la PFAR dans ces souches de levure provoque une diminution de l'activité antiprion des molécules agissant sur PFAR par titration. Il faut donc plus de molécule testée pour avoir le même effet antiprion dans les souches enrichies en PFAR par rapport à la souche *WT*. Ainsi, si une molécule antiprion n'agit pas sur la PFAR, elle devrait donner le même effet antiprion dans les souches enrichies ou non en PFAR, c'est-à-dire la même taille de halo à une dose donnée.
- (ii) Le test sur milieu YPD seul nous permet d'isoler des molécules dont l'activité est indépendante du GuHCl. Dans notre système de criblage, une faible dose de GuHCl a été ajoutée dans les milieux de criblage, ce qui permet d'augmenter considérablement la sensibilité du test de criblage (Bach, Talarek et al, 2003 ; Chernoff, Linqvist et al, 1995). En effet, le GuHCl inhibe Hsp104p qui est essentielle à la propagation du prion [*PSI+*]. Nous avons montré que la PFAR a une activité partiellement redondante avec celle d'HsP104p, l'ajout du GuHCl dans le milieu favorise donc l'isolement de molécules antiprion agissant contre la PFAR.

(iii) L'activité antiprion de ces molécules a également été évaluée contre le prion $[PSI^+]$ sur le milieu riche YPD en présence de doses croissantes de 6AP. La 6AP est une molécule antiprion agissant sur la PFAR, l'ajout de 6AP à faible concentration dans le milieu permet de diminuer la sensibilité des souches $[PSI^+]$ aux composés antiprion qui ciblent la PFAR.

Au final, nous avons classé 9 molécules antiprion issues des chimiothèques de Strasbourg (RFM et CNS) dans la catégorie 1 (probablement non anti-PFAR). Ces molécules ont été sélectionnées pour leurs activités similaires contre le prion de levure $[PSI^+]$ dans la souche *WT* et les souches mutantes *Itv1Δ* et *yar1Δ*, enrichies en PFAR (figure 38). Il s'agit de PSI 354, PSI 360, PSI 361, PSI 385, PSI 389, PSI 405, PSI 414, PSI 419 et PSI 420. Il est possible que ces molécules aient pour cible un autre mécanisme cellulaire que la PFAR.

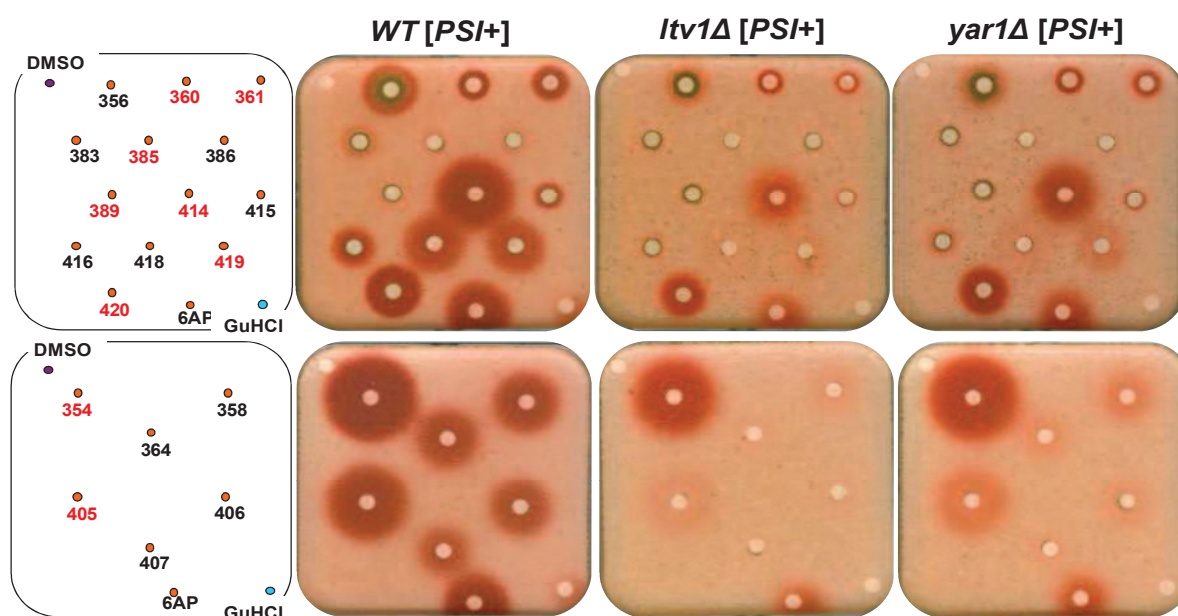


Figure 38. Activité contre le prion de levure $[PSI^+]$ dans des souches enrichies en PFAR (*Itv1Δ* et *yar1Δ*) pour identifier les molécules antiprion qui sont probablement non anti-PFAR. Les souches $[PSI^+]$ ont été étalées sur milieu YPD + 200 μ M GuHCl. 2 μ l à 10 mM de chaque molécule ont été déposés sur les filtres. Le DMSO et le GuHCl ont été utilisés comme contrôle négatif et positif, respectivement. Les molécules que nous avons classé dans la catégorie 1 sont en rouge.

Avant d'être utilisés pour identifier de nouvelles cibles cellulaires, les molécules antiprion de la catégorie 1 ont d'abord été testées pour une éventuelle activité inhibitrice de la PFAR afin de s'assurer qu'elles ne sont pas anti-PFAR. Les molécules ont été testées dans l'expérience *in vitro* de repliement de l'enzyme ACh (en collaboration avec S. Sanyal et Y. Pang, Suède). Le « self folding » d'ACh dénaturée était d'environ 20%. Avec l'assistance de la PFAR (ribosome 70S d'*E.coli*), la proportion de repliement assistée augmentait à 70%. Une inhibition complète de la PFAR a été observée en présence de 250 μ M des molécules PSI 354 et PSI 389 de la catégorie 1 (figure 39A). Les 7 autres molécules de la catégorie 1 modifiaient le substrat de l'essai *in vitro* du repliement d'ACh. Il est possible de les tester dans un test de repliement *in vitro* dans lequel l'ACh est remplacée par une autre protéine dont le substrat n'interagit pas avec ces molécules telles que la bovine carbonic anhydrase; la lactate deshydrogenase ; la malate deshydrogenase ou le lysozyme de blanc d'œuf de poule. Il nous reste à déterminer si, parmi les 7 molécules dont l'activité anti-PFAR n'a pas pu être évaluée dans le test basé sur l'ACh, certaines ne sont pas des inhibiteurs de PFAR. Ainsi, 2 des molécules antiprion de la catégorie 1, considérées comme probablement non anti-PFAR, sont finalement anti-PFAR. Nous ne pouvons pas exploiter ces molécules pour identifier de nouveaux acteurs cellulaires impliqués dans la prionisation.

La catégorie 2 contient d'autres molécules actives qui ciblent la PFAR car leur activité antiprion sur les souches mutantes enrichies en PFAR est inférieure à celle observée sur la souche *WT*. L'activité anti-PFAR de quelques-unes des molécules les plus actives de cette catégorie a été confirmée par l'expérience *in vitro* de repliement de l'enzyme d'ACh (figure 39B). Les molécules antiprion identifiées à partir des chimiothèques RFM et CNS sont désormais utilisées pour les études de relation structure-activité qui pourraient permettre d'optimiser l'activité antiprion des composés originaux.

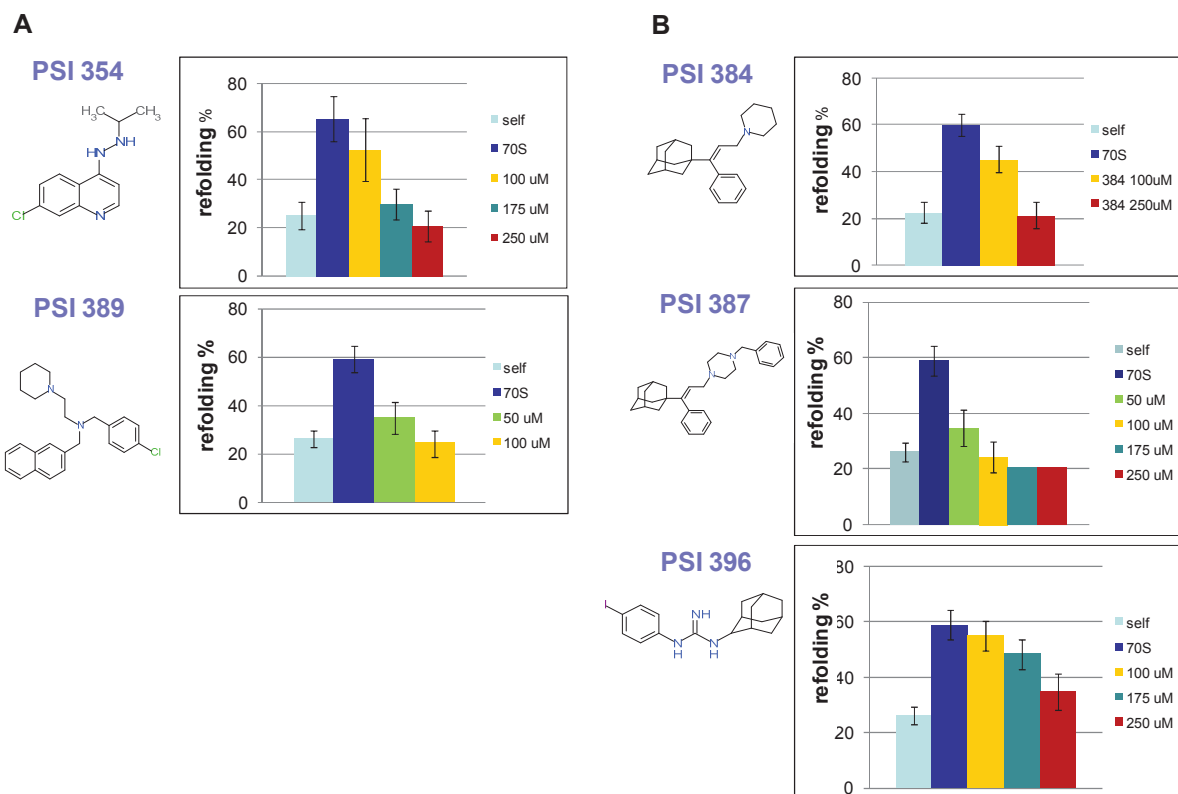


Figure 39. L'activité anti-PFAR *in vitro* des molécules (A) de la catégorie 1 «probablement non anti-PFAR », (B) de la catégorie 2 « probablement anti-PFAR ». Les molécules à concentrations différentes ont été ajoutées dans le cas du repliement assisté par le ribosome (70S) de l'enzyme ACh préalablement dénaturée. L'activité enzymatique de l'ACh indique le pourcentage de repliement. Une molécule anti-PFAR diminue le repliement de l'ACh assisté par la PFAR.

V.3 Etudes de relations structure-activité (RSA) des molécules antiprion

Nous avons également effectué des études de RSA autour de molécules antiprion préalablement identifiées par l'équipe telles que le GA et la 6AP afin d'identifier des dérivés actifs plus intéressants et aussi de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces molécules.

V.3.1 Etude de la relation structure-activité autour du Guanabenz

Le Guanabenz (GA), un agoniste des récepteurs α_2 adrénergiques, est utilisé depuis longtemps dans le traitement de l'hypertension sous le nom de Wytensine (Holmes

et al. 1983). Le GA est également actif contre les prions de levure et de mammifère (Tribouillard-Tanvier et al. 2008). Il peut donc être considéré comme un candidat potentiel pour traiter les maladies à prion. L'avantage de l'utilisation du GA dans le traitement des maladies à prion est qu'il est déjà en clinique pour traiter l'hypertension. Par contre, l'activité antihypertenseur du GA devient l'effet indésirable dans cette nouvelle thérapeutique, elle pourrait causer une hypotension chez les patients traités. Ce phénomène d'apathie a d'ailleurs été observé lors de 1er heure de traitement par le GA des souris TgOv infectées par le prion (V. Béringue, communication personnelle). Nous avons donc réalisé des études de RSA au tour du GA afin d'identifier de nouveaux dérivés qui possèdent une activité antiprion mais qui sont dépourvus d'effet antihypertenseur.

L'équipe de Frédéric Bihel et Jean-Jacques Bourguignon de Strasbourg a regroupé 40 molécules structurellement proches du GA issues des chimiothèques RFM 1 et 2 (Famille de l'arginine) et CNS (Chimiothèque Nationale de Strasbourg). Toutes ces molécules apparentées au GA ont été testées pour leur activité contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3], et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo*. Les tableaux 9, 10, 11, 12 représentent des molécules structurellement proches du GA. Pour les 17 composés présentés dans le tableau 9, la RSA a été faite au niveau du groupement phényl : suppression ou changement de position du chlore, addition d'un cycle aromatique, d'un groupe d'éther ou bien trifluorométhyl et pas de modification au niveau du groupement guanidine. Ces changements modifient l'activité antiprion de ces molécules. Seule la molécule RF573 conserve une activité antiprion à la fois contre les prions de levure et de mammifère. La présence de chlore semble être nécessaire pour avoir une activité antiprion. Certaines molécules dont la structure présente une simple modification par rapport à celle du GA, par exemple un changement de la position de chlore, se sont aussi révélées inactives contre les prions de levure. Nous avons donc décidé de tester leur activité antiprion contre PrP^{Sc} en culture cellulaire. Nous avons ainsi identifié 3 molécules qui présentent une activité antiprion *ex vivo* contre PrP^{Sc} mais qui sont inactives contre les prions de la levure. Cette incohérence pourrait être due à la perméabilité de la membrane de la levure pour ces molécules (RF560, RF519 et RF555).

