



HAL
open science

Physiopathologie et thérapeutique des prions humains : une approche cellulaire

Alexianne Gougerot

► **To cite this version:**

Alexianne Gougerot. Physiopathologie et thérapeutique des prions humains : une approche cellulaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066087 . tel-02078046

HAL Id: tel-02078046

<https://theses.hal.science/tel-02078046>

Submitted on 25 Mar 2019

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

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

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale ED158

Cerveau, Cognition, Comportement

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière – INSERM U1127

Équipe « Maladie d'Alzheimer, maladies à prions »

Physiopathologie et thérapeutique des prions humains : une approche cellulaire

Par Alexianne Gougerot

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Stéphane Haïk

Présentée et soutenue publiquement le 23 Mars 2017

Devant un jury composé de :

M. Pierre AUCOUTURIER	PU-PH	UPMC	Président
M ^{me} Dulce PAPY	PU	UPEC	Rapporteuse
M. Jean-Philippe DESLYS	DR	CEA	Rapporteur
M ^{me} Sophie MOUILLET-RICHARD	DR	INSERM	Examinatrice
M. Human REZAEI	DR	INRA	Examineur
M. Stéphane HAIK	DR	INSERM	Directeur

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Stéphane Haïk, pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité. Merci pour votre optimisme dans les moments les plus difficiles de cette thèse. Ce fut pour moi un honneur et un grand plaisir d'effectuer ma thèse au sein de votre laboratoire.

Je remercie sincèrement Dulce Papy-Garcia ainsi que Jean-Philippe Deslys de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer et de juger ce travail en qualité de rapporteurs et pour le temps passé à relire ce manuscrit.

Merci à Pierre Aucouturier d'être aujourd'hui président de ce jury de thèse après avoir été rapporteur de mon comité de mi-thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Je remercie particulièrement Sophie Mouillet-Richard et Human Rezaei d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse ainsi que pour leur aide et leurs discussions sur le projet collaboratif TauPrion. Merci Sophie de nous avoir gentiment dépannés en fin de thèse avec les anticorps de kinase et merci à Human pour son accueil chaleureux au sein de son unité à l'INRA de Jouy-en-Josas. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon respect.

Je tiens à remercier la fondation Thierry et Annick Demarest ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale qui ont permis le financement de cette thèse.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe « Maladie d'Alzheimer, maladies à prions » mais aussi aux membres de la Cellule Nationale de Référence des MCJ pour leur soutien et leur aide précieuse tout au long de ces années. Je remercie aussi chaleureusement Samia Hannaoui qui m'a grandement accompagnée lors de mes premiers pas au labo, et ce avec une infinie gentillesse.

Merci pour l'accueil que m'a réservé l'ensemble de l'équipe « Macro-Assemblages Protéiques et Maladies à Prion » à l'INRA de Jouy-en-Josas. Je tiens à remercier tout particulièrement Vincent Béringue de nous avoir fourni la lignée murine *Prnp*^{0/0} ainsi que Laetitia Guedevi et Davy Mourier pour leur aide et leur gentillesse à mon égard.

D'un côté plus personnel j'aimerais remercier celle que je n'ai pas choisi mais que je n'échangerais pour rien au monde : ma famille. Mes parents tout d'abord, pour leur soutien inconditionnel. Je ne pourrais jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'apportez. Merci à mes grands frères d'être aussi présents jour après jour à mes côtés malgré la distance, votre soutien compte énormément pour moi. Enfin, merci à ma grand-mère pour tous ses mots d'encouragements et son incroyable capacité à me trouver formidable quoique je fasse.

Merci à tous mes amis pour m'avoir changé les idées à de nombreuses reprises lors de nos soirées, week ends, vacances et autres. Une pensée particulière pour Amélie et Noémie qui m'ont supportée en tant que colocataire. Merci mille fois ma t. pour toutes ces soirées menthe fraîche-citrons verts et tout le reste.

Enfin merci à celui qui partage ma vie pour avoir subi cette thèse sans broncher. Cette épreuve aurait été bien plus difficile à surmonter sans ton soutien quotidien. Merci pour tout ce que tu es et tout ce que tu fais.

Liste des abréviations

A β	Protéine amyloïde bêta
Akt	Protein kinase B (PKB)
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APP	Amyloid precursor protein
ATNC	Agent Transmissible Non Conventionnel
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CaMK II	Calcium/calmoduline dependent protein kinase II
CaN	Calcineurine
Cdk5	Cycline dependent protein kinase 5
CDP	Chronic demyelinating polyneuropathy
CGN	“Cerebellar granule neurons”, ou neurones en grains du cervelet
CSN	Cellules souches neurales
CWD	Chronic wasting disease
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
ESF	Encéphalopathie spongiforme féline
ESST	Encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GFAP	Protéine glio-fibrillaire acide
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol
GSK3	Glycogène Synthase Kinase 3
GSS	Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
HSPG	Protéoglycanes à héparane sulfate
IFF	Insomnie Fatale Familiale
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MA	Maladie d’Alzheimer
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
MAPK	Mitogen Activated Protéine Kinase
MAPT	Gène codant pour la protéine tau / Microtubule-Associated Tau-Protein

MARK	Microtubule Affinity-Regulating Kinase
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MCJi	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène
MCJs	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
NSCs	Cellules souches neurales fœtales
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PDPK	Proline Directed Protein Kinase
PHF	Paire de filaments hélicoïdaux (de protéine tau)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	Protéinase K
PKA	Protéine kinase AMP cyclique dépendante
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
PPA2	Protéine phosphatase A2
PPS	Pentosan polysulfate
PRNP	Gène codant pour la protéine prion
PrP	Protéine prion
PrPc	Protéine prion cellulaire
PrPres	Fragment de la protéine prion résistant à la protéinase K
PrPsc	Protéine prion pathologique
pS262	Phosphorylation sur la sérine 262 de la protéine tau / anticorps reconnaissant la phosphorylation sur cet épitope
QuIC	Quaking Induced Conversion
RE	Réticulum endoplasmique
SNC	Système nerveux central
TACE	Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
UPR	Unfolded Response Protein
UPS	Ubiquitin Proteasom System
vMCJ	Variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
WT	Wild-Type (phénotype sauvage)

Sommaire

Remerciements	1
Liste des abréviations	3
Sommaire	5
INTRODUCTION.....	9
I/ Les maladies à prions.....	9
1. Les maladies à prions animales.....	9
a. La tremblante du mouton	9
b. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine	10
c. Autres ESST animales.....	11
2. Les maladies à prions humaines	12
a. Les formes sporadiques	12
b. Les formes génétiques	13
c. Les formes infectieuses	15
3. Neuropathologie.....	18
a. Spongiose du neuropile	18
b. Gliose astrocytaire et activation microgliale	19
c. Plaques amyloïdes	19
d. Perte neuronale	21
4. Neurodégénérescence dans les ESST	21
a. PrPsc et toxicité.....	21
b. Mécanismes cellulaires de la mort neuronale	23
II/ La protéine prion : PrP	25
1. La PrP cellulaire.....	25
a. Expression	25
b. Structure	26
c. Cycle cellulaire et localisation	28
d. Fonction.....	28
e. PrPc et transduction du signal cellulaire	30
2. La PrP pathogène	31
a. Structure et propriétés	32
b. Réplication et conversion	35
c. Notion de souche de prions	37
d. Notion de barrière d'espèce.....	41
III/ Modèles expérimentaux de réplication des prions	43
1. Modèles <i>in vitro</i>	43
a. Modèles acellulaires	43
b. Modèles cellulaires.....	47

2.	Modèles <i>in vivo</i> invertébrés	49
a.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	49
b.	<i>Drosophile</i>	51
3.	Modèles <i>in vivo</i> murins	52
IV/	La protéine tau et les tauopathies	56
1.	La protéine tau	56
a.	Expression et fonction	56
b.	La protéine tau pathogène	58
2.	Tauopathies	61
a.	Maladie d'Alzheimer	62
b.	Paralyse Supranucléaire Progressive	64
c.	Dégénérescence Cortico-Basale	64
d.	Maladie de Pick	64
e.	Démence fronto-temporale liée au chromosome 17	65
e.	Autres tauopathies	65
f.	Maladies à prions	66
V/	Approche thérapeutique dans les maladies à prions	68
1.	Inhibition de la conversion	69
2.	Diminution de la PrPc disponible à la conversion	73
3.	Diminution de la PrPsc	76
4.	Diminution des conséquences neuropathologiques	77
5.	Autres composés	79
6.	Conclusion	79
	OBJECTIFS	81
	RÉSULTATS	83
	PARTIE 1	85
	Introduction	85
	Résultats	87
	Article 1:	87
	Résultats complémentaires : modèle d'étude <i>in vivo</i> dans <i>Caenorhabditis elegans</i>	115
	Discussion	120
	Perspectives	123
	PARTIE 2	125
	Introduction	125
	Résultats	126
	Article 2 :	126
	Conclusion article 2 :	132
	Evaluation de nouveaux composés anti-prion	133
	Matériel et méthodes	135
	Expériences d'immunofluorescence	135
	Traitements	135
	Inoculation et traitement des souris	136
	Résultats	137
1.	Evaluation de la toxicité des composés vis-à-vis des cultures primaires	137
2.	Effet des composés sur l'accumulation de PrPres en culture	138
3.	Effets de l'astemizole et du GSK2606414 sur la mort neuronale	141

4. Evaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité de l'astemizole, de la doxycycline et de leur association vis-à-vis d'une souche humaine de prion.	142
Discussion	144
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	149
BIBLIOGRAPHIE	157
Table des illustrations.....	188
Table des tableaux	190

INTRODUCTION

I/ Les maladies à prions.

Les maladies à prions, aussi appelées Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) sont des maladies conformationnelles des protéines, affectant aussi bien l'Homme que l'animal et ayant comme particularité d'être toutes expérimentalement transmissibles. La première forme décrite il y a environ 250 ans est la tremblante du mouton (appelée « scrapie »). La première maladie humaine a elle été décrite par Creutzfeldt en 1920.

Ces maladies neurodégénératives se définissent par une longue phase d'incubation cliniquement silencieuse et une évolution fatale sans rémission, sans aucune réaction inflammatoire ou immunitaire détectable. Les lésions cérébrales caractéristiques retrouvées associent spongiose du neuropile, perte neuronale et gliose astrocytaire réactive.

L'agent responsable de la maladie est appelé ATNC pour « agent transmissible non conventionnel », soulignant ainsi ses caractéristiques physicochimiques et biologiques très particulières. Ces caractéristiques, associées au fait qu'aucune structure évocatrice d'un microorganisme conventionnel et qu'aucun acide nucléique spécifique n'aient pu être mis en évidence dans les tissus infectés, ont conduit Stanley B. Prusiner à émettre l'hypothèse d'une protéine infectieuse (« prion » pour proteinaceous infectious particle). Sur le plan moléculaire, ces maladies sont caractérisées par l'accumulation d'une protéine de l'hôte, la protéine du prion cellulaire PrP_c, sous une forme anormale, mal conformée : la PrP_{sc} (Protein Prion scrapie). Selon l'hypothèse de la protéine seule, la conformation anormale de la PrP est le principal, voire l'unique constituant de l'agent transmissible (Prusiner 1982).

1. Les maladies à prions animales

a. La tremblante du mouton

La tremblante du mouton est la première encéphalopathie animale à avoir été décrite, en 1732 en Europe. Sa transmissibilité a ensuite été démontrée en 1936 par Cuillé et Chelle (Cuillé and Chelle 1936).

Plusieurs souches de tremblantes naturelles existent, bien que leur nombre ne soit pas exactement déterminé. Le plus souvent les signes cliniques apparaissent après une longue

période d'incubation, et se caractérisent au début de la maladie par un comportement anormal et une extrême nervosité. On observe ensuite chez les animaux des tremblements qui s'intensifient avec l'évolution de la maladie, mais aussi une ataxie et un dépérissement, ainsi qu'un prurit intense, généralement localisé au niveau dorso-lombaire, d'où le nom de « scrapie » en anglais pour cette pathologie. La durée de la phase clinique varie de deux semaines à six mois, en phase finale l'animal stressé et amaigrit devient apathique et n'est plus capable de se nourrir seul.

De nombreuses études ont mis en évidence une susceptibilité génétique vis à vis de la tremblante associée au polymorphisme du gène *prnp* codant pour la protéine prion. Trois codons sont particulièrement impliqués dans cette susceptibilité : les codons 136 : alanine (A) ou valine (V) ; 154 arginine (R) ou histidine (H) et 171 arginine (R), glutamine (Q) ou histidine (H). Il apparaît que les animaux homozygotes (VRQ/VRQ) sont les plus sensibles à la maladie (temps d'incubation les plus courts après infection sous-cutanée ou intracérébrale) alors qu'au contraire les animaux homozygotes (ARR/ARR) seraient résistants (Goldmann et al. 1991; Houston and Gravenor 2003).

Suite à ces observations un programme européen a été mis en place afin de sélectionner les animaux génétiquement résistants à la tremblante. Mais d'autres études mettent en évidence que l'infection de ces animaux ARR/ARR par l'agent de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) par voie intracérébrale est possible (Andreoletti et al. 2006) et décrivent des cas de tremblante dits atypiques chez des ovins ARR/ARR (Buschmann et al. 2004; Madec et al. 2004). Ces dernières données illustrent la complexité du phénomène de souches dans les maladies à prions.

b. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine

L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) est couramment appelée « maladie de la vache folle ». Les premiers cas ont été décrits en Grande-Bretagne en 1985. Le nombre de cas a ensuite rapidement augmenté chaque année jusqu'à atteindre environ 200 000 cas officiels cumulés à ce jour. Cette maladie se caractérise par une période d'incubation de 5 ans en moyenne et des signes cliniques associant troubles du comportement (appréhension, hypersensibilité) et des troubles moteurs (postures anormales et ataxie).

Il est maintenant clairement établi que l'épidémie d'ESB a été causée par l'utilisation de compléments alimentaires préparés à partir de carcasses d'animaux d'élevages contaminés

(ovins et bovins). Ces farines de viande et d'os ont été interdites en 1988, ce qui a permis de considérablement diminuer l'incidence de l'ESB.