Tableau 9. Collection de 17 molécules ayant une structure proche du GA et portant des modifications se situent au niveau du groupement phényl.

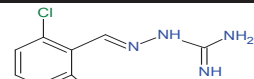
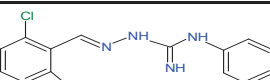
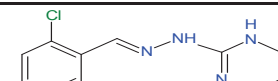
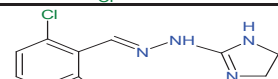
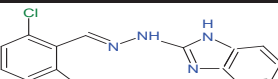
Les modifications structurales se situent au niveau du groupement phényl du GA : sur le nombre et la position du chlore, l'addition d'un cycle aromatique ou d'un groupe d'éther. Seule la molécule RF573 possède une activité antiprion contre les prions de levure et de mammifère. Les composés RF560, RF519 et RF555 sont inactifs contre les prions de levure mais sont capables d'éliminer PrP^{Sc} *ex vivo*.



Nous avons ensuite remarqué que les dérivés cycliques ou conjugués du GA (RF1325, RF1326, RF1327 et RF1432) possèdent une activité antiprion plus faible par rapport à celle du GA (tableau 10). Les modifications de ces molécules par rapport au GA se trouvent au niveau du groupement guanidine telles que l'addition d'un groupement méthyl, d'un cycle aromatique ou formation d'un cycle. Il est probable que le principe actif de dérivés cycliques ou conjugués soit masqué ou bien que l'accessibilité à leur cible ait été diminuée, ayant pour conséquence une réduction de l'activité antiprion.

Tableau 10. Les dérivés cycliques et conjugués du GA.

Les modifications se situent au niveau du groupement guanidine telles que l'addition d'un phényl ou formation d'un groupement cyclique.

Molécules	Structure	Levure		PrP ^{Sc} <i>ex vivo</i> (MovS6)	
		[PS/+]	[URE3]	IC ₅₀ (μM)	Toxicité (μM)
GA		+++	+++	6	Non
RF1325		+++	+++	-	6
RF1326		+++	+++	20	Non
RF1327		++	++	>20	>20
RF1342		-	-	-	Non

Les dérivés cycliques et conjugués du RF573 (tableau 11) et du RF519 (tableau 12) possèdent aussi une activité antiprion inférieure à celle de RF573 et RF519, respectivement ou bien ils deviennent toxiques pour la levure et pour les cellules MovS6 à des concentrations testées. Nous pouvons suggérer que l'activité antiprion du GA et de ses dérivés est portée par le groupement de guanidine (structuralement identique avec le GuHCl) et toute modification au niveau de ce groupement peut affecter leur activité antiprion. En outre, les modifications structurales au niveau du phényl pourraient diminuer leur capacité à pénétrer dans les cellules, d'où une activité antiprion négative de certains dérivés du GA. A l'inverse, les molécules

pourraient devenir toxiques suite à ces modifications et leur activité antiprion serait masquée par cette toxicité.

Tableau 11. Les dérivés cycliques et conjugués du RF573.

Les dérivés sont construits par l'addition d'un groupe méthyl ou un cycle aromatique, ou par la formation d'un groupement cyclique.

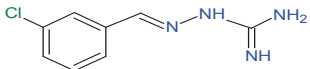
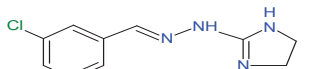
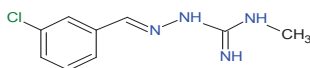
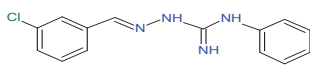
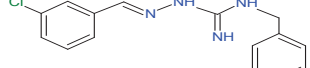
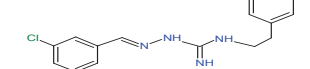
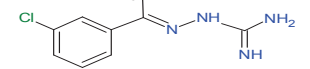
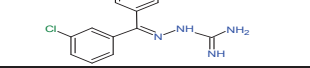
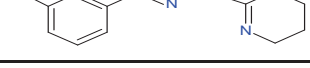
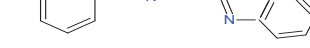
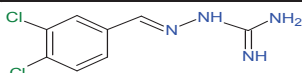
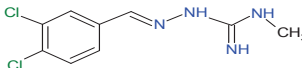
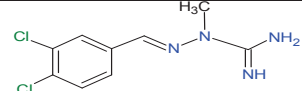
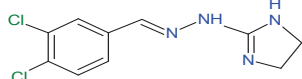
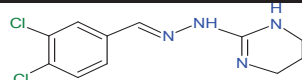
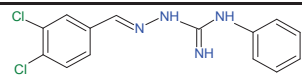
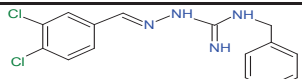
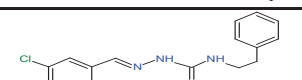
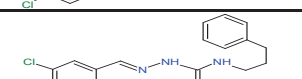
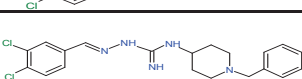
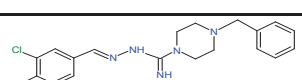
Molécules	Structure	Levure		PrP ^{Sc} ex vivo (MovS6)	
		[PSI +]	[URE3]	IC ₅₀ (μM)	Toxicité (μM)
RF573		++	++	6	Non
RF705		+	+	20	Non
RF708		-	-	20	Non
RF709		Toxique	+	-	20
RF710		-	-	ND	ND
RF711		-	-	ND	ND
RF712		++	++	20	20
RF714		-	-	ND	ND
RF1328		++	++	6	Non
RF1341		-	+/-	6	Non

Tableau 12. Les dérivés cycliques et conjugués du RF519.

Les modifications se situent au niveau du groupement guanidine par l'addition d'un méthyl, d'un cycle aromatique ou par formation d'un cycle.

Molécules	Structure	Levure		PrP ^{Sc} <i>ex vivo</i> (MovS6)	
		[PSI+]	[URE3]	IC ₅₀ (μM)	Toxicité (μM)
RF519		-	-	6	20
RF567		-	-	1,8	20
RF568		-	-	20	Non
RF574		-	-	< 20	Non
RF575		-	+/-	6	20
RF563		Toxique	+	-	6
RF564		Toxique	Toxique	-	6
RF565		Toxique	Toxique	ND	ND
RF566		-	-	ND	ND
RF571		Toxique	-	ND	ND
RF936		Toxique	Toxique	ND	ND

L'activité antiprion de dérivés du GA est également due à la capacité d'inhiber l'activité PFAR

Il a été montré que le GA est actif contre les prions et que c'est aussi un inhibiteur de l'activité de chaperon de protéines du ribosome (PFAR) (Tribouillard-Tanvier et al. 2008). Nous suggérons que l'activité antiprion de ses dérivés pourrait également être liée à l'inhibition de l'activité PFAR. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé l'expérience de repliement assisté *in vitro* de l'ACh en collaboration avec S. Sanyal et Y. Pang (Uppsala, Suède). L'ACh dénaturée est diluée dans son tampon en absence ou en présence de ribosome 70S d'*E.coli* qui permet le repliement assisté des protéines dénaturées. Le repliement correct de l'ACh dénaturée est évalué par la réapparition de son activité enzymatique. L'ACh dénaturée est capable d'auto-

repliement ce qui restaure environ 25% de son activité initiale. Grâce à l'activité PFAR portée par le ribosome d'*E. coli*, l'ACh peut retrouver jusqu'à 60% de son activité initiale. En présence de RF573, RF555 ou RF519, le repliement assisté par les ribosomes 70S est inhibé de façon dose-dépendante, cette inhibition étant complète en présence de 250 μM de ces molécules (figure 36). Nous pouvons conclure que ces 3 dérivés du GA sont aussi capables d'inhiber PFAR *in vitro*.

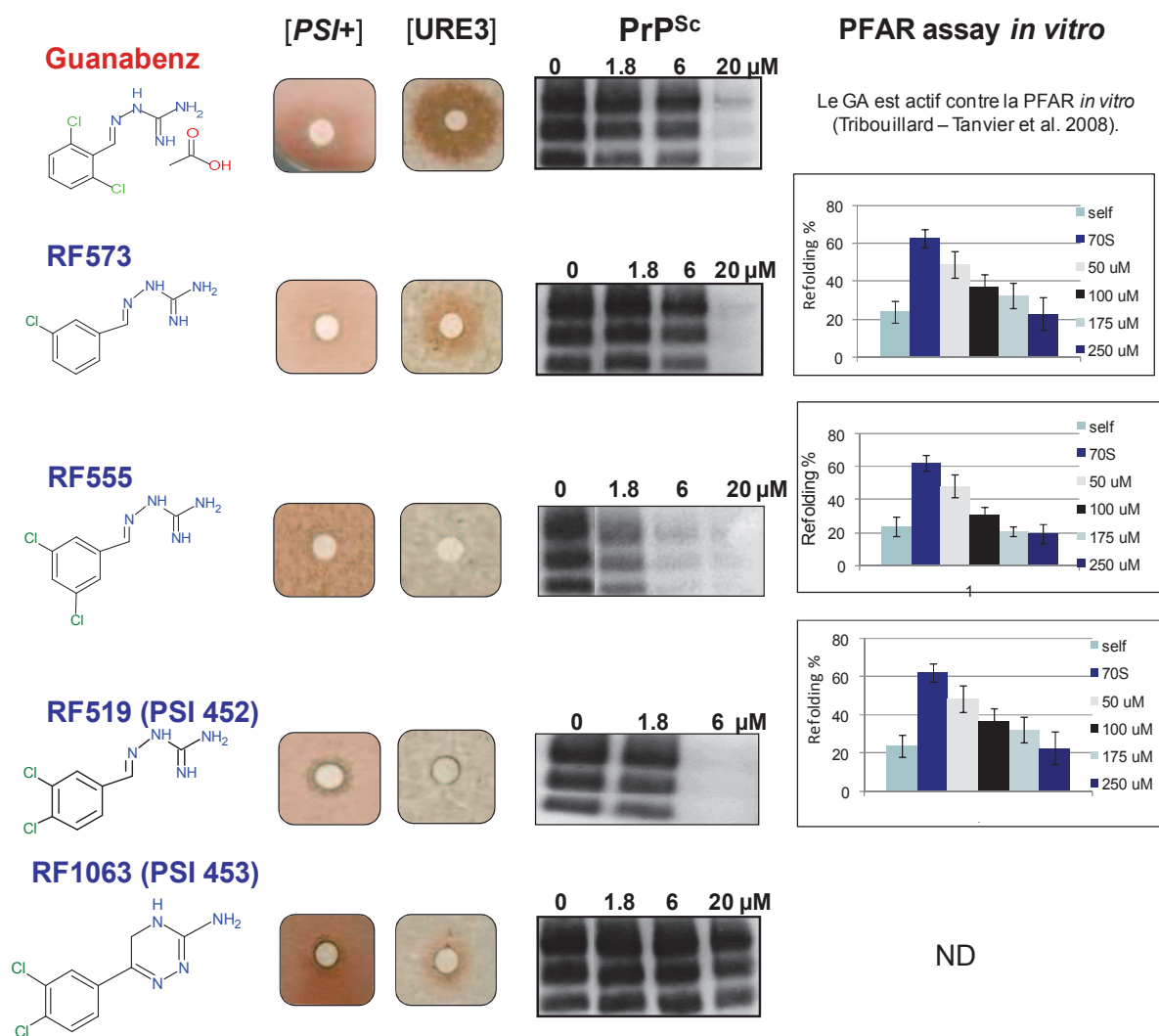


Figure 36. Activité antiprion et anti-PFAR de 4 dérivés du GA.

Ces 3 dérivés structurellement proches du GA possèdent une activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} et inhibent la PFAR *in vitro*. Le PSI 453 est actif contre les prions de levure [PSI+] et [URE3] mais il est inactif contre PrP^{Sc} en culture cellulaire. Son activité contre la PFAR n'a pas été déterminée car il interfère avec les substrats du test. Le PSI 453 est considéré comme la forme inactive du PSI 452.

Notre attention s'est portée sur la molécule RF519 (PSI 452) qui possède deux chlores en position 3 et 4 pouvant créer un encombrement stérique, ce qui pourrait l'empêcher de pénétrer dans la cellule de levure d'où son activité négative contre les prions de levure. Par contre, le PSI 452 est capable d'éliminer le prion PrP^{Sc} en culture cellulaire avec une IC₅₀ inférieure à 6 µM et possède une activité anti-PFAR. De plus, cette molécule a été testée dans le traitement de la douleur inflammatoire chez le rat, sa demi-vie est d'environ 2 heures et demie (Gaubert, Bertozzi et al. 2009) contre 6 heures pour Guanabenz. Le PSI 452 est donc un candidat intéressant pour la suite de notre étude.