Cette épizootie a été responsable d'une crise sanitaire en raison de la grande capacité de l'agent bovin à franchir la barrière d'espèce. En effet l'ingestion de viande et d'abats de bovins contaminés a entraîné la contamination d'autres espèces animales mais aussi et surtout de l'Homme (Bruce et al. 1997). La transmission par voie orale de l'agent bovin chez l'humain est ainsi responsable d'une Maladie de Creutzfeldt-Jakob particulière, appelée la variante de la MCJ.

c. Autres ESST animales

La maladie du dépérissement chronique (de l'anglais Chronic Wasting Disease, CWD) est une ESST touchant les cervidés d'Amérique du Nord. Les premiers cas ont été décrits dès 1967 chez des cerfs captifs du Colorado puis la maladie s'est propagée au Canada où des cerfs d'élevage ont déclaré la maladie en 1996. Depuis 2000 on retrouve cette pathologie chez des animaux en liberté. Les signes cliniques associent au début une difficulté de mouvement puis une perte de poids s'aggravant avec l'évolution de la maladie. On observe aussi des troubles du comportement et une hyper salivation. La propagation de la CWD par contamination horizontale est avérée et il est possible que le toilettage mutuel des animaux soit impliqué dans cette contamination puisque l'agent pathogène est retrouvé dans la salive des cervidés contaminés (Mathiason et al. 2006).

L'encéphalopathie transmissible du vison (Transmissible Mink Encephalopathie, TME) est apparue de façon sporadique dès 1947 dans des élevages aux Etats-Unis. Par la suite l'épidémie de TME en 1985 a été directement reliée à l'utilisation de viande contaminée dans l'alimentation des visons (Marsh and Bessen 1993).

Les autres encéphalopathies animales retrouvées sont aussi directement liées à la consommation de farines alimentaires infectieuses ou de carcasses de viande contaminées. On retrouve ainsi l'Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF) qui touche le chat domestique mais aussi des grands félins sauvages placés en captivité dans des zoos. On parle aussi d'encéphalopathie spongiforme d'animaux de zoo pour les grands ruminants et les primates captifs infectés par leur alimentation (Sigurdson and Miller 2003).

2. Les maladies à prions humaines

Les maladies à prions humaines sont réparties en trois groupes selon leur étiologie : on distingue la maladie de Creutzfeldt-Jakob de forme sporadique (MCJs), les formes génétiques (MCJ familiale, syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et insomnie fatale familiale (IFF)), et les formes acquises (Kuru, MCJ iatrogène, variante de la MCJ (vMCJ)). Ce sont des maladies rares avec une incidence annuelle de 1,5 à 2 cas par million d'habitants en France et qui se caractérisent par un syndrome démentiel associé à des troubles comportementaux et des signes neurologiques variés (ataxie cérébelleuse, myoclonies, syndrome pyramidal et extrapyramidal...).

a. Les formes sporadiques

La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique a été décrite en 1920 par Creutzfeldt puis en 1921 par Jakob, elle est la forme la plus fréquente des maladies à prions humaines et représente 80 à 90% des cas.

Cette forme atteint principalement des individus entre 50 et 75 ans, sans distinction de sexe, et avec une répartition mondiale uniforme. Au niveau clinique, cette maladie se caractérise par une durée d'évolution relativement courte, de 6 mois en moyenne. Dans sa forme commune, la maladie débute par des troubles de l'humeur, de la mémoire, du langage ainsi qu'une apraxie. Ces troubles évoluent rapidement vers une démence, associée à une ataxie et à des signes pyramidaux et extrapyramidaux.

L'origine de la forme sporadique de la MCJ reste encore inconnue. Effectivement aucune mutation dans le gène codant pour la PrP n'est identifiée et aucune étude épidémiologique n'a permis de mettre en évidence des facteurs pouvant expliquer l'ensemble des cas de MCJ sporadique. Le changement de conformation de la PrP pourrait être dû à une mutation somatique, à une erreur de traduction au niveau d'un neurone, mais aussi à une conversion spontanée de la PrPc en PrPsc.

Toutefois l'analyse du gène *PRNP* codant pour la protéine prion a pu mettre en évidence un polymorphisme méthionine-valine (MV) au codon 129. Il s'avère que 50% de la population mondiale est hétérozygote alors que l'on retrouve une forte proportion d'homozygotes méthionine-méthionine (MM) dans la population des MCJs (Palmer et al. 1991; Laplanche et al. 1994).

b. Les formes génétiques

Les formes génétiques représentent 10 à 15% des ESST humaines. Elles sont dues à des mutations ou des insertions au niveau du gène *PRNP* situé sur le chromosome 20 chez l'Homme (**Figure 1**). Plus de 50 mutations ont été décrites et se transmettent sur le mode autosomique dominant. Le phénotype est très variable, même au sein d'une même famille.

En fonction de la clinique, des lésions histologiques, de la mutation en cause ou de la taille des insertions, on différencie les MCJ génétiques, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF).

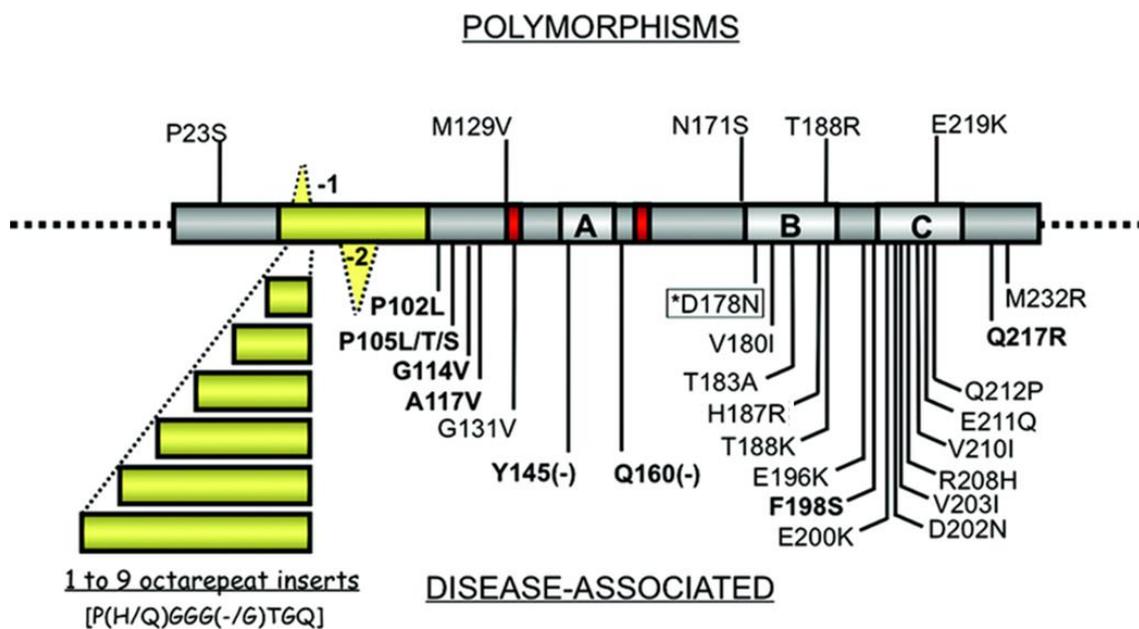


Figure 1 : Polymorphismes et mutations du gène *PRNP*.

Toutes les mutations en gras sont associées à un phénotype de GSS, les mutations encadrées correspondent à une IFF ou MCJ selon le polymorphisme au codon 129, les autres mutations correspondent à un phénotype MCJ. (Mastrianni 2010).

i. Les MCJ génétiques :

Les formes familiales de MCJ représentent 10% des cas de MCJ. Différentes mutations ont été décrites, la plus fréquente est la mutation E200K, responsable de 50% des cas de MCJ génétique (Kovacs et al. 2005). L'âge moyen d'apparition de la maladie se situe à 60 ans et les signes cliniques, démence myoclonique d'évolution rapide, et neuropathologiques sont comparables à ceux de la forme sporadique. La durée d'évolution est assez variable, pouvant aller de quelques mois à quelques années.

ii. Le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

Ce syndrome a été décrit en 1936 en Autriche. La mutation la plus fréquemment retrouvée chez des patients atteints de GSS est la mutation P102L (substitution d'une leucine par la proline au codon 102 du gène *PRNP*). La maladie survient vers 40 ans et son évolution est relativement longue, pouvant aller au-delà de 10 ans. Dans la forme la plus commune, le début est marqué par une ataxie cérébelleuse qui peut rester longtemps isolée avant l'apparition des troubles cognitifs. Sur le plan neuropathologique, outre les lésions caractéristiques, on peut observer que l'accumulation de protéine prion pathogène est constamment associée à la formation de plaques amyloïdes de type multicentrique.

D'autres mutations plus rares sont aussi responsables d'un GSS, c'est le cas de la mutation A117V qui a été décrite dans quatre familles. Certaines substitutions n'ont été observées que dans une famille, voire chez un unique patient (mutations F198S, Q217R, P105L, Y145*).

Une substitution observée plus récemment est particulièrement intéressante. En effet, au niveau du codon 211 du gène *PRNP*, la substitution du glutamate (E) par l'aspartate (D) est responsable d'un GSS, alors que la substitution du glutamate (E) par la glutamine (Q) est associée à une MCJ génétique (Peoc'h et al. 2012). Les tableaux cliniques et neuropathologiques de ces deux maladies à prions sont très différents : évolution lente et accumulation de PrP^{Sc} dans le SNC associée à une pathologie tau neurofibrillaire pour le GSS (E211D), en revanche, évolution rapide et peu de dépôts de PrP^{Sc} pour la MCJ familiale (E211Q).

iii. L'Insomnie Fatale Familiale

L'IFF a été décrite par Medori en 1992 en Italie (Medori et al. 1992). Elle est due à une mutation ponctuelle au codon 178 (D178N) associée, sur le même allèle, à une méthionine au codon 129 (Montagna et al. 2003). En revanche, si l'allèle muté code pour une valine au codon 129, le tableau clinico-pathologique est celui d'une MCJ. L'âge de début moyen de la maladie est de 50 ans. Au niveau clinique la maladie est caractérisée par une insomnie rebelle aux traitements, avec hallucinations, associée à des troubles neuro-végétatifs, des difficultés motrices et d'une démence qui peut être tardive. La maladie évolue en moyenne pendant 13 mois, mais on peut noter que les patients homozygotes MM au codon

129 ont une évolution courte (<12 mois) alors que les patients hétérozygotes ont une évolution plus longue (>12 mois) (Cortelli et al. 1999).

c. Les formes infectieuses

En France, environ 5% des cas d'ESST humaines sont imputables à une transmission dont l'origine infectieuse a pu être caractérisée.

i. Le Kuru

Cette maladie, décrite pour la première fois par Carleton Gajdusek en 1957 et retrouvée uniquement chez le peuple de Foré de Papouasie Nouvelle-Guinée, a touché plus de 3000 individus, principalement des femmes et des enfants (Gajdusek and Zigas 1957). La transmission de cette maladie était due aux rites funéraires cannibales, impliquant la consommation d'organes infectieux de sujets eux-mêmes décédés d'un Kuru. Les femmes et les enfants consommaient les viscères et le cerveau, hautement infectieux, tandis que les muscles, faiblement infectieux, étaient réservés aux hommes, qui, de plus, participaient moins souvent à ces pratiques, expliquant ainsi la différence d'incidence selon le sexe et l'âge. La mort survenait en 12 mois en moyenne après l'émergence des premiers symptômes. L'étude histopathologique du SNC des patients révèle la présence de plaques amyloïdes de PrP caractéristiques. L'incidence de la maladie a progressivement diminué de puis l'arrêt des pratiques d'endo-cannibalisme en 1956. L'origine des premiers cas pourrait être une MCJ sporadique apparue dans la région.

ii. Les MCJ iatrogènes

Ce sont les rares formes transmises de MCJ (moins de 1 % des cas) par acte médical. En France, 132 cas de MCJ iatrogènes ont été observés depuis 1991 (Brandel, Peckeu, and Haïk 2013). Plusieurs modes de contamination ont été décrits à ce jour :

- Contamination par voie centrale

Ces contaminations font suite à des interventions chirurgicales, soit par greffe de tissus contaminés dont le procédé de stérilisation ne permet pas l'inactivation de l'agent pathogène (greffes de dure-mère et de cornées), soit lors de l'utilisation d'instruments neurochirurgicaux ou d'électrodes stéréotaxiques mal décontaminés (les procédés de décontaminations utilisés dans les années 70 et 80 ne permettaient pas l'inactivation des prions).

- Contamination par voie périphérique

Les premiers cas de MCJ liés à un traitement par hormone de croissance humaine ont été identifiés en 1985 aux Etats-Unis puis au Royaume-Uni, les premiers cas français ont été détectés en 1991. Les patients ont été infectés par l'injection de lots d'hormone de croissance humaine extraite à partir de pools d'hypophyses de cadavres (Powell-Jackson et al. 1985; Gibbs et al. 1985). En France une période dite à haut risque de contamination a été définie, entre décembre 1983 et juillet 1985, date à partir de laquelle une étape supplémentaire a été ajoutée lors de la purification des hormones (traitement à l'urée).

Le tableau clinique de cette MCJ iatrogène est assez stéréotypé. Tout d'abord les signes cliniques apparaissent chez des sujets jeunes, on observe alors une ataxie cérébelleuse, des troubles de l'oculomotricité et un nystagmus. La maladie évolue avec des troubles du comportement et une démence, associés à des myoclonies. La durée d'évolution est de 17 mois en moyenne. L'analyse histopathologique révèle les lésions classiques des ESST accompagnées de plaques amyloïdes de PrP, notamment dans le cervelet.

D'autres cas de MCJ iatrogènes ont été rapportés dans le cadre d'un traitement de l'infertilité féminine à l'aide d'injections de gonadotrophines extractives d'origine humaine, principalement en Australie.

Quelques cas de MCJ iatrogènes ont été rapportés au Royaume-Uni suite à une contamination par transfusion sanguine provenant de donneurs décédés quelques années plus tard de vMCJ. Depuis 1999, un programme de déleucocytation systématique du sang a été mis en place afin d'éviter de limiter le risque transfusionnel lié aux maladies à prions.

iii. La variante de la MCJ

Le renforcement de la surveillance épidémiologique en Europe a permis aux britanniques d'identifier dès 1994 puis d'annoncer en 1996, l'émergence d'une forme nouvelle de MCJ : la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou vMCJ. La concomitance spatiale et la succession temporelle de l'épizootie d'ESB et de l'apparition de cette nouvelle forme de MCJ ont suggéré la possibilité d'une infection de l'espèce humaine par l'agent responsable de l'ESB. La transmission de l'ESB et de la vMCJ à des souris sauvages montre que l'agent a les mêmes caractéristiques de souches dans les deux maladies, ce qui a permis de confirmer cette hypothèse (Collinge et al. 1996; Bruce et al. 1997). La PrP^{Sc} retrouvée

chez les patients a une signature biochimique similaire à celle retrouvée dans les organes des bovins atteints d'ESB et de primates inoculés par l'agent de l'ESB (Lasmezas et al. 1996). De plus, l'analyse du SNC de ces primates a révélé la présence de plaques amyloïdes de type floride, ce qui est caractéristique des dépôts retrouvés dans la vMCJ. Enfin, l'étude comparant les cas britanniques et français de vMCJ n'a pas permis de mettre en évidence de différences, aussi bien au niveau clinique que biochimique et neuropathologique, confirmant la même origine pour cette pathologie (Brandel et al. 2009).