L'activité contre le prion de mammifère PrP^{Sc} de PSI 452 et de PSI 453 (correspondant à la forme inactive de PSI 452) est actuellement évaluée dans un test organotypique, en collaboration avec Vincent Béringue et Sophie Halliez (INRA Jouy en Josas). Des tranches de cerveau de souris (TgOv) ont été mises en culture *ex vivo* pendant une semaine puis infectées par le prion. Une semaine après l'infection, les cultures organotypiques sont traitées par les molécules à tester. La révélation de la quantité de PrP^{Sc} après deux semaines de traitement indique l'activité antiprion de ces molécules. Nous attendons la confirmation de l'activité contre le prion PrP^{Sc} de PSI 452 et PSI 453 en culture organotypique qui est actuellement en cours.

Contrairement au GA, le PSI 452 ne possède pas d'activité agoniste des récepteurs α2 adrénergiques

Les agonistes des récepteurs α2 adrénergiques agissent en pré- et postsynaptiques. Les récepteurs α2 ont été classés en sous-types α2A, α2B et α2C en tenant compte de leurs ligands et de leurs profils pharmacologiques. Les récepteurs α2 adrénergiques sont des protéines hélicoïdales avec une partie extériorisée à laquelle se lie les agonistes et une partie internalisée couplée de façon réversible à une protéine Gi. Les protéines Gi, couplées à la guanosine diphosphate, dissocient le GDP en GTP lorsqu'elles sont activées, ce qui entraîne une diminution de l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) via l'inhibition de l'adénylate cyclase et donc une diminution de la contraction musculaire (Kamibayashi T et al. 2000).

En collaboration avec Frédéric Bihel et de JJ. Bourguignon, l'effet agoniste des récepteurs $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ et $\alpha 2C$ de la molécule RF519 (PSI 452) a été testé. Pour cela, le PSI 452 a été incubée avec des cellules CHO (pour $\alpha 2A$, $\alpha 2C$) ou des cellules HEK-293 (pour $\alpha 2B$). Brièvement, les cellules du contrôle ont été stimulées par des agonistes connus du récepteur $\alpha 2$ (Adrénaline à 1 μM ou Dexmédétomidine à 3 μM) pendant 15 jours. La présence des agonistes des récepteurs $\alpha 2$ adrénergiques diminue de la quantité d'AMPc produite par les cellules. En parallèle, les cellules non stimulées ont été traitées par le PSI 452 ou par la molécule de référence (Adrénaline ou Dexmédétomidine) à des concentrations de 1 nM à 3 μM . Après le traitement, le rapport de la quantité d'AMPc mesuré du contrôle (les cellules stimulées par l'Adrénaline ou par la Dexmédétomidine) sur celle de cellules traitées indique l'effet agoniste des récepteurs adrénergiques de la molécule testée.

Dans le cas du traitement par l'Adrénaline, plus la concentration en Adrénaline utilisée est grande, plus faible est la quantité d'AMPc produite par les cellules. A une forte concentration en Adrénaline, la quantité d'AMPc sera au même niveau que celle produite par les cellules du contrôle stimulé pendant 15 jours. Le pourcentage de la quantité en AMPc du contrôle sur celle de cellules traitées varie de 0% à 100% en fonction de la concentration en Adrénaline et 50% correspond à une concentration d'IC₅₀. Ici, les IC₅₀ de l'Adrénaline sont de 1,8 nM et de 6 nM pour les récepteurs $\alpha 2A$ et $\alpha 2C$, respectivement. De même pour la Dexmédétomidine, un agoniste de l' $\alpha 2B$, son IC₅₀ est de 35 nM. Dans le cas du traitement par le PSI 452 (de 1 nM à 3 μM), la quantité d'AMPc produite par les cellules ne diminue pas par rapport à celle des cellules du contrôle traité pendant 15 jours. Le PSI 452 ne possède donc pas d'activité agoniste des récepteurs adrénergiques $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$.

Grâce à la RSA autour du GA, nous avons finalement identifié le PSI 452. Un changement de position du chlore dans sa structure par rapport à celle du GA (de 2, 6 en 3, 4) a rendu le PSI 452 inactif contre les prions de levure [PSI⁺] et [URE3], ce qui est probablement dû à l'imperméabilité membranaire de la levure pour cette molécule. Par contre, le PSI 452 est actif contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo* avec une IC₅₀ inférieure à 6 μM . Ce composé présente également une activité anti-PFAR (IC₅₀ ~ 100 μM). Enfin, le PSI 452 ne possède pas d'activité agoniste des récepteurs adrénergiques $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ et $\alpha 2C$. Les changements structuraux effectués au niveau du groupe phényl aient probablement modifié l'affinité du PSI 452 pour les récepteurs adrénergiques d'où une perte de son activité d'agoniste des récepteurs

adrénergiques. Il n'y a pas de modification au niveau du groupe guanidine, ce qui permet au PSI 452 de conserver son activité antiprion. Cette molécule est donc particulièrement intéressante par son activité antiprion et non anti-hypertensive, contrairement au GA. Ces travaux seront prochainement publiés dans un journal à comité de lecture.

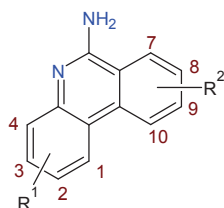
V.3.2 RSA autour de la 6-Amino phénanthridine (6AP)

Nous avons également réalisé une étude RSA autour de la 6-amino phénanthridine (6AP). La 6AP, comme le GA, est une molécule antiprion puissante qui agit sur l'activité chaperon de protéines du ribosome (Bach et al. 2003 ; Tribouillard-Tanvier et al, 2008). La 6AP est très active contre les prions, son IC_{50} est inférieure à 5 μ M. De nombreux dérivés de la 6AP ont été synthétisés par l'équipe d'Hervé Galons. Par les réactions de Suzuki, les couplages entre le 2-aminoboronique ester et le 2-halobenzonitrile ou entre le 2-cyanophenylboronique ester et le 2-haloaniline ont été réalisés pour former 20 dérivés de la 6AP. L'activité antiprion de ces molécules a été évaluée contre les prions de levure [PSI+] et [URE3]. Les molécules actives contre les prions de levure ont ensuite été testées contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (tableaux 13 et 14).

Dans cette étude de RSA autour de la 6AP, nous avons observé une corrélation entre l'activité contre les prions de levure [PSI+] et [URE3] et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6). En effet, tous les dérivés de la 6AP testés se sont révélés actifs contre les prions de levure [PSI+] et [URE3] sont également actifs contre le prion de mammifère PrP^{Sc} *ex vivo*. Ces résultats montrent une conservation des mécanismes de prionisation entre la levure et le mammifère. Nous avons remarqué que l'addition d'un groupement au niveau du groupe 6-amino aboutissent à une perte complète de l'activité antiprion (molécules 17a et 17b). De même, tous les changements en positions 1, 2, 3 causent également une activité antiprion négative (molécules 3d, 3j, 3o) (tableau 13). Au sein de la structure hétérocyclique, le remplacement d'un groupement phényle par une pyridine n'améliore pas l'activité antiprion mais la supprime (molécules 8a, 8b, 10a, 10b et 10c). De façon intéressante, la réduction de l'un des groupements phényles ne modifie pas l'activité antiprion qui est similaire à celle de la 6AP (molécules 14 et 15).

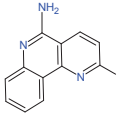
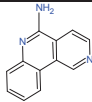
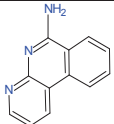
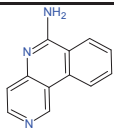
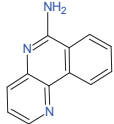
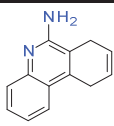
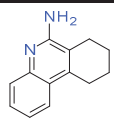
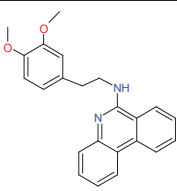
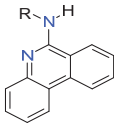
Les résultats de cette étude RSA montrent une conservation des mécanismes de prionisation entre la levure et les mammifères. Quelques molécules antiprion intéressantes ont été identifiées comme les molécules 14, 15 qui ont été sélectionnées pour tester leur activité antiprion contre PrP^{Sc} *in vivo* (en collaboration avec V. Béringue). Enfin, un manuscrit décrivant cette étude RSA autour de la 6AP est en cours de rédaction et devrait prochainement être publié dans un journal à comité de lecture.

Tableau 13. L'activité antiprion de la 6AP (3a) et de ses dérivés



Molécule	R ¹	R ²	[PSI ⁺]	[URE3]	PrP ^{Sc}	IC ₅₀
6AP (3a)	H	H	++++	+++	+	< 5 μM
3b	H	7-F	++	+	+	>20 μM
3c	H	8-F	+++	++	+	15 μM
3d	2-CH ₃	H	±	-	ND	ND
3e	H	9-CH ₃	+	+	ND	ND
3f	H	7-NO ₂	++	+	ND	ND
3g	H	8-NO ₂	++++	+++	+/-	20 μM
3h	H	9-NO ₂	+	-	+	< 5 μM
3i	H	9-SONHCH ₃	-	-	ND	ND
3j	2 CF ₃ O	H	±	-	ND	ND
3k	H	7-NH ₂	+++	++	+	30 μM
3l	H	8-NH ₂	+	-	ND	ND
3m	H	9-F	++++	++++	+	5 μM
3n	H	8-CF ₃	++++	++++	+	10 μM
3o	2,4-diOCH ₃	H	+/-	-	ND	ND
3p	H	8-N ₃	++++	++	+/-	10 μM

Tableau 14. L'activité antiprion de dérivés de la 6AP

Molécule	structure	[PSI ⁺]	[URE3]	PrP ^{Sc}	IC ₅₀
8a		-	-	ND	ND
8b		-	-	ND	ND
10a		-	-	ND	ND
10b		-	-	ND	ND
10c		-	-	ND	ND
14		++++	+++	+	< 5 μM
15		++++	+++	+	< 5 μM
17a		-	-	ND	ND
17b		-	-	ND	ND

VI Discussions et perspectives

VI.1 La PFAR est réellement impliquée dans les mécanismes de prionisation

L'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) a été identifiée comme la cible des molécules antiprion 6AP et Guanabenz (Tribouillard-Tanvier et al. 2008). Au cours de ma thèse, j'ai montré l'implication de la PFAR dans la prionisation, soit directement par la méthode de méthylation des nucléotides de l'ARN 25S du domaine V, soit indirectement par l'enrichissement en PFAR (mutants *ltv1Δ* et *yar1Δ*, ou surproduction de Bms1p). Or, chez la levure, le chaperon de protéines Hsp104p est un acteur cellulaire majeur dans la prionisation par son activité désagrégase. Hsp104p assure la stabilité du prion en désagrégeant les fibres amyloïdes en germes infectieux de petites tailles qui sont transmis au travers des générations. La surexpression ainsi que l'inhibition d'Hsp104p conduisent à une perte du prion au cours des générations. L'activité PFAR présente des caractéristiques similaires à celles d'Hsp104p. En effet, son enrichissement (souches *ltv1Δ*, *yar1Δ* et par surproduction de Bms1p) ou son inhibition par des molécules antiprion ou par méthylation dirigée aboutissent également à la déstabilisation de $[PSI^+]$. De plus, l'enrichissement en PFAR favorise l'apparition spontanée du prion $[PSI^+]$ à partir d'une souche $[psi^-]$, ce qui est également le cas d'Hsp104p. Après avoir analysé ces données, nous avons proposé une hypothèse selon laquelle il y aurait une redondance partielle entre PFAR et Hsp104p. Leurs activités chaperon de protéines combinées assureraient alors la stabilité du prion $[PSI^+]$ chez la levure et toute modification de leur niveau d'expression conduirait à une déstabilisation du prion.

La PFAR possède une activité partiellement redondante avec l'activité d'Hsp104 dans la prionisation chez la levure, mais elle ne peut pas totalement la remplacer. Chez les levures *hsp104^{-/-}*, une perte complète de $[PSI^+]$ a été observée malgré l'enrichissement en PFAR. Ce qui souligne le rôle majeur d'Hsp104p dans la prionisation chez la levure. La PFAR participe t-elle aussi à la protection des cellules à des conditions défavorables, comme le fait Hsp104p ? Hsp104p est avant tout un chaperon de protéines qui, avec les autres Hsps, protègent la cellule à des conditions de stress, notamment thermique (Linqvist and Craig, 1988). La souche *WT* ainsi que les souches enrichies en PFAR (*ltv1Δ* et *yar1Δ*) ont subi un choc thermique à 48°C afin d'évaluer si la PFAR a un rôle dans la thermotolérance. Nous

n'avons pas observé de différence au niveau de la survie cellulaire entre des souches sauvage et mutantes. L'enrichissement en PFAR n'a pas contribué à la survie des levures face à un choc thermique, contrairement à Hsp104p. L'activité PFAR est incapable d'assurer les mécanismes nécessaires à la survie cellulaire face à un choc thermique comme le fait Hsp104p car son impact est trop faible pour être mis en évidence seul. Pourtant, nous avons montré que l'enrichissement en PFAR a assisté le repliement de la Luciferase dans les cellules délétées ou non pour *HSP104* après un choc thermique. Nous pourrions dire que la PFAR est capable d'assister le repliement des protéines après un choc thermique mais son enrichissement seul est incapable de compenser les mécanismes biologiques nécessaires à la survie cellulaire face à un choc thermique. L'activité chaperon de la PFAR est donc partiellement redondante partielle avec celle d'Hsp104p chez la levure.