On dénombre à ce jour 178 cas au Royaume-Uni et 27 cas en France, les deux pays les plus touchés. Aucun cas n'a été déclaré en France depuis 2014. La contamination par voie orale reste l'hypothèse la plus probable puisqu'aucun facteur de risque n'a pu être mis en évidence chez les patients (Ward et al. 2006).

Sur le plan clinique, la vMCJ touche l'adulte jeune (30 ans au Royaume-Uni, 35 ans en France) et les premiers signes sont peu spécifiques et rendent le diagnostic d'autant plus difficile. En effet, au début de la maladie les signes sont surtout psychiatriques (symptômes anxieux ou dépressifs) et non neurologiques. Moins fréquemment on peut observer des douleurs pouvant toucher les membres ou le visage. Ensuite apparaissent les signes neurologiques qui sont souvent une ataxie cérébelleuse et un syndrome pyramidal. L'évolution ressemble ensuite à celle des autres formes de maladies à prions avec une aggravation de tous les signes et l'apparition d'un état de mutisme akinétique. Le décès survient après une évolution de 15 mois environ. Le tableau clinique rappelle plus le Kuru et la MCJ suite à une contamination par hormone de croissance que la MCJ sporadique.

Au niveau neuropathologique, la vMCJ est caractérisée par la présence d'un grand nombre de plaques amyloïdes de type Kuru, certaines sont entourées d'une couronne de vacuoles et sont appelées plaques florides, « florid plaques ». Ces plaques ont parfois un aspect multicentrique. Les lésions de gliose et de spongiose sont diffuses.

Une des conséquences du tropisme particulier de l'ESB chez l'espèce humaine est que l'on retrouve de la PrPres dans les organes lymphoïdes périphériques des patients atteints de vMCJ (amygdales, rate, ganglions lymphatiques, ...). Ceci n'est généralement pas observé dans les autres ESST humaines.

Enfin, l'étude du gène *PRNP* lors de la pose de diagnostic afin d'éliminer une mutation responsable de la maladie, montrait jusqu'à très récemment que tous les patients atteints de vMCJ étaient homozygotes MM au codon 129. Il se posait alors la question de savoir si une forme de vMCJ avec une période d'incubation plus longue pour les individus

MV ou VV pourrait apparaître dans les prochaines années et être responsable d'une nouvelle incidence de vMCJ dans la population. Cette hypothèse semble malheureusement se vérifier avec le premier cas britannique hétérozygote MV, décédé au début de l'année 2016 d'un vMCJ certain (Mok et al. 2017).

3. Neuropathologie

Les lésions causées par les ESST se retrouvent exclusivement au niveau du SNC et consistent en un tableau lésionnel caractéristique comprenant : une spongiose du neuropile, une importante gliose astrocytaire ainsi qu'une activation microgiale, la présence de plaques amyloïdes et une perte neuronale (**Figure 2**). Aucun syndrome inflammatoire n'est observé. L'apparition des lésions (gliose et spongiose) est corrélée à l'accumulation de PrP^{sc} dans le cerveau, dont la présence est pathognomonique des maladies à prions.

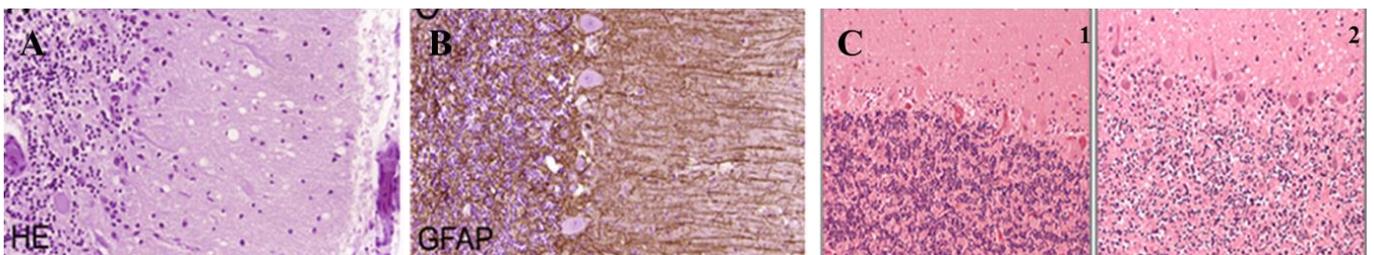


Figure 2 : Tableau lésionnel caractéristique des ESST

A : spongiose de la couche moléculaire du cortex cérébelleux (coloration à l'hématoxyline-éosine). **B** : gliose astrocytaire (immunomarquage de la GFAP). **C** : Dépopulation de la couche des neurones granulaires du cervelet au cours de la MCJ sporadique, 1) patient témoin, 2): MCJ sporadique.

a. Spongiose du neuropile

La spongiose est la lésion la plus fréquente des ESST bien qu'elle ne soit pas constante (Seilhean, Duyckaerts, and Hauw 1995). Elle résulte de la formation de vacuoles au niveau intra neuronal, au dépend des corps cellulaires et des prolongements nerveux (Brandel et al. 2009). Les mécanismes responsables de la formation de ces vacuoles sont mal connus, mais la présence de vacuolisations neuronales dans d'autres pathologies d'étiologies diverses est une caractéristique dégénérative plus générale, probablement liée à l'échec du maintien de l'homéostasie cellulaire (Kourie 2002).

b. Gliose astrocytaire et activation microgliale

Une prolifération astrocytaire peut être mise en évidence par un immunomarquage de la protéine gliofilamentaire (GFAP). Cette réaction astrocytaire est d'autant plus importante que la perte et la vacuolisation neuronale sont intenses.

Cette réaction microgliale présente dans les ESST a longtemps été sous-estimée mais est pourtant bien présente, notamment dans le neuropile, au niveau des zones de vacuolisation, mais aussi aux abords des plaques de dépôts amyloïdes. Les cellules microgliales composant la microglie sont des macrophages résidents du SNC. Bien qu'aucune réponse immunitaire ne soit détectée au cours des ESST, les cellules microgliales prolifèrent et sont activées, libérant alors des molécules (protéases, cytokines, ...) pouvant être toxiques pour les neurones. Cependant une étude récente montre que le rôle de cette activation gliale pourrait être neuroprotecteur (Zhu et al. 2016). En effet, l'ablation de la microglie *in vitro* dans des cultures de tranches organotypiques de cervelet ou *in vivo* dans un modèle murin transgénique résulte en une augmentation des dépôts de PrP^{Sc} et une aggravation de la neurotoxicité. La microglie agirait en phagocytant les agrégats de PrP^{Sc}, permettant de diminuer ou au moins de retarder l'avancée du processus pathologique.

c. Plaques amyloïdes

L'apparition de plaques amyloïdes n'est pas une signature spécifique des maladies à prions et peut être retrouvée dans d'autres protéinopathies telle que la maladie d'Alzheimer. L'apparition de plaques amyloïdes à PrP n'est pas systématiquement retrouvée dans les différentes formes d'ESST. Chez l'Homme elles sont présentes dans certaines formes de MCJ, dans le GSS, le Kuru, et elles sont observées en nombre variable dans les autres ESST naturelles ou expérimentales (tremblante du mouton, ESB, maladie du dépérissement chronique).

Ces plaques sont majoritairement constituées de dépôts extracellulaires de filaments de PrP^{Sc} organisés en hélices et formant des fibrilles amyloïdes. D'un point de vue strictement anatomopathologique, ces plaques peuvent être classées en fonction de critères morphologiques bien déterminés et des lésions qui leur sont directement associées. On distingue ainsi :

- des plaques de type Kuru, qui sont des plaques arrondies, comportant un cœur dense entouré de fibrilles radiaires (**Figure 3**)

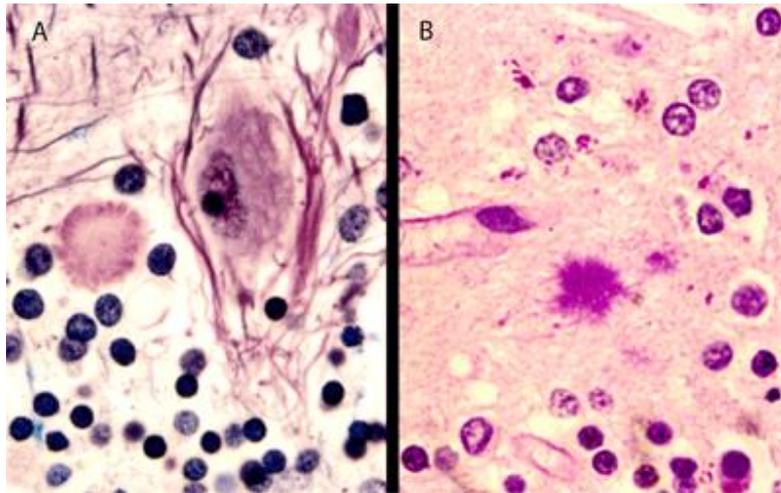


Figure 3 : Plaques de type Kuru dans la MCJ sporadique
A : coloration au Bodian-Luxol. **B** : coloration au PAS

- des plaques "multicentriques" caractéristiques du GSS, comprenant plusieurs foyers denses de dépôts amyloïdes sans fibres radiales (**Figure 4**) (Kitamoto et al. 1986). Elles sont souvent associées à des dépôts de matériel amorphe non organisé en structure amyloïde (Jeffrey, Goodbrand, and Goodsir 1995). Des prolongements astrocytaires y sont étroitement associés.

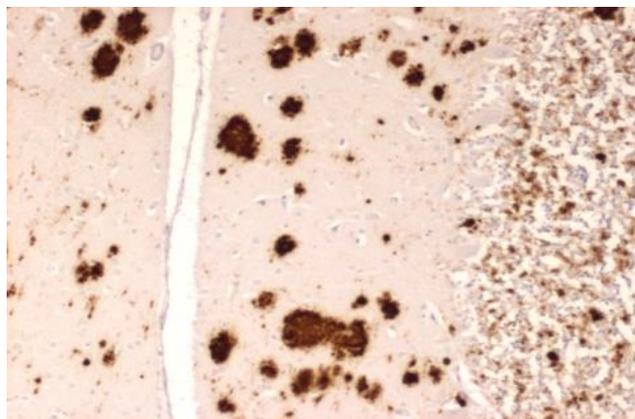


Figure 4 : Plaques multicentriques dans le cervelet d'un patient atteint d'un GSS
 Immunomarquage de la PrP par l'anticorps 3F4

- des plaques dites florides, constituées d'une plaque de type Kuru entourée d'une couronne de vacuoles (**Figure 5**). Ces plaques sont caractéristiques de la variante de la MCJ (Will et al. 1996).

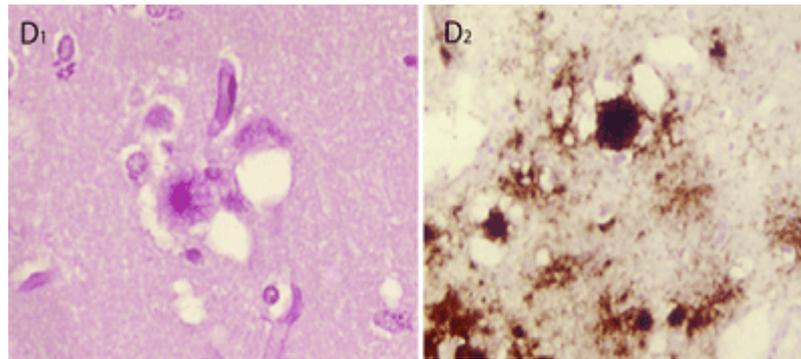


Figure 5 : Plaques florides

D1 : coloration au PAS ; **D2** : immunomarquage de la PrP (3F4)

d. Perte neuronale

La mort neuronale est une lésion retrouvée dans toutes les formes d'ESST, mais l'intensité et la localisation des lésions sont variables selon les cas. Dans le cas des maladies humaines il a été observé que la mort neuronale est d'autant plus importante que la phase clinique est longue et que les neurones survivants montrent une perte importante des varicosités dendritiques (Hauw et al. 2000). Dans le cervelet, elle est plus marquée chez les patients VV2 et son intensité varie avec la quantité et le type de dépôts de PrP (Faucheux et al. 2009; Faucheux et al. 2011).

4. Neurodégénérescence dans les ESST

a. PrP^{sc} et toxicité

La mort neuronale dans les ESST, et dans les maladies neurodégénératives en général, arrive par mort cellulaire programmée ou apoptose (Mattson 2000), quoique cela soit assez peu documenté chez l'Homme (Gray et al. 1999). Les deux hypothèses pouvant expliquer cette mort dans les maladies à prions sont : la perte de fonction de la protéine prion ou bien le gain d'une fonction toxique de la protéine mal repliée.

- Hypothèse de la perte de fonction :

Selon cette hypothèse, la mort neuronale est due à une perte de l'activité de la PrP^c suite à son mauvais repliement. Effectivement la protéine prion est impliquée dans la transduction du signal cellulaire, en interagissant avec de nombreuses protéines intracellulaires (Martins et al. 2002), il se pourrait donc que la perte de l'activité de la PrP^c entraîne un dysfonctionnement du signal de survie neuronale. Cette hypothèse est en accord

avec des études menées sur des lignées neuronales *Prnp*^{-/-}, qui montrent que ces lignées sont plus susceptibles à l'apoptose lors d'agressions (privation en sérum par exemple) par rapport aux lignées exprimant la PrPc (Kuwahara et al. 1999).

Cette hypothèse n'est toutefois pas en accord avec les études réalisées à l'aide de souris déplétées en PrPc ou d'autres lignées dont l'expression de la PrPc peut être contrôlée. En effet, les souris knock-out sont des animaux viables (Hetz, Maundrell, and Soto 2003). Les études sur des souris adultes dont l'expression de la PrPc peut être contrôlée et supprimée montrent que les animaux ne présentent pas de neurodégénérescence ou de changement histopathologique, et ce même 15 mois après la suppression de l'expression de la PrPc (Tremblay et al. 1998; Mallucci et al. 2002).

- Hypothèse du gain de fonction toxique :

L'observation simultanée de l'accumulation de PrPsc et des atteintes neuropathologiques dans les cerveaux de la majorité des patients atteints d'ESST ou dans les cerveaux d'animaux naturellement ou expérimentalement infectés a amené la plupart des investigateurs à attribuer une fonction toxique à la PrPsc. Cette hypothèse a été démontrée lors d'essais *in vitro*, montrant une induction de l'apoptose après exposition à des agrégats de protéines mal conformées (Müller et al. 1993; Giese et al. 1995; Bate, Reid, and Williams 2001; Hetz, Maundrell, and Soto 2003) ou au peptide 106-126 (Forloni et al. 1993).