Toutes les molécules actives contre les prions de levure [*PSI+*] et [*URE3*] et contre le prion de mammifère PrP^{Sc} que nous avons identifiées ont systématiquement une activité anti-PFAR. Les molécules sont issues d'origines diverses, ont des structures différentes mais elles possèdent toutes une activité antiprion qui est parallèle avec la capacité d'inhiber de l'activité PFAR, cela suggère que la PFAR pourrait également être un acteur majeur impliqué dans les mécanismes de prionisation et conservé de levure au mammifère. L'activité PFAR pourrait être essentielle pour permettre à la protéine native atteindre sa conformation prion. Ou encore la PFAR, par son activité désagrégase, pourrait promouvoir la fragmentation partielle des agrégats permettant le maintien d'un nombre nécessaire de germes infectieux de prion ce qui favorise ainsi le maintien du prion au cours des générations. En absence d'homologue d'Hsp104p chez les mammifères, la PFAR semble seule être impliquée dans les mécanismes de l'apparition et du maintien du prion PrP^{Sc}. Tandis que les prions de levure se localisent dans le même compartiment cellulaire que le ribosome portant la PFAR, ce n'est pas le cas du prion mammifère PrP^{Sc} qui est majoritairement localisé à la surface cellulaire. Il est donc probable que l'activité PFAR soit indirectement impliquée dans la propagation du prion via le repliement d'un facteur cellulaire X qui est nécessaire à la réplication et le maintien du prion. En effet, des facteurs ou cofacteurs cellulaires pourraient être impliqués dans la conversion de la protéine PrP^C en forme pathologique PrP^{Sc}. L'implication d'un facteur cellulaire X serait nécessaire à la réplication ou au maintien du prion. Selon le modèle de nucléation assistée, le mécanisme de conversion de PrP^C en PrP^{Sc} fait intervenir d'un facteur X endogène qui interagit avec la PrP^C et la transformerait en une structure

intermédiaire PrP* puis en PrP^{Sc}. Ce facteur X qui dépendrait de la PFAR pour atteindre sa conformation active. Cependant, une implication directe de la PFAR dans la propagation de prion reste envisageable car la conversion de protéine prion PrP en conformation pathologique PrP^{Sc} peut également avoir lieu dans le cytoplasme. En effet, une accumulation de la conformation PrP^{Sc} a été détectée dans le cytoplasme suite à l'inhibition du protéasome 26S (Dron, Dandoy-Dron et al. 2009). Dans ce cas, la PFAR serait le facteur X.

Retour à la notion du prion, une protéine donnée peut adopter deux formes distinctes menant à deux phénotypes différents sans toucher le gène. Ce phénomène régule l'expression des protéines : qui est peut-être augmentée, diminuée ou inhibée selon la forme de protéine soit agrégée ou non. L'agrégation de protéines conduit à la pathologie, comme dans le cas des maladies à prions chez les mammifères. Mais dans d'autres cas, l'agrégation de protéines peut apporter des avantages à l'organisme dans lequel la protéine se trouve, par exemple, la protéine CPEB chez l'aplysie, sous forme agrégée, elle permet d'augmenter l'expression d'ARN dormants impliqués dans la mémoire à long terme, la protéine Curli chez la bactérie, sous forme agrégée favorise l'adhésion au substrat et des nombreux avantages apportés par des protéines sous forme prion chez les champignons. En outre, la conversion entre l'état native et agrégée de protéines chez la levure est modulée par l'activité chaperon de protéines d'Hsp104p et/ou de PFAR. Cela pose la question de l'origine biologique des prions : permettent-ils un avantage sélectif ou bien au contraire représentent-ils des accidents évolutifs ? Le prion est-il un ami ou un ennemi ? Ces questions font l'objet d'un débat qui est toujours d'actualité.

VI.2 La PFAR et les maladies du mauvais repliement des protéines

Il existe des parallèles frappants entre les maladies à prions et d'autres maladies associées à un mauvais repliement des protéines, notamment d'autres maladies neurodégénératives qui sont caractérisées par l'accumulation progressive d'agrégats protéiques dans des zones définies du cerveau. En effet, les maladies à prions et les maladies neurodégénératives sont des maladies conformationnelles qui impliquent à des fibres amyloïdes. Dans chacune de ces protéinopathies, les agrégats sont dus à un repliement différentiel d'une ou de plusieurs protéines spécifiques : le peptide amyloïde A β et Tau dans la maladie d'Alzheimer, l' α -synuclein dans la maladie de Parkinson, l'Huntingtin dans la maladie de Huntington et la protéine PrP dans les maladies à prions (Ross et Poirier, 2004). Bien que ces protéines soient très diverses dans leurs séquences primaires et leurs fonctions cellulaires et soient localisées dans des compartiments cellulaires différents, elles ont pour caractéristique commune leur repliement différentiel qui mène à la formation de fibres amyloïdes.

(i) La maladie d'Alzheimer

C'est la plus connue et la plus répandue des maladies neurodégénératives. Elle est caractérisée par la présence de deux types d'amyloïdes des agrégats du peptide amyloïde A β et des dépôts d'enchevêtrements de fibrilles causées par l'agrégation de la protéine du cytosquelette Tau. L'apparition de ces lésions est corrélée à un dysfonctionnement et une dégénérescence synaptique ainsi qu'à la mort neurale dans des régions du cerveau impliquées dans l'apprentissage et la mémorisation (Mattson, 1997). Les femmes sont plus touchées que les hommes, leur risque relatif s'établit entre 1,5 et 2 cas pour 1 cas masculin. L'estimation de prévalence la plus souvent avancée de la maladie d'Alzheimer est de 0,5 % avant 65 ans, 2 à 4 % après. Mais elle augmente fortement avec l'âge, pour atteindre 15 % à 80 ans. En France, le nombre de malades est estimé à plus de 800 000 personnes et devrait atteindre deux millions en 2020.

(ii) La maladie d'Huntington

La maladie de Huntington (autrefois appelée Chorée de Huntington) est une maladie héréditaire qui se traduit par une dégénérescence neuronale affectant les fonctions motrices et cognitives. La protéine mutée à l'origine de cette maladie génétique autosomale dominante est l'Huntingtin (Htt) qui porte un domaine polyglutamine (polyQ) dans sa partie N-terminale. Chez les patients atteints de cette maladie, une augmentation de la taille du domaine polyQ est observée (d'environ 20Q dans la protéine Htt sauvage, ce nombre peut dépasser 100) et cette augmentation de la taille du domaine polyQ est liée de façon proportionnelle à la capacité d'agrégation de la protéine Htt sous forme de fibre amyloïdes et à l'apparition des symptômes cliniques de la maladie (Cowan et Raymond, 2006). La maladie de Huntington est une maladie rare dont la prévalence est de 5 à 7 malades pour 100 000 au sein de la population caucasienne (Walker F.O, 2007). Elle se développe chez des personnes âgées en moyenne de 40 à 50 ans et le nombre de malades estimé en France est de 6 000 cas.

(iii) La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une pathologie chronique neurodégénérative. Elle est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques conduisant le patient à une déficience progressive de la capacité à contrôler les mouvements de son corps. Le marqueur biologique de la maladie est l'apparition de corps de Lewy (inclusion cytoplasmique composée essentiellement de la protéine α -synuclein). Elle débute le plus souvent entre 45 et 70 ans. La maladie de Parkinson est une maladie qui évolue insidieusement. Son évolution dépend beaucoup de la rapidité de la mise en œuvre des traitements. Elle aboutit malheureusement peu à peu à une perte d'autonomie des patients.

(iv) La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est la plus importante des maladies du motoneurone. Elle est la maladie neurologique chronique la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle est caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones moteurs du cortex cérébral avec

destruction consécutive du faisceau pyramidal. La motricité qui est touchée dans la maladie concerne donc aussi bien la mobilité du visage (sourire, parole, mouvement de la langue, faculté d'avaler ou de parler) que celle des bras et des jambes. Elle touche les deux sexes et son incidence augmente avec l'âge à partir de 40 ans. Des mutations d'un gène appelé *FUS/TLS* situé sur le chromosome 16 sont responsables de certaines formes familiales rares de SLA. Cette protéine s'accumule anormalement dans des motoneurons et empêchent ainsi leur fonctionnement normal. Une autre protéine, la TDP43 (TAR-DNA binding protein 43 kDa), qui est également impliquée dans d'autres formes familiales de SLA. Les protéines TDP43 et Fus ont un rôle régulateur sur les ARN messagers.

La PFAR pourrait être impliquée dans les maladies associées à un mauvais repliement des protéines

Au delà du domaine des prions, la PFAR pourrait également être impliquée dans les mécanismes de contrôle cellulaire d'autres maladies du mauvais repliement des protéines. Bien que ces maladies diffèrent par les protéines impliquées et leurs localisations cellulaires, elles ont comme une caractéristique commune le repliement différentiel de protéines qui mène à la formation de fibres amyloïde. Il existe des ressemblances entre les maladies à prion et les maladies neurodégénératives. Par exemple, la protéine prion et le peptide amyloïde A β ont quelques similarités physico-chimiques et de séquence à des endroits particuliers, ce qui permet la liaison avec des ions Cu²⁺ ou Zn²⁺ (Barnham, Cappei et al, 2006). Les ressemblances entre les maladies à prions et la maladie d'Alzheimer sont l'implication des ROS, l'implication des ions métalliques ou encore la capacité des protéines à former des agrégats. Enfin, la principale ressemblance est le côté « prion-like » des maladies neurodégénératives. En effet, la propagation de protéines agrégées associées à la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington du zone infecté à un zone non infecté du cerveau peut se faire par des mécanismes similaires à celle de transmission du prion (Brundin, Melki et al. 2010 ; B Frost and M Diamond 2010 ; Goedert, Clavaguera et al. 2010).

En plus, de nombreuses études montrent que les molécules antiprion et anti-PFAR, notamment la 6AP et le GA sont également actives dans l'autres modèles de maladies associées à un mauvais repliement des protéines :

- La 6AP et le GA réduisent l'agrégation de l'Htt mutée *ex vivo* dans des modèles de cellules de mammifère de la maladie d'Huntington (M. Blondel & A. Bertolotti, European patient application).
- Le GA diminue la toxicité suite à l'agrégation de la protéine TDP43 dans un modèle de *C. elegans* de sclérose latérale amyotrophique (SLA) en réduisant les réponses de stress au niveau du réticulum endoplasmique (Vaccro et al. 2013).
- La 6AP et le GA sont actives dans un modèle de drosophile pour l'OPMD (Oculopharyngeal Muscular Dystrophy) ou la dystrophie musculaire oculo-pharyngée, une maladie myodégénérative dominante héréditaire liée à la formation de fibres amyloïdes par la forme mutée de la protéine PABPN1 (Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1) (Barbezier, Chartier et al. 2011). La forme mutée de PABPN1 contient une expansion d'un domaine poly-alanine (PolyA) dans sa partie N-terminale. La protéine PABPN1 mutée forme des inclusions nucléaires fibrillaires dans les cellules musculaires squelettiques, ce qui conduit à leur dégénérescence par apoptose. La pathologie se déclare lorsque la taille du domaine polyA dépasse 17 alanines (PABPN1 sauvage contient de 10 ou 11 alanines). Dans le modèle drosophile OPMD, la PABPN1 contenant une expansion de 17 alanines est exprimé conduisant à une dégénérescence des cellules musculaires, ce qui est supprimé par le traitement par la 6AP et le GA.
- La Metixène, une molécule utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, se révèle également active contre les prions de levure et de mammifère en agissant contre la PFAR.

L'ensemble de ces observations suggère un chevauchant des mécanismes cellulaires contrôlant les maladies à prion et les maladies neurodégénératives et que la PFAR pourrait être impliquée non seulement dans les maladies à prions mais en général dans les maladies associées à un mauvais repliement des protéines.

Le modèle levure est largement utilisé pour étudier les maladies associées à un mauvais repliement des protéines comme pour étudier de l'Htt, α synuclein, $A\beta$, TDP43. Nous pouvons utiliser des modèles levures de maladies neurodégénératives et déterminer l'implication de la PFAR. Par exemple dans le cas de la maladie

d'Huntington, la protéine responsable est l'Huntingtin (Htt) qui porte un domaine polyglutamine (polyQ) à son extrémité N-terminale. La taille du polyQ est proportionnelle à l'agrégation de la protéine Htt sous forme de fibres amyloïdes et à l'apparition des symptômes cliniques de la maladie (Cowan ad Raymond 2006). Chez la levure, le domaine polyQ seul ne suffit pas pour entraîner une toxicité, cette séquence polyQ devient toxique pour les cellules uniquement lorsqu'elle est exprimée dans une souche [*PRION+*] comme [*PSI+*] ou [*PIN+*] (Zhao et al 2012). Nous pouvons donc exprimer la protéine Htt contenant des tailles différentes du motif polyQ et ensuite évaluer l'impact de la PFAR dans la toxicité causée par polyQ. Nous pouvons ensuite moduler l'expression de la PFAR (enrichissement ou inhibition) et déterminer quels sont des impacts sur l'agrégation et la toxicité de la polyQ. De même pour les autres maladies du mauvais repliement, nous pouvons étudier le rôle universel de la PFAR dans des souches exprimant l'A β 42 pour la maladie d'Alzheimer, l' α -synuclein pour la maladie de Parkinson, TDP43 et Fus pour la SLA ; et PABPN1 pour la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD), une maladie neuromusculaire.

Sur ces modèles de levure de maladies associées à un mauvais repliement de protéines, nous pouvons également tester l'activité contre les effets dus à l'agrégation de protéines responsables des maladies neurodégénératives de nos molécules antiprion afin d'identifier des molécules qui sont actives non seulement contre les prions mais également sur l'agrégation des protéines en général. Ces molécules actives identifiées seraient des outils efficaces pour étudier les maladies associées à un mauvais repliement des protéines.

Le rôle de la PFAR en général ?

Plus généralement, il sera intéressant de déterminer le(s) rôle(s) de PFAR en conditions physiologiques (hors prion et hors pathologie). Une extrême conservation de la structure et des fonctions du ribosome au cours de l'évolution suggèrent que l'activité PFAR est probablement un mécanisme cellulaire universel et central.

- La PFAR pourrait être un élément du réseau de chaperon de protéines. En effet, il y a des chaperons de protéines cytosoliques dont l'expression est réprimée par le stress cellulaire et qui sont fonctionnellement et

physiquement associées à la machinerie de synthèse protéique chez la levure *S. cerevisiae*. Ces chaperons font partie du groupe CLIPS (Chaperones linked to protein synthesis) (Albanese et al. 2006), qui sont associés aux polypeptides naissant encore attachés au ribosome et participent au repliement *de novo* des protéines.

- Chez la levure, la Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction, lorsqu'elle est sous forme prion [PS/+], elle stimule fortement le décalage du cadre de lecture du gène OAZ1 et permet ainsi d'augmenter la quantité d'antizyme dans la cellule (Namy O et al. 2008). L'antizyme régule négativement la biosynthèse des polyamines en provoquant la dégradation de l'ornithine décarboxylase. Le prion [PS/+] réduit donc le niveau intracellulaire de polyamines qui joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. En modulant l'état prion et non prion de sup35p, L'activité PFAR pourrait être impliquée dans ces régulations

Et des autres questions concernant les rôles de l'activité PFAR dans les processus de contrôle cellulaire, les facteurs régulant la PFAR. Les réponses à ces questions pourraient permettre d'identifier les rôles exacts de la PFAR et la placer dans les réseaux biologiques.

VI.3 Identification de nouvelles molécules antiprion et caractérisation de nouveaux acteurs cellulaires impliqués dans les mécanismes de prionisation.

Le criblage de composés antiprion basé sur le modèle levure suivi par l'essai basé sur PrP^{Sc} en culture cellulaire (MovS6) est une méthode efficace permettant d'identifier des molécules antiprion actives de la levure au mammifère. Des nombreuses molécules issues de diverses chimiothèques comme la chimiothèque de l'institut Curie, la chimiothèque Prestwick, TEBU, les chimiothèques de Strasbourg (CNS et RFM), ont été criblées grâce à ce système levure. Nous avons identifié plusieurs molécules antiprion parmi elles l'Imiquimod, la Flunarizine. Toutes ces molécules sont anti-PFAR. Ces molécules sont déjà en clinique et peuvent être des candidats potentiels pour le traitement de maladies à prion.

A ce jour, nous avons identifié des molécules antiprion qui agissent uniquement contre l'activité PFAR. Cela peut être dû à l'origine des chimiothèques criblées. Le criblage de molécules plus diversifiées devrait augmenter la probabilité de trouver des composés antiprion qui n'agissent pas sur la PFAR, ou encore due à la méthode de criblage, une quantité sub-optimale de GuHCl, un inhibiteur d'Hsp104p, est directement ajoutée dans les milieux de criblage permettant d'augmenter la sensibilité du test de criblage (Bach, Talarek et al. 2003), ce qui ne permettrait d'identifier que des molécules anti-PFAR. En effet, Hsp104p et la PFAR sont partiellement redondantes dans les mécanismes de prionisation chez la levure. L'ajout du GuHCl dans les milieux de criblage favorise donc l'identification des molécules actives contre la PFAR. Une autre explication plus acceptable est que la PFAR est la cible unique des molécules antiprion. Dans ce cas nous avons identifié l'acteur cellulaire principal impliqué dans les mécanismes de prionisation. La PFAR serait une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des maladies à prions. Ce serait une avancée notable pour la thérapie des maladies à prion.

Nous allons poursuivre le criblage de chimiothèques afin d'identifier de nouvelles molécules antiprion interagissant avec des acteurs cellulaires autres que la PFAR et dont l'action pourrait potentiellement affecter d'autres mécanismes impliqués dans la formation et/ou la propagation du prion. En effet, les mécanismes biologiques contrôlant la prionisation sont encore largement obscurs. Ces nouvelles molécules antiprion identifiées vont donc nous servir d'outil pour une approche fondamentale.

Nous disposons de deux types d'approches pour identifier les cibles, autres que la PFAR, des nouvelles molécules antiprion :

- (i) Une approche biochimique par chromatographie d'affinité sur molécules antiprion immobilisées (Guiffant et al. 2007 ; Tribouillard-Tanvier et al. 2007 ; Tribouillard-Tanvier et al, 2008). Cette méthode consiste à greffer les molécules antiprion aux billes de sépharose et serviront de matrice afin d'identifier leurs cibles intracellulaires. Les protéines (de levure ou de mammifères) interagissant avec ces molécules seront ensuite identifiées par spectrométrie de masse.
- (ii) Une approche génétique dans laquelle nous identifierons des ADNc (de levure ou de mammifères) dont la surexpression empêche ou perturbe l'effet antiprion des molécules. Ces approches sont nombreuses telles que

(1) HIP (haploInsufficiency Profiling) : c'est une collection de souches de levure diploïdes contenant une délétion d'un des deux allèles de chaque gène. Le but de ce crible est d'identifier des mutants hypersensibles aux molécules testés. (2) SLS (Synthetic Lethality Screen) : c'est une collection de souches haploïdes de levure délétées pour chacun des gènes de levure. Si certaines souches sont sensibles à la molécule antiprion testée, le gène délété pourrait être une cible. (3) OES (genome wide OverExpression Screen) permet l'identification des gènes dont la surexpression confère une résistance au traitement par une molécule antiprion.

Une fois les cibles potentielles de nos molécules identifiées, nous vérifierons génétiquement si l'inactivation de ces cibles est capable de conduire à une cure des prions chez la levure ou dans différents systèmes basés sur l'utilisation de cellules de mammifère.

VII Conclusion

Les maladies à prions fascinent toujours les chercheurs particulièrement curieux, depuis l'apparition de la maladie de la « vache folle » et la transmission à l'homme, ce qui a causé la crise sanitaire et socio-économique, ou la crise de « vache folle ». Cependant, beaucoup de questions restent partiellement ou totalement sans réponses telles que : Quel est le mécanisme de conversion de PrP^C en PrP^{Sc} ? Quels sont les facteurs cellulaires impliqués dans les mécanismes de conversion ? Quels sont les mécanismes moléculaires de prionisation ? En étudiant les prions de levure *S. cerevisiae*, nous avons établi le rôle de l'activité chaperon de protéines du ribosome (PFAR) dans les mécanismes de prionisation, ce qui constitue une grande avancée de la recherche dans le domaine des prions. Cela pourrait ouvrir la voie vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la prionisation mais aussi pour la mise en place de stratégies thérapeutiques et de nouvelles méthodes de diagnostic pour les maladies à prion. De plus, de meilleures connaissances concernant la biologie des prions pourraient constituer des pistes thérapeutiques potentielles et nouvelles pour le traitement de maladies associées à un mauvais repliement de protéine, notamment pour les maladies neurodégénératives. Il s'agit d'un enjeu médical, scientifique, social et économique majeur dans les pays développés où l'espérance de vie s'accroît régulièrement depuis des années.

BIBLIOGRAPHIE

- Abid, K. and C. Soto (2006). "The intriguing prion disorders." *Cell Mol Life Sci* **63**(19-20): 2342-51.
- Aguzzi, A., M. Heikenwalder, et al. (2007). "Insights into prion strains and neurotoxicity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 552-61.
- Aguzzi, A., M. Nuvolone, et al. "The immunobiology of prion diseases." *Nat Rev Immunol*.
- Aguzzi, A. and M. Polymenidou (2004). "Mammalian prion biology: one century of evolving concepts." *Cell* **116**(2): 313-27.
- Aigle, M. and F. Lacroute (1975). "Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast." *Mol Gen Genet* **136**(4): 327-35.
- Albanese, V., A. Y. Yam, et al. (2006). "Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells." *Cell* **124**(1): 75-88.
- Alberti, S., R. Halfmann, et al. (2009). "A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins." *Cell* **137**(1): 146-58.
- Allen, K. D., R. D. Wegrzyn, et al. (2005). "Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [PSI+]." *Genetics* **169**(3): 1227-42.
- Alper, T., W. A. Cramp, et al. (1967). "Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?" *Nature* **214**(5090): 764-6.
- Archer, F., C. Bachelin, et al. (2004). "Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection." *J Virol* **78**(1): 482-90.
- Arnold, J. E., C. Tipler, et al. (1995). "The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain." *J Pathol* **176**(4): 403-11.
- Asante, E. A., I. Gowland, et al. (2002). "Expression pattern of a mini human PrP gene promoter in transgenic mice." *Neurobiol Dis* **10**(1): 1-7.
- Bach, S., N. Talarek, et al. (2003). "Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay." *Nat Biotechnol* **21**(9): 1075-81.
- Bach, S., D. Tribouillard, et al. (2006). "A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions." *Methods* **39**(1): 72-7.
- Barbezier, N., A. Chartier, et al. "Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy." *EMBO Mol Med* **3**(1): 35-49.
- Barbezier, N., A. Chartier, et al. (2011). "Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy." *EMBO Mol Med* **3**(1): 35-49.
- Barnham, K. J., R. Cappai, et al. (2006). "Delineating common molecular mechanisms in Alzheimer's and prion diseases." *Trends Biochem Sci* **31**(8): 465-72.
- Baron, G. S., K. Wehrly, et al. (2002). "Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes." *Embo J* **21**(5): 1031-40.
- Barret, A., F. Tagliavini, et al. (2003). "Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases." *J Virol* **77**(15): 8462-9.
- Basler, K., B. Oesch, et al. (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." *Cell* **46**(3): 417-28.
- Basu, A., D. Samanta, et al. (2008). "Protein folding following synthesis in vitro and in vivo: association of newly synthesized protein with 50S subunit of *E. coli* ribosome." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(2): 592-7.
- Benkemoun, L. and S. J. Saupe (2006). "Prion proteins as genetic material in fungi." *Fungal Genet Biol* **43**(12): 789-803.
- Bera, A. K., B. Das, et al. (1994). "Refolding of denatured restriction endonucleases with ribosomal preparations from *Methanosarcina barkeri*." *Biochem Mol Biol Int* **32**(2): 315-23.

- Beringue, V., K. T. Adjou, et al. (2000). "Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent." *J Virol* **74**(12): 5432-40.
- Beringue, V., A. Bencsik, et al. (2006). "Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy." *PLoS Pathog* **2**(10): e112.
- Beringue, V., A. Le Dur, et al. (2008). "Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD." *PLoS One* **3**(1): e1419.
- Bessen, R. A., D. A. Kocisko, et al. (1995). "Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein." *Nature* **375**(6533): 698-700.
- Bonander, N., R. A. Darby, et al. (2009). "Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield." *Microb Cell Fact* **8**: 10.
- Bounhar, Y., Y. Zhang, et al. (2001). "Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis." *J Biol Chem* **276**(42): 39145-9.
- Bousset, L., H. Belrhali, et al. (2001). "Crystal structures of the yeast prion Ure2p functional region in complex with glutathione and related compounds." *Biochemistry* **40**(45): 13564-73.
- Brachmann, A., U. Baxa, et al. (2005). "Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious." *Embo J* **24**(17): 3082-92.
- Bradley, M. E., H. K. Edskes, et al. (2002). "Interactions among prions and prion "strains" in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** Suppl 4: 16392-9.
- Bradley, M. E. and S. W. Liebman (2004). "The Sup35 domains required for maintenance of weak, strong or undifferentiated yeast [PSI+] prions." *Mol Microbiol* **51**(6): 1649-59.
- Brown, D. R., K. Qin, et al. (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." *Nature* **390**(6661): 684-7.
- Brundin, P., R. Melki, et al. "Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(4): 301-7.
- Brundin, P., R. Melki, et al. (2010). "Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(4): 301-7.
- Budka, H. (2000). "Histopathology and immunohistochemistry of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs)." *Arch Virol Suppl*(16): 135-42.
- Bueler, H., A. Aguzzi, et al. (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." *Cell* **73**(7): 1339-47.
- Buschmann, A. and M. H. Groschup (2005). "Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle." *J Infect Dis* **192**(5): 934-42.
- Byrne, L. J., B. S. Cox, et al. (2007). "Cell division is essential for elimination of the yeast [PSI+] prion by guanidine hydrochloride." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28): 11688-93.
- Cai, H., M. Hauser, et al. (2007). "Differential regulation and substrate preferences in two peptide transporters of *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* **6**(10): 1805-13.
- Caughey, B., R. E. Race, et al. (1989). "Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells." *J Virol* **63**(1): 175-81.
- Caughey, B. and G. J. Raymond (1991). "The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive." *J Biol Chem* **266**(27): 18217-23.
- Caughey, B., G. J. Raymond, et al. (2001). "Interactions and conversions of prion protein isoforms." *Adv Protein Chem* **57**: 139-69.
- Caughey, B. W., A. Dong, et al. (1991). "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy." *Biochemistry* **30**(31): 7672-80.
- Cavaille, J., M. Nicoloso, et al. (1996). "Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides." *Nature* **383**(6602): 732-5.
- Chattopadhyay, S., B. Das, et al. (1994). "Refolding of denatured lactate dehydrogenase by *Escherichia coli* ribosomes." *Biochem J* **300** (Pt 3): 717-21.
- Chattopadhyay, S., B. Das, et al. (1996). "Reactivation of denatured proteins by 23S ribosomal RNA: role of domain V." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8284-7.
- Chattopadhyay, S., S. Pal, et al. (1999). "Protein folding in *Escherichia coli*: role of 23S ribosomal RNA." *Biochim Biophys Acta* **1429**(2): 293-8.