Bien que ces données suggèrent une implication directe de la PrPsc comme agent toxique des ESST, d'autres études montrent une relation plus complexe entre la PrPsc et la toxicité. Ainsi la dissociation entre PrPsc et neurodégénérescence a été observée dans des cas de transmission de l'IFF humaine à des modèles de rongeurs, où les lésions neuropathologiques apparaissent en l'absence ou avec une accumulation très faible de PrPsc (Hsiao et al. 1994; Hayward, Bell, and Ironside 1994; Tateishi et al. 1995; Collinge et al. 1995). Par la suite de nombreuses études ont suggéré que la forme toxique pourrait être une forme intermédiaire, à savoir les oligomères solubles, plutôt que les agrégats insolubles de PrPsc (Weissmann et al. 2002; Kazlauskaitė et al. 2005; Masel, Genoud, and Aguzzi 2005; Novitskaya et al. 2006; Haass and Selkoe 2007; Simoneau et al. 2007). Ces données sont en accord avec une idée plus récemment développée, selon laquelle la réplication et la toxicité de la PrPsc s'effectuent en deux phases distinctes. Ainsi il a été observé que lorsque l'amplification de PrPsc est saturée, la production autocatalytique de l'infectiosité (phase 1) s'arrête et apparaît alors la phase toxique (phase 2), avec la formation supposée de l'espèce la

plus toxique de PrP (Collinge and Clarke 2007; Sandberg et al. 2011; Hannaoui et al. 2013; Sandberg et al. 2014).

b. Mécanismes cellulaires de la mort neuronale

Un des mécanismes de mort cellulaire programmée est l'autophagie (Klionsky and Emr 2000). En condition physiologique l'autophagie est présente à un niveau faible dans le SNC. L'augmentation du nombre d'autophagosomes dans les cerveaux infectés par une ESST a amené à interpréter l'autophagie comme une cause de la neurodégénérescence (Liberski, Gajdusek, and Brown 2002; Liberski et al. 2004; Zhou et al. 2012). Une étude a permis de montrer l'implication de la PrPc dans la répression de l'autophagie dans les neurones (Oh et al. 2008). Il est donc possible que la perte de fonction de la PrPc lors des ESST favorise l'augmentation de l'autophagie.

Bien que plusieurs études soient en faveur d'une implication de l'autophagie dans la mort neuronale au cours des ESST, d'autres données montrent que l'autophagie pourrait jouer un rôle neuroprotecteur en dégradant les dépôts intracellulaires de PrPsc. Effectivement, le traitement pharmacologique de neurones ou de cellules non-neuronales infectés par des agents induisant l'autophagie (imatinib, rapamycine, lithium ou encore tréhalose) induit une augmentation de la clairance de la PrPsc (Ertmer et al. 2004; Heiseke et al. 2009; Aguib et al. 2009).

Un autre mécanisme de mort programmée est l'apoptose. De nombreuses études réalisées sur les maladies naturelles et sur les modèles expérimentaux d'ESST ont permis l'observation de fragmentation de l'ADN et l'activation de plusieurs caspases, ce qui indique que la mort neuronale apparaît aussi selon la voie apoptotique (Giese et al. 1995; Lucassen et al. 1995; Jesionek-Kupnicka et al. 1997; Williams et al. 1997). Les mécanismes de l'apoptose sont plus difficiles à mettre en évidence chez l'Homme, en effet, les ESST humaines sont d'évolution lente (longue période d'incubation plus phase clinique) alors que le phénomène d'apoptose reste rare et compliqué à observer à un moment donné.

De nombreuses autres voies pourraient être en partie responsables de la neurodégénérescence lors des ESST, comme par exemple la voie mitochondriale, qui a été identifiée dans des modèles expérimentaux utilisant des peptides agrégés (PrP 106-126) ou des PrP recombinantes. Les formes toxiques de PrP causent des altérations au niveau de la

membrane mitochondriale, ce qui induit un stress mitochondrial, un relargage du cytochrome c, une activation des caspases et enfin la mort neuronale (Pillot et al. 2000; O'Donovan, Tobin, and Cotter 2001; Lin et al. 2008).

Le stress du réticulum endoplasmique est une autre voie possible. En effet, un changement dans l'homéostasie du calcium Ca^{2+} a été décrit dans plusieurs neuropathologies, dont les maladies à prions (Hetz et al. 2003), or ce dysfonctionnement induit un stress du RE. L'effet délétère du stress endoplasmique serait médié par la dérégulation de la calcineurine (CaN). La CaN est une phosphatase régulée par l'homéostasie du calcium et impliquée dans la fonction synaptique, la mémoire et la mort cellulaire (Mansuy 2003). Ainsi la CaN pourrait être responsable de la dysfonction synaptique et de la perte neuronale au cours des ESST (Soto and Satani 2011).

Le stress du RE active aussi l'Unfolded Response Protein (UPR), qui est une voie neuroprotectrice permettant de diminuer transitoirement la synthèse protéique afin d'assurer la survie de la cellule (Halliday and Mallucci 2014). Mais cette voie peut se retrouver activée de façon constante et les conséquences sont alors délétères, pouvant mener à l'apoptose des neurones. L'inhibition de cette voie lors d'une infection aux prions montre d'ailleurs des effets bénéfiques sur la survie neuronale (Moreno et al. 2013).

Il apparaît donc que plusieurs mécanismes pourraient être en cause lors de la neurodégénérescence au cours des ESST, qu'ils soient activés par une perte ou un gain de fonction de la PrP. Au vu de l'hétérogénéité des maladies à prions observées, aussi bien au niveau clinique que pathologique, il n'est pas impossible que des mécanismes distincts soient impliqués isolément ou de manière combinée dans les différentes formes observées.

II/ La protéine prion : PrP

1. La PrP cellulaire

a. Expression

Le gène *PRNP*, codant pour la protéine prion, a été isolé en 1985 chez les mammifères. Il est situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'Homme et sur le chromosome 2 chez la souris. Ce gène est retrouvé chez tous les mammifères mais aussi dans un certain nombre d'autres espèces animales (reptiles, poissons, oiseaux). Le gène de la PrP est constitué de deux ou trois exons selon l'espèce de mammifère. Une de ses particularités est que la totalité de la séquence codante se situe sur un exon unique, ce qui exclut toute possibilité d'épissage alternatif pouvant entraîner une modification de la structure primaire (Basler et al. 1986; Kretzschmar et al. 1986). Cette séquence de 759 à 768 nucléotides est hautement conservée chez les mammifères, avec plus de 80% d'homologie entre les espèces (Oesch, Westaway, and Prusiner 1991).

La transcription du gène de la PrP conduit à un ARNm de 2,5 kb (Chesebro et al. 1985; McKinley et al. 1987) qui est exprimé majoritairement dans les cellules de type neuronal. Son expression est aussi retrouvée dans les autres cellules du SNC (astrocytes, cellules microgliales, cellules choroïdiennes et épendymaires) ainsi que dans des cellules des organes périphériques. Les transcrits de la PrP sont détectés dans le cerveau et la moelle épinière embryonnaire au stade E13.5 (Manson et al. 1992). A ce stade, l'expression de l'ARNm de la PrP n'est pas limitée aux cellules neuronales différenciées mais aussi aux précurseurs neuronaux et aux astrocytes (McKinley et al. 1987). L'expression de la PrPc est donc régulée au cours du développement et il semblerait, d'après les récents travaux de Mays et al., que l'expression de la PrPc soit également régulée au cours de la maladie (Mays et al. 2014). En effet l'expression de la PrPc est diminuée lors de la pathologie et ce dès la phase asymptomatique (300 jours avant la phase clinique chez les souris hémizygotes *prnp*^{0/+} infectées par une souche RML). Cette régulation n'est pas perceptible chez les animaux ayant une courte durée d'incubation ou des hauts niveaux d'expression de la PrPc. Cette diminution d'expression entraîne une réduction de la réplique du prion faute de substrat et pourrait être en partie responsable des longues périodes d'incubation asymptomatiques observées dans les maladies à prions.

Le produit du gène PRNP est la protéine prion cellulaire (PrPc) qui est une sialoglycoprotéine membranaire de 253 acides aminés chez l'Homme, ancrée à la membrane par une ancre GPI et possédant deux sites de glycosylation. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux, puis transite par l'appareil de Golgi avant d'être adressée à la membrane.

b. Structure

La protéine prion cellulaire mature chez l'Homme n'est plus composée que de 209 acides aminés (du résidu 23 au résidu 231). Son poids varie entre 33 et 35kDa selon son niveau de glycosylation. La protéine est divisée en plusieurs domaines :

- Domaine 23 à 91 : partie N-terminale de la protéine mature. Ce domaine présente une séquence très conservée correspondant à une répétition de 4 à 8 séquences consensus d'octapeptides (PHGGGWGQ), selon les espèces. Cette partie N-terminale est un site potentiel d'interaction de la PrPc avec des structures de type glycosaminoglycanes membranaires. D'autre part la région des octapeptides présente une capacité à lier les ions cuivre divalents, ainsi que le zinc ou le manganèse mais avec une affinité moindre (Brown 2001; Jackson et al. 2001). Cette région est clivée lors de la digestion partielle de la PrPsc par la protéinase K.
- Domaine 92 à 135 : ce domaine contient une région hautement conservée entre les espèces, constituée d'un enchaînement de 15 résidus, riche en alanine et glycine, ce qui lui confère une hydrophobicité importante. Le haut degré de conservation de cette séquence pourrait signifier un rôle fonctionnel majeur. En effet, il apparaît qu'une simple substitution (A117V) suffit à provoquer une maladie chez l'Homme et l'animal (Hegde et al. 1998). De plus ce domaine semble important dans la conversion de la PrPc en PrPsc notamment de par sa propriété de passer d'une forme en hélice α vers des structures en feuillets β (Kazmirski et al. 1995; Zhang et al. 1995). Enfin plusieurs études ont mis en évidence un effet toxique de peptides contenant cette séquence (106-126 ; 118-135 et 105-132) *in vitro* sur des cultures primaires de neurones (Forloni et al. 1993; Haïk et al. 2000; Pillot et al. 2000; Chabry et al. 2003).
- Domaine 136 à 231 : ce domaine représente la partie carboxy-terminale de la protéine. Elle est constituée de trois hélices α et de deux feuillets β (Riek et al. 1996; Hornemann et al. 1997) et possède deux sites de N-glycosylation, permettant l'ancrage de chaînes latérales sucrées. Le dernier résidu, la sérine 231, est liée à un

enchaînement glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), qui permet à la protéine de s'ancrer à la face externe de la membrane plasmique.

L'ensemble de la structure de la protéine est stabilisé par un pont disulfure reliant les hélices α 2 et 3, par les cystéines 179 et 214.

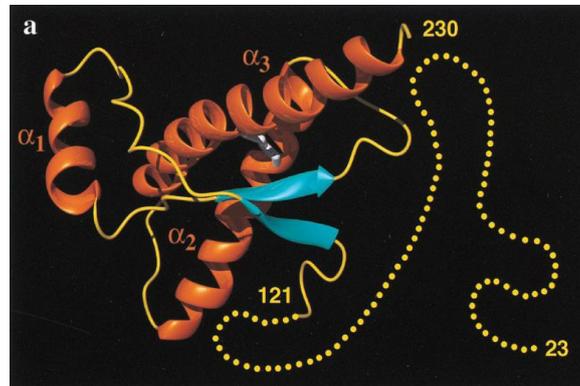


Figure 6 : Structure secondaire de la PrP humaine (23-230).

(Zahn et al. 2000)

La structure secondaire de la PrP a été étudiée par spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Les résultats obtenus suggèrent que la PrPc possède un taux élevé d'hélices α (42%) et peu de feuillets β (3%), ce qui correspondrait à trois hélices α (144-154 ; 175-193 ; 200-219) et 2 feuillets β antiparallèles (128-131; 161-164) formant une structure tertiaire globulaire (**Figure 6**). Seule la première hélice est de nature hydrophile. Le premier tour de la deuxième hélice et le dernier tour de la troisième hélice sont liés par le pont disulfure. Le premier site de N-glycosylation est situé dans la deuxième hélice et le second dans une longue boucle reliant la deuxième à la troisième hélice. Des études montrent que la partie N-terminale (23-121) est très flexible et non conformée dans l'eau (Donne et al. 1997; Zahn et al. 2000).

Si la structure globulaire de la région 121-231 semble stable et peu soumise aux conditions physico-chimiques extérieures, la grande flexibilité de la partie N terminale, sa possible stabilisation par les ions divalents tels que le cuivre et l'importance des conditions physico-chimiques dans sa conformation, suggèrent que ce domaine protéique puisse adopter plusieurs conformations en fonction de son environnement.

c. Cycle cellulaire et localisation

Une fois synthétisée à partir de l'ARNm, la PrPc est adressée dans le réticulum endoplasmique (RE) par son extrémité N-terminale qui reconnaît la SRP (« Signal recognition protein »). La grande majorité de la protéine native (90%) est transloquée dans le RE où ont lieu les modifications post-traductionnelles, puis est exportée à la membrane. Les modifications post-traductionnelles de la PrP au cours de sa maturation dans le RE et l'appareil de Golgi consistent en une N-glycosylation au niveau des asparagines 181 et 197 ainsi que la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 179 et 241. La maturation de la protéine se poursuit par l'élimination d'un court peptide C-terminal par une transamidase qui catalyse la fixation d'une ancre lipidique GPI sur le résidu C-terminal (Stahl et al. 1992). Une fois ces modifications effectuées, la protéine rejoint la membrane plasmique et s'ancre au niveau des radeaux lipidiques de la membrane, appelés « rafts » (Naslavsky et al. 1997). Chez l'Homme, bien que la majorité des molécules de PrP soient ancrées à la membrane par leur ancre GPI, la PrPc peut aussi exister sous une forme transmembranaire. L'insertion de la PrP à la membrane s'effectue par le domaine 110-135 de la protéine. Deux types de PrP transmembranaires sont différenciés selon l'extrémité située à la face extracytoplasmique : la NtmPrP (extrémité N-terminale) et la CtmPrP (extrémité C-terminale). Ces formes restent minoritaires (< 10 %) dans le métabolisme de la PrP (Hegde et al. 1998).

d. Fonction

Le ou les rôle(s) physiologiques de la protéine prion sont aujourd'hui encore mal connus. L'étude de modèles murins transgéniques invalidés pour le gène *Prnp* montre que ces animaux ont un développement normal, sans aucun phénotype particulier (Büeler et al. 1992; Manson et al. 1994). Ces animaux sont en revanche résistants à l'infection aux prions (Büeler et al. 1993).