- Chernoff, Y. O., I. L. Derkach, et al. (1993). "Multicopy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **24**(3): 268-70.
- Chernoff, Y. O., S. L. Lindquist, et al. (1995). "Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]." Science **268**(5212): 880-4.
- Chernoff, Y. O., S. M. Uptain, et al. (2002). "Analysis of prion factors in yeast." Methods Enzymol **351**: 499-538.
- Chesebro, B., R. Race, et al. (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain." Nature **315**(6017): 331-3.
- Chesebro, B., M. Trifilo, et al. (2005). "Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie." Science **308**(5727): 1435-9.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, et al. (2002). "Cellular prion protein transduces neuroprotective signals." Embo J **21**(13): 3317-26.
- Chien, P., J. S. Weissman, et al. (2004). "Emerging principles of conformation-based prion inheritance." Annu Rev Biochem **73**: 617-56.
- Coffman, J. A., H. M. el Berry, et al. (1994). "The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **176**(24): 7476-83.
- Cohen, F. E., K. M. Pan, et al. (1994). "Structural clues to prion replication." Science **264**(5158): 530-1.
- Colby, D. W. and S. B. Prusiner "Prions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a006833.
- Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." Annu Rev Neurosci **24**: 519-50.
- Collinge, J., M. S. Palmer, et al. (1995). "Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein." Nature **378**(6559): 779-83.
- Collinge, J., J. Whitfield, et al. (2006). "Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods." Lancet **367**(9528): 2068-74.
- Collins, S. J., V. Lewis, et al. (2002). "Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model." Ann Neurol **52**(4): 503-6.
- Coppin, E., R. Debuchy, et al. (1997). "Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes." Microbiol Mol Biol Rev **61**(4): 411-28.
- Cordeiro, Y., F. Machado, et al. (2001). "DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation." J Biol Chem **276**(52): 49400-9.
- Couplan, E., R. S. Aiyar, et al. "A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(29): 11989-94.
- Coustou-Linares, V., M. L. Maddelein, et al. (2001). "In vivo aggregation of the HET-s prion protein of the fungus *Podospora anserina*." Mol Microbiol **42**(5): 1325-35.
- Coustou, V., C. Deleu, et al. (1997). "The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9773-8.
- Couzin, J. (2002). "Molecular biology. In yeast, prions' killer image doesn't apply." Science **297**(5582): 758-61.
- Cowan, C. M. and L. A. Raymond (2006). "Selective neuronal degeneration in Huntington's disease." Curr Top Dev Biol **75**: 25-71.
- Cox, B., F. Ness, et al. (2003). "Analysis of the generation and segregation of propagons: entities that propagate the [PSI+] prion in yeast." Genetics **165**(1): 23-33.
- Cox, B. S. (1971). "A recessive lethal super-suppressor mutation in yeast and other psi phenomena." Heredity (Edinb) **26**(2): 211-32.
- Crow, E. T., Z. Du, et al. "A small, glutamine-free domain propagates the [SWI(+)] prion in budding yeast." Mol Cell Biol **31**(16): 3436-44.
- Crozet, C., F. Flamant, et al. (2001). "Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene." J Virol **75**(11): 5328-34.
- Das, B., S. Chattopadhyay, et al. (1996). "In vitro protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA." Eur J Biochem **235**(3): 613-21.
- Das, D., A. Das, et al. (2008). "Role of the ribosome in protein folding." Biotechnol J **3**(8): 999-1009.

- DeBurman, S. K., G. J. Raymond, et al. (1997). "Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13938-43.
- Decatur, W. A., X. H. Liang, et al. (2007). "Identifying effects of snoRNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome." *Methods Enzymol* **425**: 283-316.
- Deleault, N. R., R. W. Lucassen, et al. (2003). "RNA molecules stimulate prion protein conversion." *Nature* **425**(6959): 717-20.
- DePace, A. H., A. Santoso, et al. (1998). "A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion." *Cell* **93**(7): 1241-52.
- Derdowski, A., S. S. Sindi, et al. "A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity." *Science* **330**(6004): 680-3.
- Derkatch, I. L., M. E. Bradley, et al. (2000). "Dependence and independence of [PSI(+)] and [PIN(+)] : a two-prion system in yeast?" *EMBO J* **19**(9): 1942-52.
- Derkatch, I. L., M. E. Bradley, et al. (1999). "The PNM2 mutation in the prion protein domain of SUP35 has distinct effects on different variants of the [PSI+] prion in yeast." *Curr Genet* **35**(2): 59-67.
- Derkatch, I. L., Y. O. Chernoff, et al. (1996). "Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **144**(4): 1375-86.
- Deslys, J. P., C. I. Lasmezas, et al. (2001). "Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy." *Vet J* **161**(1): 1-3.
- Dickinson, A. G., V. M. Meikle, et al. (1968). "Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice." *J Comp Pathol* **78**(3): 293-9.
- Dirikoc, S., S. A. Priola, et al. (2007). "Nonpsychoactive cannabidiol prevents prion accumulation and protects neurons against prion toxicity." *J Neurosci* **27**(36): 9537-44.
- Doel, S. M., S. J. McCready, et al. (1994). "The dominant PNM2- mutation which eliminates the psi factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of a missense mutation in the SUP35 gene." *Genetics* **137**(3): 659-70.
- Donne, D. G., J. H. Viles, et al. (1997). "Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13452-7.
- Doyle, S. M. and S. Wickner (2009). "Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines." *Trends Biochem Sci* **34**(1): 40-8.
- Dron, M., F. Dandoy-Dron, et al. (2009). "Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrPSc into aggresomes within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells." *J Gen Virol* **90**(Pt 8): 2050-60.
- Du, Z., K. W. Park, et al. (2008). "Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nat Genet* **40**(4): 460-5.
- Eaglestone, S. S., B. S. Cox, et al. (1999). "Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism." *Embo J* **18**(7): 1974-81.
- Eaglestone, S. S., L. W. Ruddock, et al. (2000). "Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1): 240-4.
- Ederth, J., C. S. Mandava, et al. (2009). "A single-step method for purification of active His-tagged ribosomes from a genetically engineered *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **37**(2): e15.
- Estelle F , Simons R. "Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress". *Allergy and Clinical Immunology*. volume 128, issue 6. 1139-1150.e4.
- Falsig, J., T. Sonati, et al. "Prion pathogenesis is faithfully reproduced in cerebellar organotypic slice cultures." *PLoS Pathog* **8**(11): e1002985.
- Fernandez-Bellot, E. and C. Cullin (2001). "The protein-only theory and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the prions and the propagons." *Cell Mol Life Sci* **58**(12-13): 1857-78.
- Ferreira, P. C., F. Ness, et al. (2001). "The elimination of the yeast [PSI+] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation." *Mol Microbiol* **40**(6): 1357-69.
- Ford, M. J., L. J. Burton, et al. (2002). "A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS." *Neuroscience* **111**(3): 533-51.

- Ford, M. J., L. J. Burton, et al. (2002). "Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse." *Neuroscience* **113**(1): 177-92.
- Frost, B. and M. I. Diamond "Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **11**(3): 155-9.
- Frost, B. and M. I. Diamond (2009). "The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease." *Prion* **3**(2): 74-7.
- Frost, B. and M. I. Diamond (2010). "Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **11**(3): 155-9.
- Frydman, J. (2001). "Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones." *Annu Rev Biochem* **70**: 603-47.
- Gabizon, R., H. Rosenmann, et al. (1993). "Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)." *Am J Hum Genet* **53**(4): 828-35.
- Gaubert, G., F. Bertozzi, et al. (2009). "Discovery of selective nonpeptidergic neuropeptide FF2 receptor agonists." *J Med Chem* **52**(21): 6511-4.
- Gelperin, D. M., M. A. White, et al. (2005). "Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection." *Genes Dev* **19**(23): 2816-26.
- Ghosh, J., A. Basu, et al. (2003). "Ribosome-DnaK interactions in relation to protein folding." *Mol Microbiol* **48**(6): 1679-92.
- Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, et al. (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." *Science* **161**(3839): 388-9.
- Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, et al. (1978). "Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(12): 6268-70.
- Gilks, N., N. Kedersha, et al. (2004). "Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5383-98.
- Glass, N. L., D. J. Jacobson, et al. (2000). "The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi." *Annu Rev Genet* **34**: 165-186.
- Glover, J. R., A. S. Kowal, et al. (1997). "Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*." *Cell* **89**(5): 811-9.
- Goedert, M., F. Clavaguera, et al. "The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases." *Trends Neurosci* **33**(7): 317-25.
- Goedert, M., F. Clavaguera, et al. (2010). "The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases." *Trends Neurosci* **33**(7): 317-25.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, et al. (1996). "Life with 6000 genes." *Science* **274**(5287): 546, 563-7.
- Goldfarb, L. G., P. Brown, et al. (1990). "Identical mutation in unrelated patients with Creutzfeldt-Jakob disease." *Lancet* **336**(8708): 174-5.
- Goldfarb, L. G., E. Mitrova, et al. (1990). "Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia." *Lancet* **336**(8713): 514-5.
- Goren, M. Z. and F. Onat (2007). "Ethosuximide: from bench to bedside." *CNS Drug Rev* **13**(2): 224-39.
- Govaerts, C., H. Wille, et al. (2004). "Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8342-7.
- Graner, E., A. F. Mercadante, et al. (2000). "Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis." *Brain Res Mol Brain Res* **76**(1): 85-92.
- Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." *Nature* **215**(5105): 1043-4.
- Grimminger-Marquardt, V. and H. A. Lashuel "Structure and function of the molecular chaperone Hsp104 from yeast." *Biopolymers* **93**(3): 252-76.
- Grimminger, V., K. Richter, et al. (2004). "The prion curing agent guanidinium chloride specifically inhibits ATP hydrolysis by Hsp104." *J Biol Chem* **279**(9): 7378-83.
- Guiffant, D., D. Tribouillard, et al. (2007). "Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography." *Biotechnol J* **2**(1): 68-75.
- Guthrie, C. and G. R. Fink, Eds. (1991). *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*. Methods in Enzymology. San Diego, California.
- Hadlow, W. J. (1959). "Myopathies of livestock." *Lab Invest* **8**: 1478-98.

- Halfmann, R., D. F. Jarosz, et al. "Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts." *Nature* **482**(7385): 363-8.
- Haraguchi, T., S. Fisher, et al. (1989). "Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins." *Arch Biochem Biophys* **274**(1): 1-13.
- Harris, D. A. (2003). "Trafficking, turnover and membrane topology of PrP." *Br Med Bull* **66**: 71-85.
- Harrison, L. B., Z. Yu, et al. (2007). "Evolution of budding yeast prion-determinant sequences across diverse fungi." *J Mol Biol* **368**(1): 273-82.
- Harrison, P. M., A. Khachane, et al. "Genomic assessment of the evolution of the prion protein gene family in vertebrates." *Genomics* **95**(5): 268-77.
- Hattendorf, D. A. and S. L. Lindquist (2002). "Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants." *Embo J* **21**(1-2): 12-21.
- Hauw, J. J., V. Sazdovitch, et al. (2000). "Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene." *Neurology* **54**(8): 1641-6.
- Head, M. W., H. M. Yull, et al. "Variably protease-sensitive prionopathy in the UK: a retrospective review 1991-2008." *Brain* **136**(Pt 4): 1102-15.
- Heaton, M. P., K. A. Leymaster, et al. (2003). "Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer." *Mamm Genome* **14**(11): 765-77.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, et al. (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." *Science* **279**(5352): 827-34.
- Helsen, C. W. and J. R. Glover "Insight into molecular basis of curing of [PSI⁺] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104)." *J Biol Chem* **287**(1): 542-56.
- Helsen, C. W. and J. R. Glover (2012). "Insight into molecular basis of curing of [PSI⁺] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104)." *J Biol Chem* **287**(1): 542-56.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* **67**: 425-79.
- Higurashi, T., J. K. Hines, et al. (2008). "Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(43): 16596-601.
- Holmes, B., R. N. Brogden, et al. (1983). "Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension." *Drugs* **26**(3): 212-29.
- Hortells, P., M. Monzon, et al. (2006). "Pathological findings in retina and visual pathways associated to natural Scrapie in sheep." *Brain Res* **1108**(1): 188-94.
- Hsiao, K., H. F. Baker, et al. (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome." *Nature* **338**(6213): 342-5.
- Huang, Z., S. B. Prusiner, et al. (1996). "Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases." *Curr Top Microbiol Immunol* **207**: 49-67.
- Imran, M. and S. Mahmood "An overview of human prion diseases." *Virology* **8**: 559.
- Inge-Vechtsov, S. G., G. A. Zhouravleva, et al. (2007). "Biological roles of prion domains." *Prion* **1**(4): 228-35.
- Ivanova, L., S. Barmada, et al. (2001). "Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **276**(45): 42409-21.
- Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" *Cell* **73**(6): 1055-8.
- Jones, G. W. and D. C. Masison (2003). "Saccharomyces cerevisiae Hsp70 mutations affect [PSI⁺] prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of [PSI⁺]." *Genetics* **163**(2): 495-506.
- Jones, G. W. and M. F. Tuite (2005). "Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein?" *Bioessays* **27**(8): 823-32.
- Jung, G., G. Jones, et al. (2002). "Amino acid residue 184 of yeast Hsp104 chaperone is critical for prion-curing by guanidine, prion propagation, and thermotolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9936-41.
- Jung, G. and D. C. Masison (2001). "Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: a possible explanation for its effect in curing yeast prions." *Curr Microbiol* **43**(1): 7-10.
- Kajava, A. V., U. Baxa, et al. (2004). "A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(21): 7885-90.

- Kamibayashi, T. and M. Maze (2000). "Clinical uses of alpha2 -adrenergic agonists." Anesthesiology **93**(5): 1345-9.
- Kaneko, K., M. Vey, et al. (1997). "COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2333-8.
- Karapetyan, Y. E., G. F. Sferrazza, et al. "Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as antiprion agents." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(17): 7044-9.
- Kellings, K., S. B. Prusiner, et al. (1994). "Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **343**(1306): 425-30.
- Khier, S., C. Deleuze-Masquefa, et al. "Pharmacology of EAPB0203, a novel imidazo[1,2-a]quinoxaline derivative with anti-tumoral activity on melanoma." Eur J Pharm Sci **39**(1-3): 23-9.
- Kim, Y., S. de Castro, et al. (2009). "Novel 2- and 4-substituted 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine derivatives as allosteric modulators of the A3 adenosine receptor." J Med Chem **52**(7): 2098-108.
- King, C. Y. and R. Diaz-Avalos (2004). "Protein-only transmission of three yeast prion strains." Nature **428**(6980): 319-23.
- King, C. Y., P. Tittmann, et al. (1997). "Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms in vitro into amyloid-like filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6618-22.
- Kirkland, P. A., M. Reidy, et al. "Functions of yeast Hsp40 chaperone Sis1p dispensable for prion propagation but important for prion curing and protection from prion toxicity." Genetics **188**(3): 565-77.
- Kishimoto, A., K. Hasegawa, et al. (2004). "beta-Helix is a likely core structure of yeast prion Sup35 amyloid fibers." Biochem Biophys Res Commun **315**(3): 739-45.
- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, et al. (1996). "Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs." Cell **85**(7): 1077-88.
- Kiss, T. (2002). "Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions." Cell **109**(2): 145-8.
- Klatzo, I., D. C. Gajdusek, et al. (1959). "Pathology of Kuru." Lab Invest **8**(4): 799-847.
- Klingenstein, R., S. Lober, et al. (2006). "Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments." J Neurochem **98**(3): 748-59.
- Kochneva-Pervukhova, N. V., S. V. Paushkin, et al. (1998). "Mechanism of inhibition of Psi+ prion determinant propagation by a mutation of the N-terminus of the yeast Sup35 protein." Embo J **17**(19): 5805-10.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, et al. (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." Nature **370**(6489): 471-4.
- Korth, C., B. C. May, et al. (2001). "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9836-41.
- Kretzschmar, H. A., G. Honold, et al. (1991). "Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Straussler, and Scheinker." Lancet **337**(8750): 1160.
- Kretzschmar, H. A., T. Tings, et al. (2000). "Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse." Arch Virol Suppl(16): 239-49.
- Kryndushkin, D. S., I. M. Alexandrov, et al. (2003). "Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104." J Biol Chem **278**(49): 49636-43.
- Kryndushkin, D. S., F. Shewmaker, et al. (2008). "Curing of the [URE3] prion by Btn2p, a Batten disease-related protein." Embo J **27**(20): 2725-35.
- Kudlicki, W., A. Coffman, et al. (1997). "Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins." Fold Des **2**(2): 101-8.
- Kudlicki, W., M. Mouat, et al. (1994). "Development of a chaperone-deficient system by fractionation of a prokaryotic coupled transcription/translation system." Anal Biochem **217**(1): 12-9.
- Kurschner, C. and J. I. Morgan (1995). "The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system." Brain Res Mol Brain Res **30**(1): 165-8.
- Kushnirov, V. V., D. S. Kryndushkin, et al. (2000). "Chaperones that cure yeast artificial [PSI+] and their prion-specific effects." Curr Biol **10**(22): 1443-6.

- Kushnirov, V. V. and M. D. Ter-Avanesyan (1998). "Structure and replication of yeast prions." Cell **94**(1): 13-6.
- Lacarrubba, F., M. C. Potenza, et al. "Successful treatment and management of large superficial basal cell carcinomas with topical imiquimod 5% cream: a case series and review." J Dermatolog Treat **22**(6): 353-8.
- Langevin, C., O. Andreoletti, et al. "Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model." Neurobiol Dis **41**(1): 219-25.
- Le Dur, A., V. Beringue, et al. (2005). "A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 16031-6.
- Lee, C. C., A. M. Avalos, et al. "Accessory molecules for Toll-like receptors and their function." Nat Rev Immunol **12**(3): 168-79.
- Lee, I. Y., D. Westaway, et al. (1998). "Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species." Genome Res **8**(10): 1022-37.
- Lefrere, J. J. and P. Hewitt (2009). "From mad cows to sensible blood transfusion: the risk of prion transmission by labile blood components in the United Kingdom and in France." Transfusion **49**(4): 797-812.
- Lehmann, S., O. Milhavel, et al. (1999). "Trafficking of the cellular isoform of the prion protein." Biomed Pharmacother **53**(1): 39-46.
- Liang, W. Q. and M. J. Fournier (1997). "Synthesis of functional eukaryotic ribosomal RNAs in trans: development of a novel in vivo rDNA system for dissecting ribosome biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2864-8.
- Liebman, S. W. and Y. O. Chernoff "Prions in yeast." Genetics **191**(4): 1041-72.
- Liebman, S. W. and Y. O. Chernoff (2012). "Prions in yeast." Genetics **191**(4): 1041-72.
- Liu, B. and M. J. Fournier (2004). "Interference probing of rRNA with snoRNPs: a novel approach for functional mapping of RNA in vivo." RNA **10**(7): 1130-41.
- Liu, B., X. H. Liang, et al. (2008). "Mis-targeted methylation in rRNA can severely impair ribosome synthesis and activity." RNA Biol **5**(4): 249-54.
- Liu, B., J. Ni, et al. (2001). "Probing RNA in vivo with methylation guide small nucleolar RNAs." Methods **23**(3): 276-86.
- Liu, J. J., N. Sondheimer, et al. (2002). "Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI+]." Proc Natl Acad Sci U S A **99** **Suppl 4**: 16446-53.
- Loar, J. W., R. M. Seiser, et al. (2004). "Genetic and biochemical interactions among Yar1, Ltv1 and Rps3 define novel links between environmental stress and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **168**(4): 1877-89.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, et al. (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **14**(10): 953-61.
- Ma, J. and S. Lindquist (2001). "Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14955-60.
- Mabbott, N. A. and M. E. Bruce (2001). "The immunobiology of TSE diseases." J Gen Virol **82**(Pt 10): 2307-18.
- Malato, L., S. Dos Reis, et al. (2007). "Role of Hsp104 in the propagation and inheritance of the [Het-s] prion." Mol Biol Cell **18**(12): 4803-12.
- Mallucci, G. and J. Collinge (2005). "Rational targeting for prion therapeutics." Nat Rev Neurosci **6**(1): 23-34.
- Manson, J., J. D. West, et al. (1992). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**(1): 117-22.
- Mattson, M. P. and K. Furukawa (1997). "Alzheimer's disease. Short precursor shortens memory." Nature **387**(6632): 457-8.
- McKnight, S. and R. Tjian (1986). "Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells." Cell **46**(6): 795-805.

- Michelitsch, M. D. and J. S. Weissman (2000). "A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11910-5.
- Miller, G. (2009). "Neurodegeneration. Could they all be prion diseases?" Science **326**(5958): 1337-9.
- Miller, R. L., J. F. Gerster, et al. (1999). "Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug." Int J Immunopharmacol **21**(1): 1-14.
- Moore, R. A., C. Herzog, et al. (2006). "Octapeptide repeat insertions increase the rate of protease-resistant prion protein formation." Protein Sci **15**(3): 609-19.
- Moore, R. C., J. Hope, et al. (1998). "Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent." Nat Genet **18**(2): 118-25.
- Moore, R. C., I. Y. Lee, et al. (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.
- Moosavi, B., J. Wongwigkarn, et al. "Hsp70/Hsp90 co-chaperones are required for efficient Hsp104-mediated elimination of the yeast [PSI(+)] prion but not for prion propagation." Yeast **27**(3): 167-79.
- Moriyama, H., H. K. Edskes, et al. (2000). "[URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p." Mol Cell Biol **20**(23): 8916-22.
- Moudjou, M., Y. Frobert, et al. (2001). "Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures." J Gen Virol **82**(Pt 8): 2017-24.
- Nakayashiki, T., C. P. Kurtzman, et al. (2005). "Yeast prions [URE3] and [PSI+] are diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10575-80.
- Namy, O., A. Galopier, et al. (2008). "Epigenetic control of polyamines by the prion [PSI+]." Nat Cell Biol **10**(9): 1069-75.
- Naslavsky, N., R. Stein, et al. (1997). "Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform." J Biol Chem **272**(10): 6324-31.
- Ness, F., P. Ferreira, et al. (2002). "Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast." Mol Cell Biol **22**(15): 5593-605.
- Newnam, G. P., J. L. Birchmore, et al. "Destabilization and recovery of a yeast prion after mild heat shock." J Mol Biol **408**(3): 432-48.
- Newnam, G. P., J. L. Birchmore, et al. (2011). "Destabilization and recovery of a yeast prion after mild heat shock." J Mol Biol **408**(3): 432-48.
- Oesch, B., D. Westaway, et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-46.
- Osherovich, L. Z., B. S. Cox, et al. (2004). "Dissection and design of yeast prions." PLoS Biol **2**(4): E86.
- Pan, K. M., N. Stahl, et al. (1992). "Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain." Protein Sci **1**(10): 1343-52.
- Pang, Y., S. Kurella, et al. "The antiprion compound 6-aminophenanthridine inhibits the protein folding activity of the ribosome by direct competition." J Biol Chem **288**(26): 19081-9.
- Pang, Y., S. Kurella, et al. (2013). "The antiprion compound 6-Aminophenanthridine inhibits protein folding activity of the ribosome by direct competition." J Biol Chem.
- Parsell, D. A., A. S. Kowal, et al. (1994). "Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104." Nature **372**(6505): 475-8.
- Patel, B. K., J. Gavin-Smyth, et al. (2009). "The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion." Nat Cell Biol **11**(3): 344-9.
- Patel, B. K. and S. W. Liebman (2007). ""Prion-proof" for [PIN+]: infection with in vitro-made amyloid aggregates of Rnq1p-(132-405) induces [PIN+]." J Mol Biol **365**(3): 773-82.
- Patino, M. M., J. J. Liu, et al. (1996). "Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast." Science **273**(5275): 622-6.
- Pauly, P. C. and D. A. Harris (1998). "Copper stimulates endocytosis of the prion protein." J Biol Chem **273**(50): 33107-10.
- Paushkin, S. V., V. V. Kushnirov, et al. (1996). "Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor." Embo J **15**(12): 3127-34.