De légères perturbations ont toutefois pu être mises en évidence, comme une altération du rythme circadien (Tobler et al. 1996; Tobler, Deboer, and Fischer 1997) mais aussi des anomalies de la fonction synaptique avec un affaiblissement de l'inhibition rapide induite par les récepteurs GABA A (Collinge et al. 1994), une altération de la potentialisation à long terme (Manson et al. 1995) ainsi qu'un dysfonctionnement des courants potassiques calcium dépendants dans certaines cellules (Colling, Collinge, and Jefferys 1996; Herms et al. 2001). Plus récemment une étude a montré un rôle de la PrP dans le maintien de la myélinisation, et ce sur quatre lignées knock-out indépendantes (Bremer et al. 2010). En effet les souris

montraient des signes de polyneuropathie démyélinisante chronique ou « chronic demyelinating polyneuropathy » (CDP) dès l'âge de 10 semaines (diminution de la force de préhension et de la nociception).

L'ensemble de ces études a été réalisé sur des lignées *prnp*^{-/-} générées à partir de cellules souches embryonnaires de la lignée murine 129, puis généralement croisées avec d'autres lignées murines. Ces croisements peuvent entraîner des confusions dans les observations phénotypiques et donc de mauvaises conclusions. L'équipe d'Adriano Aguzzi a mis au point une nouvelle lignée murine dépletée en PrPc en utilisant des enzymes de restriction TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) sur des oocytes murins fertilisés de la lignée C57BL/6J (Nuvolone et al. 2016). Une nouvelle lignée appelée Zurich-3 (ZH3) a ainsi été créée, et elle est strictement co-isogénique à la lignée C57BL/6J. L'étude de cette lignée ZH3 montre qu'à partir de 14 mois les souris ont une diminution significative de la densité axonale au niveau des nerfs sciatiques, comparativement à la lignée sauvage, et développent une CDP. Ces observations confirment l'implication de la PrPc dans le maintien de la myéline au niveau périphérique.

La PrPc serait aussi impliquée dans la lutte contre le stress oxydatif grâce à sa capacité à se lier aux ions cuivre divalents (**Figure 7**). En effet les ions cuivre agissent comme catalyseurs dans la formation d'Espèces Oxygénées Activées (EOA) comme le radical hydroxyde OH[•]. La PrPc, localisée préférentiellement dans les synapses, peut lier jusqu'à six molécules de cuivre et ainsi lutter contre la formation d'EOA, le niveau de cuivre pouvant se retrouver élevé dans la fente synaptique lors de la repolarisation de la membrane (Viles, Klewpatinond, and Nadal 2008; Um et al. 2012; Herms et al. 1999). Des études ont ainsi mis en évidence que des ischémies focales, entraînant des taux élevés d'EOA, avaient pour conséquence une augmentation de l'expression de PrPc, et que les niveaux de PrPc étaient inversement corrélés à la gravité des dommages de l'ischémie (McLennan et al. 2004; Mitsios et al. 2007; Weise et al. 2004; Shyu et al. 2005).

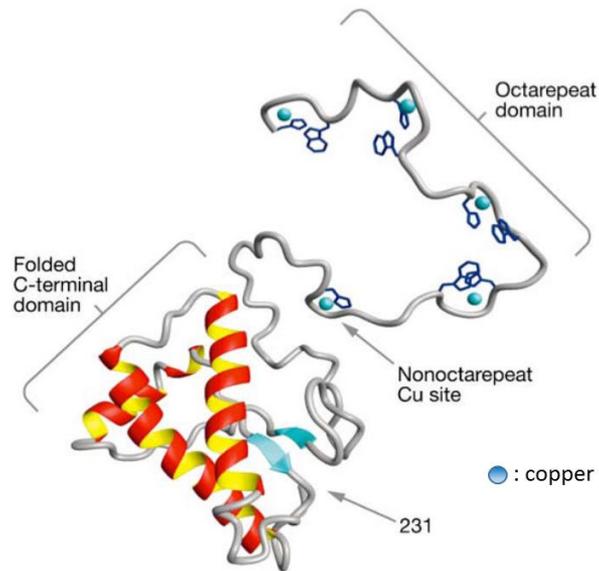


Figure 7 : Modèle structural de la PrPc liée à des molécules de cuivre.

Le cuivre interagit avec les motifs HGGGW du domaine de répétition. (D'après (Millhauser 2007)).

e. PrPc et transduction du signal cellulaire

La PrPc pourrait avoir un rôle potentiel dans la transduction du signal cellulaire, en agissant comme récepteur ou co-récepteur de ligands solubles ou membranaires. De nombreuses interactions avec divers partenaires protéiques ont été étudiées (essais de liaison *in vitro* : co-précipitation et co-immunomarquage), ses interactions entraînant une réponse biologique dans des cultures de lignées neuronales ou de cultures primaires de neurones.

Ainsi l'interaction de la PrPc avec la laminine, protéine de la matrice extracellulaire (MEC) stimule la formation de neurites (Graner, Mercadante, Zanata, Forlenza, et al. 2000; Graner, Mercadante, Zanata, Martins, et al. 2000) alors que son interaction avec la vitronectine, autre protéine de la MEC, permet le prolongement des neurites et des axones (Hajj et al. 2007).

La PrPc serait aussi un partenaire du récepteur de la laminine et de son précurseur (37/67 kDa LRP/LR), qui peut se comporter comme un récepteur cellulaire et induire l'internalisation de la PrPc (Rieger et al. 1997; Hundt et al. 2001; Gauczynski et al. 2001). En effet l'utilisation d'un inhibiteur de LRP/LR entraîne une internalisation progressive de ce récepteur et la stabilisation de la PrPc à la surface membranaire (Sarnataro et al. 2016).

De façon intéressante il a été montré que la PrP pouvait agir comme récepteur des oligomères de peptide amyloïde β ($A\beta$) et cette liaison induirait des effets délétères comme la perte de plasticité synaptique (Lauren et al. 2009). Ainsi la PrPc serait impliquée dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et pourrait en être une cible thérapeutique (l'utilisation d'anticorps anti-PrPc *in vitro* permet le rétablissement de la plasticité synaptique) (Lauren et al. 2009).

Une liaison particulièrement intéressante est celle observée entre la PrPc et la protéine STI-1 (pour stress-inducible protein 1). En effet le complexe PrPc-STI-1 permet d'induire le renouvellement des progéniteurs cellulaires mais aussi la formation de neurites ainsi qu'une protection neuronale et astrocytaire contre la mort cellulaire (Zanata et al. 2002; Lopes et al. 2005; Santos et al. 2011; Roffe et al. 2010). L'altération de cette liaison lors d'une prionopathie pourrait donc avoir des effets délétères sur la survie neuronale. De façon intéressante il a été rapporté que l'effet neuroprotecteur du complexe PrPc-ST1 est médié par la voie PI3K/mTOR (Roffe et al. 2010). Pourtant, l'inhibition, en contexte infectieux, de la kinase PDK1 (un des intermédiaires de cette voie) entraîne des améliorations de la motricité ainsi qu'un allongement du temps de survie (Pietri et al. 2013).

Un des premiers partenaires identifiés pour la PrPc a été la kinase Fyn : il a été observé *in vitro* que le cross-linking de la PrPc permettait l'activation de Fyn en présence de cavéoline (Mouillet-Richard et al. 2000). Plusieurs effecteurs en aval sont alors aussi activés : les kinases ERK 1 et 2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), la NADPH oxydase et la protéine facteur de transcription CREB (c-AMP Response Element Binding) (Schneider et al. 2003; Toni et al. 2006; Mouillet-Richard et al. 2007; Pantera et al. 2009; Pradines et al. 2008). Une étude plus récente, réalisée à l'aide de cultures primaires de neurones en grains du cervelet, a mis en évidence que la PrPc régule négativement l'activité de Fyn en conditions physiologiques (De Mario et al. 2015). Ainsi la PrPc permettrait de restreindre l'accumulation de Ca^{2+} dans le cytosol via la voie Fyn/SOCE (Store Operated Ca^{2+} Entry).

2. La PrP pathogène

La forme pathologique et pathogène de la PrPc est la PrPsc, qui s'accumule dans le cerveau des sujets atteints d'ESST.

a. Structure et propriétés

La structure primaire de la PrP^{sc} est strictement identique à celle de la PrP^c, ce qui exclut une modification de l'ARNm. La PrP^{sc} possède elle aussi une ancre GPI et le profil de glycosylation de deux protéines est identique (Turk et al. 1988; Haraguchi et al. 1989).

La structure secondaire, dont l'analyse reste à ce jour incomplète, révèle des différences majeures entre les protéines. Ainsi l'analyse spectroscopique par transformée de Fourier et dichroïsme circulaire montre que la PrP^{sc} est majoritairement constituée de feuillets β puisqu'elle possède 30% d'hélices α et 43% de feuillets β tandis que la PrP^c comprend 42% d'hélices α et 3% seulement de feuillets β (Nguyen et al. 1995; Bazan et al. 1987). La principale différence entre la PrP^c et son analogue pathogène est donc de nature conformationnelle.

La structure tertiaire de la PrP^{sc} ne peut être obtenue par RMN ou diffraction des rayons X en raison de ses propriétés biochimiques (agrégabilité et insolubilité dans les détergents). Les structures disponibles ont été établies à l'aide de la modélisation moléculaire à partir des données de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et de dichroïsme circulaire. Selon ces modèles, la PrP^{sc} est composée de 2 hélices α et de 4 feuillets β (Huang, Prusiner, and Cohen 1996; Wille et al. 2002).

Cette conformation particulière confère à la PrP^{sc} des propriétés physico-chimiques très différentes de celles de la PrP^c (**Tableau 1**). La résistance partielle de la PrP^{sc} à la protéinase K (PK) permet d'observer en Western Blot trois bandes caractéristiques, représentant les différents niveaux de glycosylation de la protéine. La digestion de la PrP^{sc} par la PK induit le clivage de la partie N-terminale et génère un fragment résistant de poids moléculaire entre 27 et 30kDa (noté PrP²⁷⁻³⁰). Ce fragment est appelé PrPres afin de le distinguer de la PrP^c. En effet, bien que la détection de PrPres en WB révèle la présence de la PrP anormale, ce fragment en lui-même n'est pas responsable du caractère infectieux que possède la PrP^{sc}. Ainsi une étude a montré que la résistance à la protéolyse et la transmissibilité de la maladie ne sont pas toujours associées (Piccardo et al. 2007), alors que d'autres travaux ont démontré que certaines formes de PrP^{sc} étaient sensibles aux protéases (Safar, Cohen, and Prusiner 2000; Tzaban et al. 2002) et que dans de rares cas d'ESST, chez l'homme (IFF) et chez l'animal (Nor98), un titre infectieux a pu être détecté alors que la recherche de PrPres était faiblement positive voire négative (Benestad et al. 2003).

	PrPc	PrPsc
Infectiosité	-	+
Résistance PK	-	+
Solubilité dans les détergents	+	-
Digestion PIPLC	+	-
Structure II		
Hélice α	43 %	30 %
Feuillet β	3 %	43 %
Structure III		
Hélice α	4	2
Feuillet β	2	4
Temps de demi-synthèse	< 1 h	15 h
Temps de demi-vie	3-6 h	> 24 h

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la PrPc versus la PrPsc.
(Prusiner 2001)

En analysant un empilement cristallin de PrPsc par microscopie électronique, Stanley Prusiner a proposé un modèle de la PrP27-30 (Wille et al. 2002), dans lequel les feuillets β de la PrPsc s'organiseraient en un cœur hélicoïdal (**Figure 8**). Des interactions entre les feuillets β de différents monomères de PrPsc permettraient à ses monomères de s'assembler en trimères, les arbres de glycosylation restant en périphérie. L'empilement de ces trimères formerait des fibrilles enroulées en hélice gauche. Puis ces fibrilles peuvent s'assembler pour former des fibres amyloïdes (Govaerts et al. 2004).

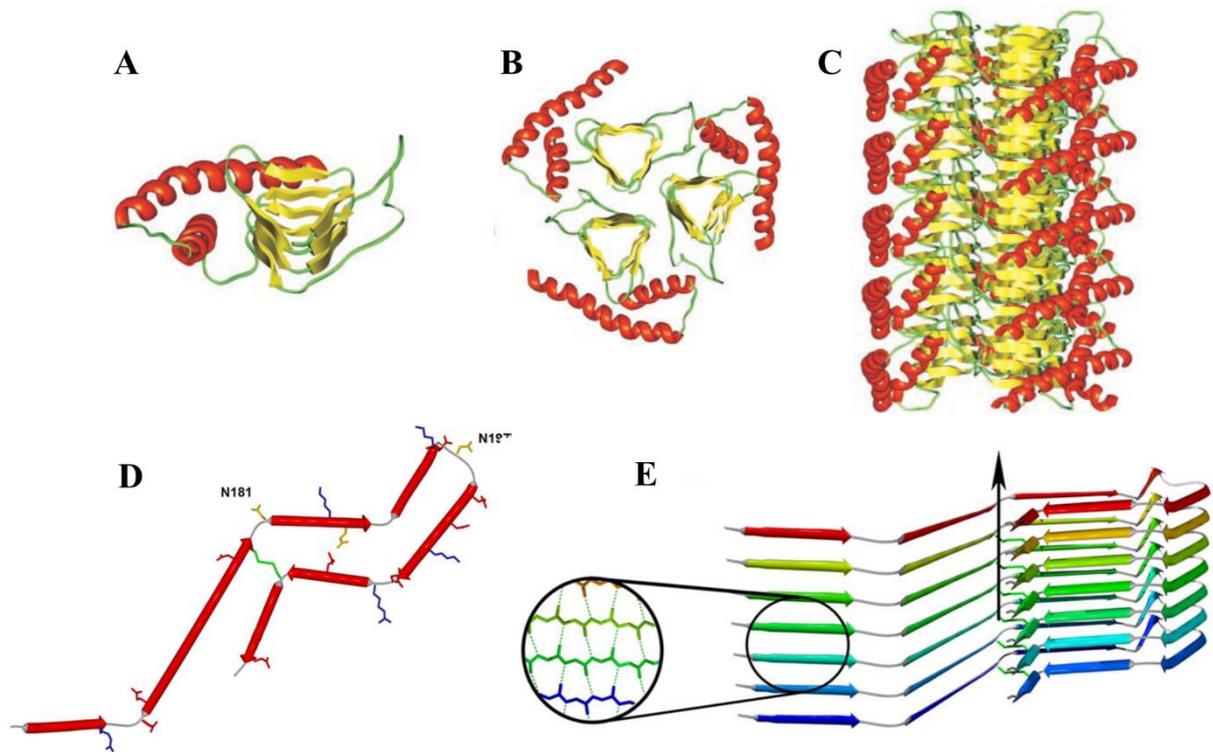


Figure 8 : Représentation des différents modèles de structures tertiaire et quaternaire pour la PrPsc.

A : Modèle du monomère PrP27-30 ; **B** : Modèle d'un trimère de PrP27-30 ; **C** : Modèle de l'assemblage fibrillaire construit sur l'assemblage de trimères. (Govaerts et al. 2004).

D : Modèle de repliement du noyau amyloïde (résidus 159-219) ; **E** : Empilement parallèle de monomères plans, stabilisé par des liaisons hydrogènes. La flèche indique le sens de croissance de la fibrille. (Cobb et al. 2007)

Un autre modèle de structure tertiaire a été proposé, dans lequel le monomère est entièrement plan et principalement composé de feuillets β (**Figure 8**) (Cobb et al. 2007). Dans ce modèle les monomères s'empileraient parallèlement, chaque résidu de la protéine étant aligné avec le même résidu de l'autre molécule, ce qui permet une stabilisation de la structure par des interactions hydrophobes entre les résidus hydrophobes. Les feuillets β des protéines formant la fibre sont tous parallèles et dans la même direction, d'où le nom de structure « in-register parallel ».

Plusieurs études sont en faveur de ce modèle, notamment les données obtenues grâce aux prions des levures. En effet, l'analyse par RMN et microscopie électronique de ces prions a permis de montrer que plusieurs prions des levures possèdent cette architecture de feuillets β en parallèle (Shewmaker, Wickner, and Tycko 2006; Baxa et al. 2007; Wickner, Dyda, and Tycko 2008; Gorkovskiy et al. 2014). Les études portant sur des PrP recombinantes montrent

que les fibres formées spontanément s'assemblent selon une structure en feuillets β intermoléculaires en parallèle (Cobb et al. 2007; Tycko et al. 2010).

Enfin, les travaux plus récents de l'équipe de Byron Caughey montrent que les PrP amyloïdes possédant cette structure en feuillets β intermoléculaires en parallèle sont capables d'initier *in vivo* la propagation de l'activité de seeding de la PrP tout en conservant sa résistance partielle à la PK (Grovetman et al. 2014). Cette structure serait donc une des clés de la propagation des prions.

b. Réplication et conversion

Les prions tiendraient leur pouvoir infectieux de leur capacité à convertir les molécules de PrP^C en PrP^{Sc}. Ainsi lors d'une infection, la PrP^{Sc} servirait d'empreinte pour transmettre ce repliement anormal à la PrP^C. Cette transconformation serait un processus catalytique qui permettrait la propagation de l'agent infectieux. Différents modèles théoriques de la conversion ont été proposés, avec notamment :

- Le modèle autocatalytique :

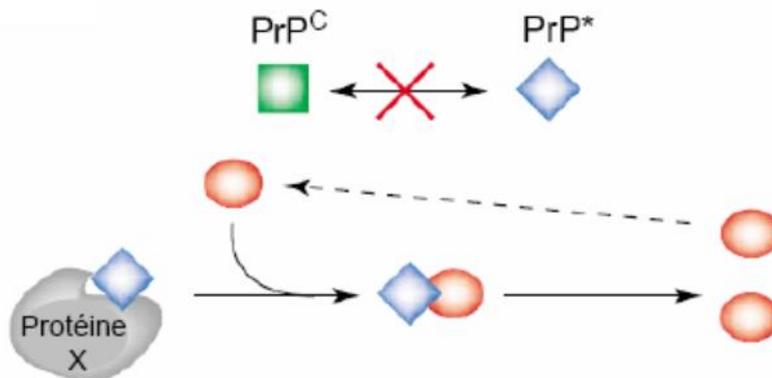


Figure 9 : Modèle autocatalytique de conversion de la PrP^C en PrP^{Sc}.

d'après (Soto and Saborio 2001)).

Le modèle autocatalytique ou « template-directed refolding », la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} ne se fait pas directement mais passerait par un intermédiaire partiellement déplié de la PrP^C, noté PrP^{*}. Cet intermédiaire permet d'abaisser l'énergie nécessaire pour la formation d'une nouvelle molécule de PrP^{Sc} (Huang, Prusiner, and Cohen 1996). La PrP^{*} pourrait résulter de variations aléatoires de la conformation de la PrP^C ou bien de l'association de la

PrP^C avec des facteurs cellulaires ou avec une protéine chaperonne. Les cas sporadiques d'ESST seraient expliqués par un franchissement aléatoire de la barrière d'énergie entre la PrP^C et la PrP^{*}, tandis que dans les formes familiales de maladie, les mutations de PrP favoriseraient cette transition. Enfin, dans un contexte infectieux, l'apport exogène de PrP^{Sc} permettrait d'initier le processus de conversion de PrP^{*} en PrP^{Sc}.

- Le modèle de nucléation-polymérisation :

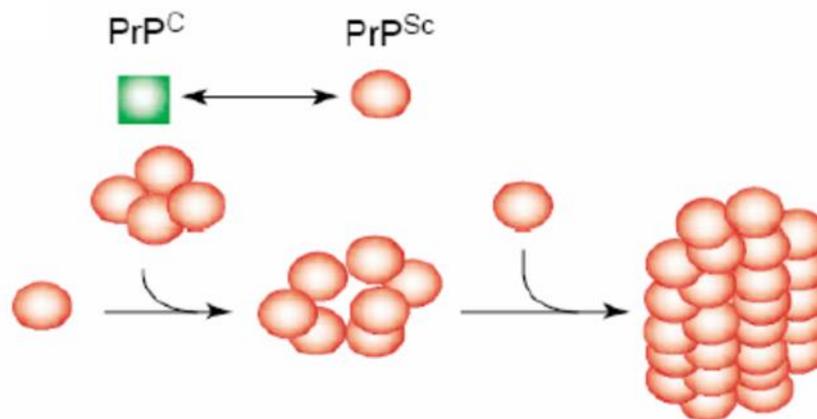


Figure 10 : Modèle autocatalytique de nucléation-polymérisation de la PrP^C en PrP^{Sc}.

(d'après (Soto and Saborio 2001)).

Dans ce modèle la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} monomérique serait réversible, la PrP^{Sc} étant moins stable que la PrP^C. L'agrégation de la PrP^{Sc} permettrait alors sa stabilisation. Les molécules de PrP^{Sc} s'assemblent pour former des multimères, aussi appelés noyaux, qui auraient une activité de conversion. Les molécules de PrP^C pourraient se lier au noyau de PrP^{Sc} et y être converties en PrP^{Sc} de façon stable et non réversible (Caughey et al. 1997). Lorsque les agrégats de PrP^{Sc} atteignent une masse critique, ils se dissocient et forment de nombreux nouveaux noyaux de conversion, permettant l'amplification du processus de conversion.

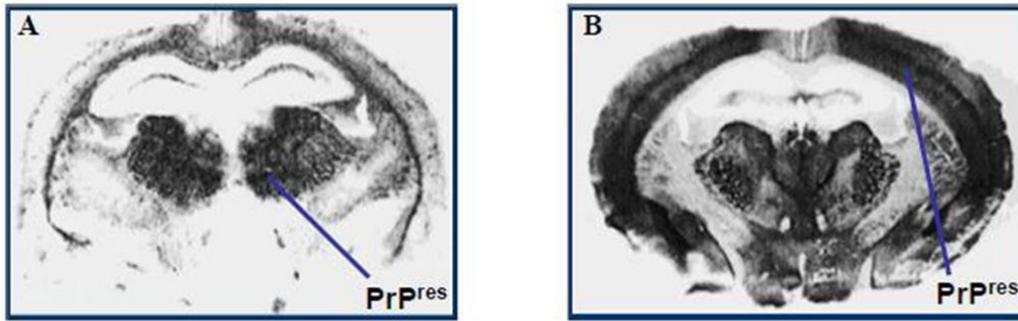
L'étape de nucléation limiterait la conversion spontanée de PrP^C en PrP^{Sc} à l'origine des cas sporadiques. Lors d'une infection par les prions, cette étape serait franchie du fait de l'introduction de noyaux de PrP^{Sc}. En ce qui concerne les formes héréditaires, les mutations de la PrP pourraient accroître l'affinité de la PrP pour le polymère en élongation.

c. Notion de souche de prions

L'observation de différentes souches de prions a été le principal argument contre l'hypothèse d'une protéine seule responsable de l'infection. Effectivement, les souches sont habituellement dues à des variations génétiques chez les agents conventionnels, et il pouvait sembler difficile de concilier la grande diversité des souches de prions avec la nature exclusivement protéique de l'agent infectieux.

L'hypothèse de la protéine seule et l'existence de plusieurs souches de prions sont conciliables si à chaque souche de prion correspond une conformation particulière de la PrP^{sc}. Cette hypothèse a été formulée dès 1982 par Stanley Prusiner qui proposait alors que l'information biologique (latence de la maladie, profil lésionnel...) associée à une souche pourrait être codée par la structure tertiaire de la PrP^{sc} (Prusiner 1982). Cette hypothèse est en accord avec le modèle de structure en feuillets β parallèles, dans lequel les différences de souches peuvent s'expliquer par les variations de positions des virages et des boucles liants les feuillets β , alors que les différences de niveaux de glycosylations entre les souches s'expliqueraient par des gênes stériques ne permettant pas le bon repliement de la PrP^{sc} (Cobb et al. 2007; Groveman et al. 2014).

Les souches d'ESST se caractérisent par l'induction d'une maladie dont les caractéristiques sont très reproductibles chez un groupe d'animaux ayant le même fond génétique. Une souche se stabilise après plusieurs passages sériés chez des hôtes syngéniques, on parle alors de souche « stabilisée » (Dickinson 1975; Bruce, McBride, and Farquhar 1989; Bruce et al. 1991). En pratique, pour une même dose infectante inoculée selon une voie donnée, chaque souche d'agent, induit chez des souris syngéniques, une maladie caractérisée à la fois par une période d'incubation bien déterminée et par un profil lésionnel caractéristique (**Figure 11**). Les critères majeurs d'évaluation de ce profil lésionnel sont les sites d'accumulation de la PrP^{sc} et les sites de spongieuse du SNC. D'autres propriétés peuvent varier selon les souches, comme la résistance aux protocoles de décontamination, la diffusion de l'infectiosité dans l'organisme ou la capacité à franchir la barrière d'espèce. Par exemple, certaines souches peuvent se distinguer par leurs caractéristiques biochimiques, notamment par le profil de migration électrophorétique après digestion à la PK et le profil de glycosylation représenté par le ratio des différents glycoformes ainsi que par leur résistance à la digestion à la PK (Bessen and Marsh 1992; Parchi et al. 1996; Collinge et al. 1996; Khalili-Shirazi et al. 2005).



Souche A

Souche B

Figure 11 : Exemple caractéristique de deux souches d'ESST.

Deux souches différentes propagées chez le même animal, ayant des sites d'accumulation distincts. (D'après (Telling, Parchi, et al. 1996)).

Cette notion de souches de prions a été démontrée par de nombreux travaux. Tout d'abord Bessen et Marsh ont étudié deux souches (DY et HY) de l'encéphalopathie du vison et ont pu observer que ces souches, après digestion à la PK, présentaient des profils électrophorétiques distincts, révélant une sensibilité différentielle à cette protéase (sites de clivage) (Bessen and Marsh 1994). D'autres résultats très convaincants proviennent des expériences d'inoculation de souris transgéniques exprimant une protéine prion chimère homme-souris par des extraits de cerveaux de patients atteints soit d'IFF (mutation D178N) ou de sMCJ (Telling, Parchi, et al. 1996). Les caractéristiques biochimiques de la PrP^{sc} associée à ces deux types d'extraits (migration de la bande non glycosylée à 19kDa pour l'IFF et 21kDa pour la sMCJ étudiée, en Western blot après traitement à la PK) sont conservées après passages successifs aux souris transgéniques, indiquant que la protéine prion chimère homme-souris peut adopter au moins deux structures tridimensionnelles distinctes.

Enfin des études se sont intéressées à la stabilité relative des différents conformères en utilisant un agent dénaturant comme la guanidine ou des concentrations progressives de protéinase K (PK). Les résultats obtenus avec ces courbes de dénaturation à la guanidine ou ces courbes de PK ont montré que la différence de stabilité entre deux souches pouvait être suffisamment importante pour permettre de différencier deux souches ayant des temps d'incubation semblables (Peretz, Scott, et al. 2001) mais aussi de montrer que deux sous-types moléculaires, et possiblement deux souches distinctes pouvaient co-exister chez un même hôte (Uro-Coste et al. 2008).

D'après ces données, ce serait donc une information conformationnelle qui serait transmise à la PrP de l'hôte lors du phénomène de conversion (Peretz et al. 1997). Cette

notion est appuyée par des études de conformation directes ou indirectes. Certains épitopes de la PrP^{sc}, notamment dans le domaine globulaire de la protéine, sont très difficilement accessibles. Lors de procédés de dénaturation par les sels chaotropiques, ces épitopes sont rendus accessibles par différents anticorps, ce qui permet de distinguer des structures spécifiques de souches. Cette méthode connue sous le nom de CDI (« conformation dépendent immunoassay ») a permis de révéler l'existence de 8 conformères correspondant à 8 souches de prions de hamster (Safar et al. 1998).

L'ensemble de ces études tend à montrer qu'il existe, chez un même hôte, des conformations de la PrP^{sc} spécifiques de souches. Il a également été observé qu'en fonction de la susceptibilité gouvernée par la génétique de l'hôte, différentes souches se propagent dans une même espèce. En effet, les études de Wadsworth et collaborateurs sur des souris transgéniques surexprimant la PrP humaine démontrent que la propagation de certaines souches de prion est dépendante du polymorphisme au codon 129 du gène *PRNP* (Wadsworth et al. 2004). Dans le cas de la tremblante chez le mouton et la chèvre, des polymorphismes jouant un rôle dans la susceptibilité aux souches de prions ont également été identifiés (Baylis and Goldmann 2004).

Ainsi au sein des ESST humaines il a été observé différents sous-types moléculaires de MCJ sporadiques, définis selon le profil électrophorétique de la PrP^{sc} après digestion à la PK (type 1 ou 2) et le polymorphisme du gène *PRNP* au codon 129 (MM, MV et VV) (**Tableau 2**) (Parchi et al. 1999; Parchi et al. 2000). Chaque sous-type est aussi caractérisé par un phénotype clinico-pathologique caractéristique. Des études sur des animaux syngéniques ont permis de mieux caractériser ces sous-types et il apparaît que les isolats MM1 et MV1 montrent les mêmes propriétés biologiques de souche après inoculation aux animaux, ils sont donc considérés comme étant la même souche de prion humain, appelée M1. Il en est de même pour les isolats MV2 et VV2, regroupés sous le nom de souche V2. Les sous-types VV1 et MM2, ont quant à eux montré des propriétés de souches propres (respectivement nommés souches V1 et M2) (Bishop, Will, and Manson 2010).