- Perez-Fernandez, J., P. Martin-Marcos, et al. "Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes." Nucleic Acids Res **39**(18): 8105-21.
- Perez-Fernandez, J., P. Martin-Marcos, et al. (2011). "Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes." Nucleic Acids Res **39**(18): 8105-21.
- Perutz, M. F., J. T. Finch, et al. (2002). "Amyloid fibers are water-filled nanotubes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5591-5.
- Peters, P. J., A. Mironov, Jr., et al. (2003). "Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway." J Cell Biol **162**(4): 703-17.
- Petes, T. D. (1979). "Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(1): 410-4.
- Piekna-Przybylska, D., W. A. Decatur, et al. (2008). "The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D178-83.
- Pike, L. J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." J Lipid Res **47**(7): 1597-8.
- Poncet-Montange, G., S. J. St Martin, et al. "A survey of antiprion compounds reveals the prevalence of non-PrP molecular targets." J Biol Chem **286**(31): 27718-28.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-44.
- Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**(5012): 1515-22.
- Prusiner, S. B. (2001). "Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions." N Engl J Med **344**(20): 1516-26.
- Reidy, M. and D. C. Masison "Sti1 regulation of Hsp70 and Hsp90 is critical for curing of *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] prions by Hsp104." Mol Cell Biol **30**(14): 3542-52.
- Reidy, M. and D. C. Masison (2011). "Modulation and elimination of yeast prions by protein chaperones and co-chaperones." Prion **5**(4): 245-9.
- Reis, S. D., Y. Pang, et al. "Mode of action of the antiprion drugs 6AP and GA on ribosome assisted protein folding." Biochimie **93**(6): 1047-54.
- Reis, S. D., Y. Pang, et al. (2011). "Mode of action of the antiprion drugs 6AP and GA on ribosome assisted protein folding." Biochimie **93**(6): 1047-54.
- Resende, C. G., T. F. Outeiro, et al. (2003). "Prion protein gene polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **49**(4): 1005-17.
- Riek, R., S. Hornemann, et al. (1996). "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)." Nature **382**(6587): 180-2.
- Riek, R., S. Hornemann, et al. (1997). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." FEBS Lett **413**(2): 282-8.
- Rikhvanov, E. G., N. V. Romanova, et al. (2007). "Chaperone effects on prion and nonprion aggregates." Prion **1**(4): 217-22.
- Ritter, C., M. L. Maddelein, et al. (2005). "Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion." Nature **435**(7043): 844-8.
- Rogoza, T., A. Goginashvili, et al. "Non-Mendelian determinant [ISP⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10573-7.
- Rohwer, R. G. (1991). "The scrapie agent: "a virus by any other name"." Curr Top Microbiol Immunol **172**: 195-232.
- Rosenmann, H., J. Vardi, et al. (1998). "Identification in Israel of 2 Jewish Creutzfeld-Jakob disease patients with a 178 mutation at their PrP gene." Acta Neurol Scand **97**(3): 184-7.
- Ross, E. D., A. Minton, et al. (2005). "Prion domains: sequences, structures and interactions." Nat Cell Biol **7**(11): 1039-44.
- Saborio, G. P., B. Permanne, et al. (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." Nature **411**(6839): 810-3.
- Safar, J., P. P. Roller, et al. (1993). "Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein." J Biol Chem **268**(27): 20276-84.

- Sailer, A., H. Bueler, et al. (1994). "No propagation of prions in mice devoid of PrP." *Cell* **77**(7): 967-8.
- Samanta, D., D. Mukhopadhyay, et al. (2008). "Protein folding by domain V of Escherichia coli 23S rRNA: specificity of RNA-protein interactions." *J Bacteriol* **190**(9): 3344-52.
- Sanchez, Y. and S. L. Lindquist (1990). "HSP104 required for induced thermotolerance." *Science* **248**(4959): 1112-5.
- Santi, C. M., F. S. Cayabyab, et al. (2002). "Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics." *J Neurosci* **22**(2): 396-403.
- Santuccione, A., V. Sytnyk, et al. (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.
- Sanyal, S. C., D. Bhattacharyya, et al. (2002). "The folding of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase. Equilibrium and kinetic studies." *Eur J Biochem* **269**(15): 3856-66.
- Sarnataro, D., S. Paladino, et al. (2002). "PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts." *Traffic* **3**(11): 810-21.
- Saupe, S. J., C. Clave, et al. (2000). "Vegetative incompatibility in filamentous fungi: Podospora and Neurospora provide some clues." *Curr Opin Microbiol* **3**(6): 608-12.
- Saupe, S. J. and S. Supattapone (2006). "What makes a good prion? Conference on Prion Biology." *EMBO Rep* **7**(3): 254-8.
- Scheibel, T. and S. L. Lindquist (2001). "The role of conformational flexibility in prion propagation and maintenance for Sup35p." *Nat Struct Biol* **8**(11): 958-62.
- Schlumpberger, M., S. B. Prusiner, et al. (2001). "Induction of distinct [URE3] yeast prion strains." *Mol Cell Biol* **21**(20): 7035-46.
- Schofer, H. (2007). "Evaluation of imiquimod for the therapy of external genital and anal warts in comparison with destructive therapies." *Br J Dermatol* **157 Suppl 2**: 52-5.
- Schwartz, A. L. and A. Ciechanover (1999). "The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases." *Annu Rev Med* **50**: 57-74.
- Schwimmer, C. and D. C. Masison (2002). "Antagonistic interactions between yeast [PSI(+)] and [URE3] prions and curing of [URE3] by Hsp70 protein chaperone Ssa1p but not by Ssa2p." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3590-8.
- Seiser, R. M., A. E. Sundberg, et al. (2006). "Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in Saccharomyces cerevisiae." *Genetics* **174**(2): 679-91.
- Serio, T. R. and S. L. Lindquist (1999). "[PSI+]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 661-703.
- Serra-Guillen, C., E. Nagore, et al. "A randomized pilot comparative study of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus imiquimod 5% versus sequential application of both therapies in immunocompetent patients with actinic keratosis: clinical and histologic outcomes." *J Am Acad Dermatol* **66**(4): e131-7.
- Seuring, C., J. Greenwald, et al. "The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility." *PLoS Biol* **10**(12): e1001451.
- Sharma, D. and D. C. Masison "Single methyl group determines prion propagation and protein degradation activities of yeast heat shock protein (Hsp)-70 chaperones Ssa1p and Ssa2p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(33): 13665-70.
- Sharma, D. and D. C. Masison (2008). "Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different anti-prion effects." *Genetics* **179**(3): 1301-11.
- Shorter, J. and S. Lindquist (2004). "Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers." *Science* **304**(5678): 1793-7.
- Shorter, J. and S. Lindquist (2005). "Prions as adaptive conduits of memory and inheritance." *Nat Rev Genet* **6**(6): 435-50.
- Shyng, S. L., M. T. Huber, et al. (1993). "A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells." *J Biol Chem* **268**(21): 15922-8.
- Si, K., M. Giustetto, et al. (2003). "A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia." *Cell* **115**(7): 893-904.
- Si, K., S. Lindquist, et al. (2003). "A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties." *Cell* **115**(7): 879-91.

- Sindi, S. S. and T. R. Serio (2009). "Prion dynamics and the quest for the genetic determinant in protein-only inheritance." *Curr Opin Microbiol* **12**(6): 623-30.
- Singh, B. N. (1986). "The mechanism of action of calcium antagonists relative to their clinical applications." *Br J Clin Pharmacol* **21 Suppl 2**: 109S-121S.
- Solforosi, L., J. R. Criado, et al. (2004). "Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo." *Science* **303**(5663): 1514-6.
- Sondheimer, N., N. Lopez, et al. (2001). "The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ+] prion." *Embo J* **20**(10): 2435-42.
- Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **4**(1): 49-60.
- Soto, C., L. Estrada, et al. (2006). "Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates." *Trends Biochem Sci* **31**(3): 150-5.
- Sparkes, R. S., M. Simon, et al. (1986). "Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(19): 7358-62.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, et al. (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." *Biochemistry* **32**(8): 1991-2002.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, et al. (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." *Cell* **51**(2): 229-40.
- Staniforth, G. L. and M. F. Tuite "Fungal prions." *Prog Mol Biol Transl Sci* **107**: 417-56.
- Suzuki, G., N. Shimazu, et al. "A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress." *Science* **336**(6079): 355-9.
- Tanaka, M., P. Chien, et al. (2004). "Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences." *Nature* **428**(6980): 323-8.
- Taraboulos, A., M. Scott, et al. (1995). "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform." *J Cell Biol* **129**(1): 121-32.
- Telling, G. C., M. Scott, et al. (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." *Cell* **83**(1): 79-90.
- Ter-Avanesyan, M. D., A. R. Dagkesamanskaya, et al. (1994). "The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **137**(3): 671-6.
- Ter-Avanesyan, M. D. and V. V. Kushnirov (1999). "Prions: infectious proteins with genetic properties." *Biochemistry (Mosc)* **64**(12): 1382-90.
- Ter-Avanesyan, M. D., V. V. Kushnirov, et al. (1993). "Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein." *Mol Microbiol* **7**(5): 683-92.
- Thual, C., A. A. Komar, et al. (1999). "Structural characterization of *Saccharomyces cerevisiae* prion-like protein Ure2." *J Biol Chem* **274**(19): 13666-74.
- Torres, A., L. Storey, et al. (2007). "Immune-mediated changes in actinic keratosis following topical treatment with imiquimod 5% cream." *J Transl Med* **5**: 7.
- Tribouillard-Tanvier, D., V. Beringue, et al. (2008). "Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions." *PLoS ONE* **3**(4): e1981.
- Tribouillard-Tanvier, D., S. Dos Reis, et al. (2008). "Protein folding activity of ribosomal RNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs." *PLoS ONE* **3**(5): e2174.
- True, H. L. and S. L. Lindquist (2000). "A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity." *Nature* **407**(6803): 477-83.
- Tuite, M. F. "The natural history of yeast prions." *Adv Appl Microbiol* **84**: 85-137.
- Tuite, M. F. (2000). "Yeast prions and their prion-forming domain." *Cell* **100**(3): 289-92.
- Tuite, M. F. and B. S. Cox (2003). "Propagation of yeast prions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(11): 878-90.
- Tuite, M. F. and N. Koloteva-Levin (2004). "Propagating prions in fungi and mammals." *Mol Cell* **14**(5): 541-52.
- Turcq, B., C. Deleu, et al. (1991). "Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina* are not essential for cell viability." *Mol Gen Genet* **228**(1-2): 265-9.

- Turk, E., D. B. Teplow, et al. (1988). "Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins." Eur J Biochem **176**(1): 21-30.
- Turoscy, V. and T. G. Cooper (1987). "Ureidosuccinate is transported by the allantoate transport system in *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **169**(6): 2598-600.
- Uptain, S. M. and S. Lindquist (2002). "Prions as protein-based genetic elements." Annu Rev Microbiol **56**: 703-41.
- Viles, J. H., F. E. Cohen, et al. (1999). "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2042-7.
- Vilette, D., O. Andreoletti, et al. (2001). "Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4055-9.
- Vilotte, J. L., S. Soulier, et al. (2001). "Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp." J Virol **75**(13): 5977-84.
- Voisset, C., S. J. Saupe, et al. (2009). "Procedure for identification and characterization of drugs efficient against mammalian prion: from a yeast-based antiprion drug screening assay to in vivo mouse models." Infect Disord Drug Targets **9**(1): 31-9.
- Voisset, C., J. Y. Thuret, et al. (2008). "Tools for the study of ribosome-borne protein folding activity." Biotechnol J **3**(8): 1033-40.
- Volkov, K. V., A. Y. Aksenova, et al. (2002). "Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **160**(1): 25-36.
- Walker, F. O. (2007). "Huntington's disease." Lancet **369**(9557): 218-28.
- Wasmer, C., A. Lange, et al. (2008). "Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core." Science **319**(5869): 1523-6.
- Watts, J. C. and D. Westaway (2007). "The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction." Biochim Biophys Acta **1772**(6): 654-72.
- Wegierski, T., E. Billy, et al. (2001). "Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast." RNA **7**(9): 1254-67.
- Weissmann, C. and E. Flechsig (2003). "PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research." Br Med Bull **66**: 43-60.
- Wermuth, C. G. (2004). "Selective optimization of side activities: another way for drug discovery." J Med Chem **47**(6): 1303-14.
- Westaway, D., C. A. Miranda, et al. (1991). "Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice." Neuron **7**(1): 59-68.
- Westaway, D. and S. B. Prusiner (1986). "Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein." Nucleic Acids Res **14**(5): 2035-44.
- Wickner, R. B. (1994). "[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **264**(5158): 566-9.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, et al. "Amyloids and yeast prion biology." Biochemistry **52**(9): 1514-27.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, et al. (2013). "Amyloids and yeast prion biology." Biochemistry **52**(9): 1514-27.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, et al. (2002). "Prions of yeast as epigenetic phenomena: high protein "copy number" inducing protein "silencing"." Adv Genet **46**: 485-525.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, et al. (2006). "How to find a prion: [URE3], [PSI+] and [beta]." Methods **39**(1): 3-8.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, et al. (2007). "Prions of fungi: inherited structures and biological roles." Nat Rev Microbiol **5**(8): 611-8.
- Wille, H., M. D. Michelitsch, et al. (2002). "Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3563-8.
- Winkler, J., J. Tyedmers, et al. (2012). "Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation." J Struct Biol **179**(2): 152-60.
- Wong, C., L. W. Xiong, et al. (2001). "Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein." Embo J **20**(3): 377-86.

- Yedidia, Y., L. Horonchik, et al. (2001). "Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein." Embo J **20**(19): 5383-91.
- Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases." Febs J **274**(3): 630-58.
- Zagon, I. S., R. N. Donahue, et al. (2008). "Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit cell proliferation independent of immune function." Exp Biol Med (Maywood) **233**(8): 968-79.
- Zahn, R., A. Liu, et al. (2000). "NMR solution structure of the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 145-50.
- Zanata, S. M., M. H. Lopes, et al. (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." Embo J **21**(13): 3307-16.
- Zerr, I. (2008). "Clinical and therapeutic aspects of prion disease." Handb Clin Neurol **89**: 737-64.
- Zhou, P., I. L. Derkatch, et al. (2001). "The relationship between visible intracellular aggregates that appear after overexpression of Sup35 and the yeast prion-like elements [PSI(+)] and [PIN(+)]." Mol Microbiol **39**(1): 37-46.
- Zou, W. Q. and P. Gambetti (2005). "From microbes to prions the final proof of the prion hypothesis." Cell **121**(2): 155-7.