Sous type moléculaire	Fréquence (%)	Age moyen (années)	Durée moyenne de la maladie (mois)	Caractéristiques cliniques
MM1 ou MV1	58	63	3	Démence rapide, myoclonies précoces, atteinte visuelle et EEG caractéristique
VV2	14	66	6	Ataxie cérébelleuse précoce, démence tardive, EEG non caractéristique
MV2	14	65	11	Ataxie cérébelleuse associée à une démence, EEG non caractéristique
MM2	7	52	17	Forme thalamique, caractérisée par une insomnie, une ataxie, une démence, un EEG non caractéristique
VV1	2	53	10	Démence progressive, EEG non caractéristique

Tableau 2 : Classification des différents sous types moléculaires.

Classification selon le génotype au codon 129 et le type biochimique de la PrP (d'après (Ironside, Ritchie, and Head 2005; Gambetti et al. 2011)).

Les différences de distribution des agents infectieux dans le SNC suggèrent l'existence d'un tropisme cellulaire de souche. Plusieurs études montrent que le tropisme d'une souche pourrait être régi par la structure tertiaire ou quaternaire de la PrP^{sc}, ce qui influencerait sur sa capacité à interagir avec un ou des co-facteurs cellulaires spécifiques, qui sont diversement exprimés selon le type cellulaire (Aguzzi, Baumann, and Bremer 2008). Certaines données *in vitro* en système cellulaire, confirment l'existence de ce tropisme de souche. En effet, chaque lignée n'est capable de répliquer qu'un nombre limité de souches (Rubenstein et al. 1992; Nishida et al. 2000; Vilette 2008) et réciproquement, chaque souche ne se propage que dans quelques lignées. A titre d'exemple, la souche de tremblante ME7 ne se réplique pas dans les cellules N2a, ni GT1 (Bosque and Prusiner 2000; Klohn et al. 2003), mais est propagée par les lignées SN56, PC12, L929 et MG20 (Rubenstein et al. 1992; Vorberg et al. 2004; Baron et

al. 2006; Iwamaru et al. 2007). La propagation de souches expérimentales dans des cultures primaires de neurones montre aussi des caractéristiques différentes selon le type neuronal utilisé (Hannaoui et al. 2013). D'autres données obtenues *in vivo* confirment cette hypothèse de tropisme de souche. En effet, lorsque des homogénats de rate ou de cerveau d'un même hôte sont inoculés à des souris syngéniques, les caractéristiques de souches retrouvées chez les animaux infectés sont différentes (Béringue et al. 2012). Ceci laisse penser que les facteurs tissus-spécifiques seraient capables d'influencer la réplication des prions, créant ainsi des variants spécifiques d'organes.

Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle une souche de prion n'est pas uniquement un ensemble clonal de PrP^{Sc} mais un ensemble de différentes conformations en équilibre dynamique, avec un composant majeur et des composants mineurs (Collinge and Clarke 2007; Li et al. 2010). Ainsi différents conformères seraient sélectionnés selon l'environnement dans lequel ils se développent, ce qui peut expliquer la préférence de certaines souches pour des régions particulières du SNC (Haik and Brandel 2011).

L'ensemble de ces données illustre la complexité du typage de souche pour les ESST animales ou humaines. L'existence de plusieurs structures spatiales pour une même protéine combinée aux polymorphismes génétiques peut clairement conférer une variabilité de réponses aux agents des ESST et pourrait être à l'origine de l'émergence de nouveaux types d'agents infectieux.

d. Notion de barrière d'espèce.

La barrière d'espèce se traduit par un allongement de la période d'incubation de la maladie lors du passage de prions d'une espèce à une autre et par une diminution du nombre d'animaux infectés, voire par l'impossibilité de transmettre la maladie (Prusiner 1998).

Bien que la séquence de la PrP^{Sc} soit bien conservée entre les espèces, les différences inter-espèces, peuvent en partie expliquer ce phénomène (Chen and Gambetti 2002 ; Vanik, Surewicz, and Surewicz 2004 ; Jones and Surewicz 2005). Par exemple, les prions de hamsters ne se propagent pas chez les souris sauvages mais se propagent chez des souris transgéniques invalidées pour le gène *Prnp* et possédant le transgène codant pour la PrP de hamster (Scott et al. 1989). Des souris exprimant à la fois la PrP^{Sc} murine (MoPrP^{Sc}) et la PrP^{Sc} de hamster (HaPrP^{Sc}) sont permissives aux prions des deux espèces : l'infection par une souche de hamster conduit à une accumulation majoritaire de HaPrP^{Sc} et à des lésions

neuropathologiques caractéristiques de cette souche tandis que l'infection par une souche murine entraîne l'accumulation de MoPrPsc et des lésions caractéristiques de la souche murine (Scott et al. 1989; Prusiner et al. 1990). De manière intéressante, l'expression de la PrPc murine diminue la susceptibilité aux prions de hamster et semble avoir un effet inhibiteur.

De la même façon, l'expression de la PrPc humaine sur fond génétique *Prnp*^{-/-} rend les souris permissives à l'agent de la MCJ sporadique, tandis que les souris sauvages ayant le même fond génétique et exprimant ou non le transgène HuPrP ne propagent pas les prions humains (Telling et al. 1994). Ainsi, le franchissement de la barrière d'espèce est facilité par l'homologie de séquence entre la PrPc de l'hôte et la PrPsc.

III/ Modèles expérimentaux de réplication des prions

1. Modèles *in vitro*

a. Modèles acellulaires

- Cell free conversion assay

L'équipe de Byron Caughey a mis au point le premier modèle de conversion acellulaire (Kocisko et al. 1994). La réaction nécessite de la PrPsc partiellement purifiée, extraite de cerveaux d'animaux infectés, et de la PrPc marquée au soufre radioactif (notée PrPsen), obtenue à partir de surnageant de cultures. Ce système permet de convertir la PrPc en PrPsc avec un rendement de 10 à 20%. Ce rendement a été décuplé en ajoutant la protéine chaperonne Hsp60 au milieu réactionnel (Debburman et al. 1997).

Ce premier modèle acellulaire a permis la reproduction de phénomène de souche et de la barrière d'espèces (Horiuchi et al. 2000). En effet, il a été observé que si la PrPsen d'une espèce est incubée avec de la PrPsc provenant de la même espèce, il y a conversion en une forme résistante à la PK. Au contraire, si la PrPsc est incubée avec la PrPsen d'une espèce différente, et résistante au prion correspondant, sa conversion est fortement réduite.

Dans ce système la protéine transconformée obtenue *in vitro* n'est pas infectieuse (Hill, Antoniou, and Collinge 1999).

- Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)

La mise au point d'une nouvelle méthode, la PMCA (Saborio, Permanne, and Soto 2001; Castilla et al. 2005; Castilla et al. 2006) a ouvert la voie à la production *in vitro* de protéines prions infectieuses. Ce modèle consiste à soumettre un mélange contenant de très faibles quantités de PrPsc (amorce ou seed) et un large excès (supérieur à 1 000 fois) de PrPc (substrat), à des cycles composés de phase d'incubation et de sonication (ultrasons). La phase d'incubation (30 min) permet la conversion et l'agrégation de la PrPc en PrPsc, et la phase de sonication (30s) fragmente les agrégats de PrPsc obtenus, ce qui permet d'obtenir de nouvelles unités de conversions pour la phase d'incubation suivante. On obtient ainsi une amplification exponentielle de la PrPsc, proche dans son principe de l'amplification de l'ADN par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») (**Figure 12**) (Saborio, Permanne, and Soto 2001; Saa, Castilla, and Soto 2006).

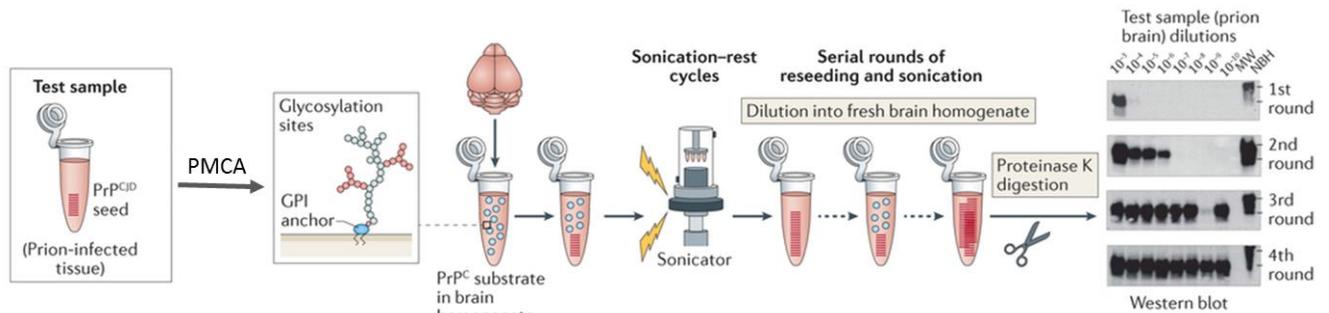


Figure 12 : Principe de la PMCA.
D'après (Zanusso et al. 2016).

Ce système permet donc de multiplier de très faibles quantités de PrPsc et ainsi d'augmenter considérablement la sensibilité de détection. La quantité de PrPsc néo synthétisée est directement proportionnelle au nombre de cycles utilisés par PMCA, elle constitue plus de 95 % de la PrPsc après seulement 5 cycles d'amplification (Saborio, Permane, and Soto 2001), ce qui fait de cet outil un très bon modèle pour l'étude de la conversion de la PrPc en PrPsc.

De façon très intéressante le groupe de Soto a montré que la PrPsc obtenue par PMCA était infectieuse après inoculation intracérébrale (souche 263K inoculée au hamster sauvage) (Castilla et al. 2005). L'équipe de Kretzschmar a confirmé ces résultats en utilisant une autre souche (tremblante expérimentale de la souris) (Weber et al. 2006). Ces deux études montrent également que certaines propriétés de souche sont conservées dans les produits de PMCA, avec des signes cliniques et un pattern de vacuolisation indistinguables de ceux obtenus directement avec les souches d'origine. Enfin la pathogénicité de la PrPsc générée par PMCA est stable après plusieurs passages chez l'animal.

- Autocatalytic conversion assay

Cette méthode repose sur le repliement sélectif de la PrP recombinante dénaturée par l'urée ou l'hydrochloride de guanidine, en absence de PrPsc. En effet il a été observé que la PrP recombinante dénaturée était susceptible de se replier en deux conformations différentes, riches en feuillets β : soit des oligomères β , soit des fibrilles d'amyloïde (Baskakov et al. 2002; Baskakov 2004; Bocharova et al. 2005). Ces deux conformations sont obtenues indépendamment sous agitation continue et montrent une résistance à la digestion par la PK. Le repliement de la rPrPc peut être mesuré en temps réel par un système de fluorescence à la

thioflavine T (ThT). Cette technique permet d'étudier le rôle de différents co-facteurs pouvant interagir dans le repliement pathologique de la PrP.

- Amyloid seeding assay

L'amyloid seeding assay (ASA) a été mis au point par Colby *et al* (Colby et al. 2007). Ce modèle combine une PrPsc purifiée par précipitation à l'acide phosphotungstique avec une PrPc recombinante dénaturée dans de la guanidine hydrochloride, des microbilles qui optimisent l'agitation à 37°C en microplaque et une lecture du signal par fluorescence à la ThT. L'ASA a pu être appliquée à la détection de la PrPsc chez différents modèles expérimentaux de tremblante adaptés aux rongeurs, mais a également permis de faire la différence entre des échantillons de cerveaux de patients atteints de MCJ sporadique et des cerveaux normaux. Un des problèmes principaux de cette technique est la formation spontanée de fibrilles d'amyloïdes à partir de la rPrPc au cours des longues cinétiques, et de ce fait l'apparition de faux positifs.

- Quaking-Induced Conversion (QuIC), Real Time QuIC (RT-QuIC) et enhanced QuIC (eQuIC)

La QuIC est une méthode dérivée de la PMCA, décrite en 2008 par Atarashi *et al* (Atarashi et al. 2008). Le substrat utilisé est une PrP recombinante et la phase de sonication est remplacée par une agitation à grande vitesse. Les premières études ont montré que cette technique permettait de détecter une quantité aussi faible que 100ag de PrPsc dans l'échantillon testé, et qu'elle permettait aussi de différencier les LCR ainsi que les sécrétions nasales de hamsters sains ou infectés par la tremblante (Atarashi et al. 2008; Bessen et al. 2010). La détection et l'amplification de PrPsc présente dans des échantillons de cerveaux de chèvre infectés par la tremblante ou dans des cerveaux de patients atteints de vMCJ a également été possible avec cette technique (Orru et al. 2009). Toutefois le caractère infectieux de la PrPsc générée par la QuIC reste à démontrer *in vivo*.

L'amélioration de la QuIC en RT-QuIC a consisté en l'ajout de ThT au milieu réactionnel, ce qui a permis d'avoir une lecture en temps réel de la conversion de la PrPc en PrPsc par un suivi de la fluorescence (**Figure 13**) (Wilham et al. 2010). De nombreuses études se sont focalisées sur la détection de PrPsc dans le LCR de patients atteints de MCJ sporadiques et de patients contrôles. Les résultats montrent une grande spécificité (99-100%)

et une grande sensibilité (de 77 à 97%) de cette méthode pour la détection de PrPSc dans les LCR humains (Atarashi et al. 2011; McGuire et al. 2012; Sano et al. 2013; Orru et al. 2015; Cramm et al. 2015; Cramm et al. 2016). Une étude portant sur la détection de PrPsc dans des échantillons de muqueuse olfactive après brossage nasal montre des résultats similaires (Orru et al. 2014).

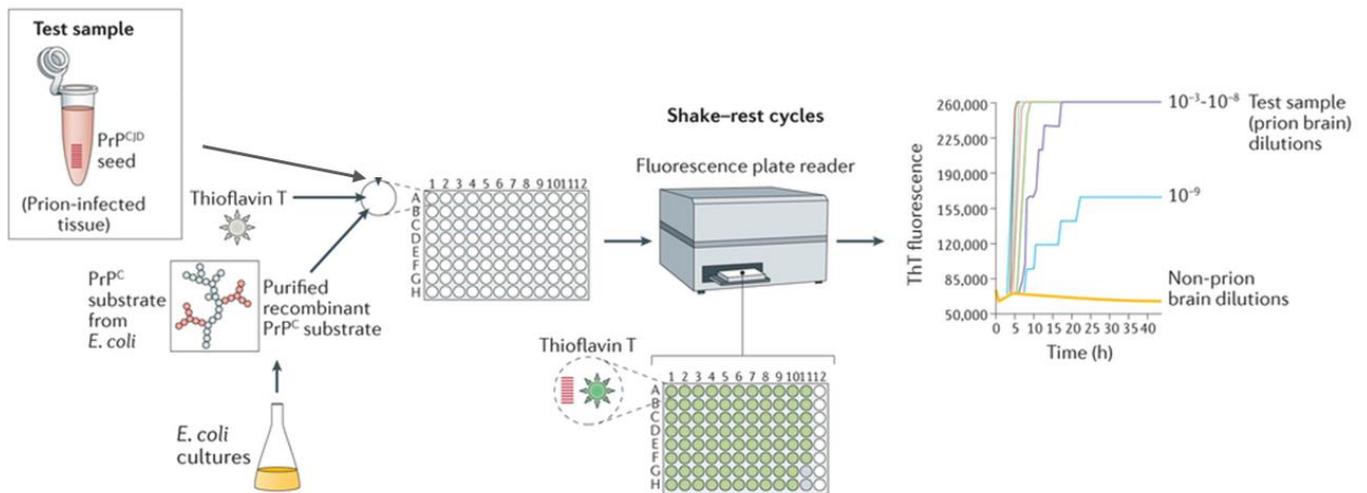


Figure 13 : Principe de la RT-QuIC.

D'après (Zanusso et al. 2016).

Cette technique présente donc de nombreux avantages : rapidité, sensibilité, simplicité et bonne reproductibilité entre laboratoires (McGuire et al. 2016), et elle pourrait devenir un outil de diagnostic ante mortem des maladies à prions humaines.

Le but de ces méthodes serait de pouvoir détecter les prions dans le plasma sanguin, il n'existe actuellement aucun test validé pour cette détection qui reste un enjeu de santé publique important. La RT-QuIC n'est pas efficace car inhibée par les composants du plasma. Une amélioration a été apportée à cette technique en ajoutant une étape préalable d'immunoprécipitation puis une étape de renouvellement du substrat afin d'augmenter la sensibilité et la vitesse de détection, cette technique est appelée « enhanced QuIC » (eQuIC) (Orru et al. 2011). La capture préalable de la PrPSc à l'aide de billes couplées à un anticorps permet une détection qui est 10^4 fois plus sensible qu'avec la technique de Edgeworth et al. qui utilisait une technique de capture de la PrPsc sur matrice solide (Edgeworth et al. 2011). L'eQuIC pourrait permettre la détection de faibles concentrations de prions présentes dans certains tissus, fluides ou même dans l'environnement.

b. Modèles cellulaires

La majorité des systèmes cellulaires permissifs à la réplication des prions sont des lignées cellulaires, mais des cultures de cellules souches neurales ou des cultures primaires de neurones ont aussi été développés. Alors que la plupart de ces modèles sont permissifs aux souches expérimentales adaptées aux rongeurs, la propagation d'isolats naturels reste difficilement réalisable.

i. Modèles cellulaires de propagation d'ESST adaptées aux rongeurs

Les cellules de neuroblastomes font partie des modèles cellulaires les mieux caractérisés pour l'étude de la propagation des souches expérimentales adaptées aux souris. Parmi ces lignées on trouve la lignée cellulaire N2a (Race, Fadness, and Chesebro 1987; Butler et al. 1988), qui est la plus utilisée aujourd'hui. Mais il a été montré que ces cultures avaient de faibles rendements d'infection, avec seulement 1% des cellules réellement infectées (Race, Fadness, and Chesebro 1987). Cette faible permissivité serait due à une sensibilité hétérogène des cellules aux prions au sein d'une même culture (Bosque and Prusiner 2000). Plus récemment des lignées de N2a permettant une conversion efficace de la PrPc en PrPsc ont pu être établies soit par sous-clonage post-infection, soit par surexpression de la PrPc (Bosque and Prusiner 2000; Nishida et al. 2000).

L'approche la plus commune pour propager les prions *in vitro* consiste à cultiver les cellules en présence de fractions infectieuses, telles que des homogénats de cerveaux infectés. Des lignées isolées à partir de cerveaux infectés ont aussi été développées, comme la lignée SMB dérivant de cerveaux de souris infectées par la souche Chandler (Clarke and Haig 1970) et la lignée de hamster HaB permissive aux prions de hamster (Taraboulos, Serban, and Prusiner 1990). L'efficacité de l'infection est évaluée en analysant la présence de PrPsc au cours de passages successifs et l'inoculation à l'animal permet de démontrer le caractère infectieux de la PrPsc accumulée dans les cellules.

Les cellules neuroendocrines GT1 et les cellules de phéochromocytome de rat PC12 différenciées en cellules neuronales ont également largement été étudiées afin de propager les souches de prions adaptées aux rongeurs. Quelques effets cytopathogènes après infection ont pu être observés : la lignée PC12 montrait une diminution de l'activité des enzymes de synthèse de l'acétylcholine (Rubenstein et al. 1991) et les cellules GT1, une réduction de la

viabilité et du taux de prolifération ainsi que des signes de vacuolisation autophagique et d'apoptose mis en évidence par microscopie électronique (Schatzl et al. 1997).

Certaines lignées cellulaires non-neurales sont aussi capables de propager les prions efficacement (Vilette et al. 2001). Une lignée microgliale (MG20), issue de souris transgéniques surexprimant la PrP, ainsi que des lignées de fibroblastes sont susceptibles à différentes souches murines (Iwamaru et al. 2007). Une lignée myoblastique squelettique (C2C12) est aussi permissive à l'infection par des souches murines (Dlakic, Grigg, and Bessen 2007). Les taux de PrP^{sc} observés dans cette lignée après infection approchent ceux observés *in vivo* (Herbst et al. 2013). Cette lignée pourrait être utilisée pour étudier l'infection par les prions des muscles de mouton et de cervidés.

La lignée neuronale 1C11 est également capable de répliquer différentes souches de prions (Mouillet-Richard et al. 2008). L'expression de la PrP^c endogène de ces cellules est suffisante pour permettre l'infection chronique. Cette lignée est très utile pour étudier l'ensemble des fonctions associées aux neurotransmetteurs et aux voies de signalisations associées à la PrP^c car les cellules ont la capacité de s'engager dans des programmes de différenciation sérotoninergiques et noradrénergiques sans changement phénotypique majeur après infection (Vidal et al. 2009; Pradines et al. 2013).

Les cellules souches neurales (CSN) sont des cellules multipotentes du système nerveux, isolées à partir de souris sauvages ou transgéniques, capables de se différencier en neurones ou en astrocytes. Deux études reportent que ces CSN ont pu être infectées par des souches de tremblante adaptées à la souris (RML et 22L) (Giri et al. 2006; Milhavet et al. 2006; Herva et al. 2010), et seule l'équipe de Carlson a pu réaliser l'infection de ces cellules cultivées sous forme de neurosphères. Leurs propriétés et leur culture relativement aisée en font toutefois un outil prometteur pour l'étude de l'ESB et des ESST humaines, et particulièrement les CSN issues de souris transgéniques exprimant la PrP^c bovine ou humaine, voire de cellules issues de cerveaux humains.

ii. Modèles cellulaires de propagation d'ESST naturelles

La première propagation *in vitro* d'une souche naturelle d'ESST (c'est-à-dire non adaptée aux rongeurs) a été réalisée par Vilette et al., avec une souche de tremblante du mouton (Vilette et al. 2001). La lignée cellulaire utilisée a été obtenue après transfection

stable du gène *Prnp* ovin dans une lignée épithéliale de lapin n'exprimant pas de PrPc endogène et résistante aux infections. La lignée dérivée, appelée Rov, peut être infectée et réplique à des titres élevés certains isolats de la tremblante du mouton. Ces travaux suggèrent que l'expression de PrP de différentes origines dans des cellules dépourvues de PrP endogène pourrait permettre de développer des modèles de propagation de prions bovins ou humains (Courageot et al. 2008).

Un modèle cellulaire similaire a été développé en immortalisant des cellules neurogliales de souris transgéniques surexprimant la PrP ovine (tg338). Cette lignée appelée Mov est permissive à l'infection par certaines souches de prions ovins (Archer et al. 2003). Cette lignée transgénique murine (tg338) est aussi à l'origine d'un autre modèle de propagation des prions ovins, cette fois à partir de cultures primaires de neurones en grains du cervelet (Cronier, Laude, and Peyrin 2004).

En suivant le principe de ce système de cultures primaires de neurones issus de souris transgéniques, des isolats humains ont pu être propagés *in vitro*. En effet, une souche de MCJ sporadique, préalablement passée chez la souris, a pu être propagée dans des cultures primaires de neurones provenant de souris transgéniques surexprimant la PrPc humaine (tg650) (Cronier et al. 2007).

L'immortalisation de cellules provenant du cerveau de cervidés a également permis de mettre au point un modèle pour la maladie du dépérissement chronique (Raymond et al. 2006).

Une lignée inductible en cellules de type neuronal a été obtenue par immortalisation de cellules issues de cerveaux de fœtus bovins (Takenouchi et al. 2009). Ces cellules expriment la PrPc de manière endogène et pourraient donc représenter un modèle d'étude *in vitro* de la propagation des prions bovins.

2. Modèles *in vivo* invertébrés

a. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans est un nématode non parasitaire d'environ un millimètre de long. Il s'est imposé comme un modèle d'étude très attractif de par son cycle de vie relativement court (environ 3,5 jours) et par le fait que cet animal transparent permette un suivi *in vivo* en temps réel des cellules ou des protéines marquées en fluorescence (Brenner

1974; Chalfie et al. 1994). Le ver adulte est composé de 959 cellules dont le lignage est bien défini (Sulston et al. 1983) et la morphologie et les connexions synaptiques de ses 302 neurones ont été cartographiées (White et al. 1986). *C. elegans* est le premier organisme multicellulaire dont le génome a été séquencé (TSCS 1998) et il apparaît qu'environ 80% de son génome est conservé chez les mammifères (Lai et al. 2000). De plus la biologie cellulaire ainsi que les voies de signalisation neuronales sont globalement conservées entre *C. elegans* et l'humain, ce qui en fait un très bon modèle d'étude du vieillissement neuronal et des maladies conformationnelles des protéines.

Le premier modèle transgénique de maladie conformationnelle des protéines a été créé en 1995 par l'expression transgénique de peptide A β dans les muscles du ver (Link 1995). Depuis de nombreux autres modèles ont été mis au point, les transgènes utilisés étant sous contrôle de promoteurs permettant une expression tissu-spécifique, dans l'ensemble des neurones par exemple ou seulement dans une sous population particulière de neurones. Ainsi Kuwahara et al., ont pu mettre au point un modèle de maladie de Parkinson en exprimant une α -synucléine mutée dans les neurones dopaminergiques de *C. elegans* (Kuwahara et al. 2006) alors que l'équipe de Brian Kraemer a établi un modèle de tauopathie en exprimant cette fois une protéine tau mutée de façon pan-neuronale (Kraemer et al. 2003).

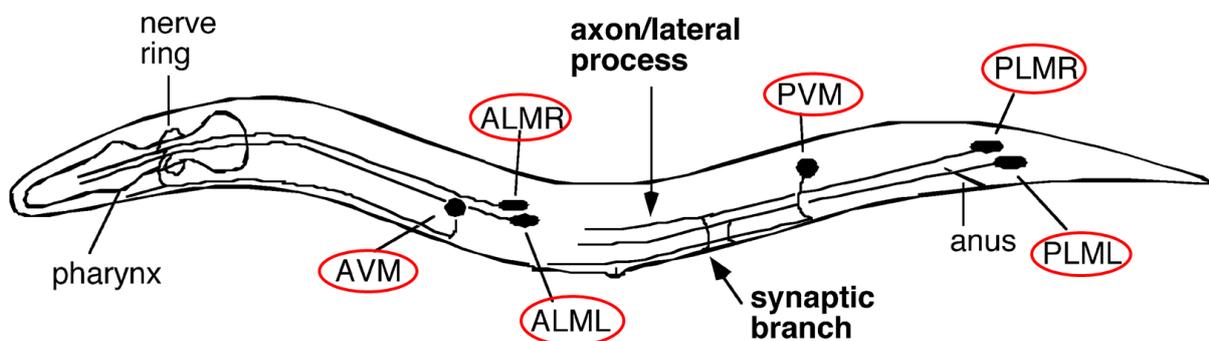


Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation des neurones mécanosensitifs (cerclés de rouge) chez *C. elegans*.

Le système mécano-sensitif du ver est très intéressant car l'observation de dysfonction dans ce système est facilement réalisable : il est composé de six neurones sensibles aux pressions du milieu extérieur et qui sont impliqués dans la locomotion, la prise de nourriture, la défécation et l'accouplement (**Figure 14**) (Chalfie and Sulston 1981) (Figure). L'expression d'une protéine prion humaine saine ou mutée dans ces neurones mécano-sensibles a permis

d'observer les différences phénotypiques engendrées par l'accumulation de la protéine mutée (Bizat et al. 2010). Le ver ne possédant pas de PrP endogène, les effets observés sont directement imputables à l'expression du transgène. Il est intéressant de noter que la protéine prion mutée (insertion dans le domaine des octapeptides) exprimée dans ce modèle est retrouvée sous forme d'agrégats dans les corps neuronaux et le long des axones, qu'elle est partiellement résistante à la PK et qu'elle entraîne une dysfonction neuronale. Le modèle *C. elegans* serait donc un modèle de choix pour étudier les ESST humaines dues à des mutations et permettrait d'évaluer rapidement des thérapeutiques dans un modèle *in vivo*.

b. Drosophile

La drosophile est un insecte de 2 à 4 mm de longueur, plus généralement appelé mouche du vinaigre ou mouche des fruits. Elle a un cycle de vie court, n'excédant pas 30 jours à une température de 29°C, et son cycle de reproduction dure environ 10 jours. Sa facilité d'élevage et sa durée de vie courte en font un modèle génétique avantageux et rapide. C'est le plus souvent l'espèce *Drosophila melanogaster* qui est utilisée au laboratoire, son génome a d'ailleurs été entièrement séquencé en 2000 (Adams et al. 2000). Il comporte environ 15 000 gènes, répartis sur 4 paires de chromosomes.

Le premier modèle publié de maladie neurodégénérative chez la drosophile implique l'expression ubiquitaire de la protéine prion sauvage d'hamster syrien (Raeber et al. 1995). Aucun phénotype n'a pu être mis en évidence dans ce modèle, ni de PrP résistante à la PK. L'absence de phénotype peut s'expliquer par le promoteur d'expression de la PrPc qui était la protéine de choc thermique Hsp70. Ainsi les drosophiles étaient soumises à des chocs thermiques pour stimuler l'expression de la PrPc, mais elles exprimaient alors également la Hsp70, qui a par la suite été décrite comme protéine chaperonne, capable de prévenir le mauvais repliement et l'agrégation des protéines (pour revue (Laskowska, Matuszewska, and Kuczyńska-Wiśnik 2010)).

Le premier modèle de drosophile de maladie à prions montrant des signes caractéristiques de neurodégénérescence (atteinte locomotrice, survie diminuée, vacuolisation et corps d'inclusions de PrP dans le système nerveux) a été réalisé en 2006 (Gavin et al. 2006). Une PrP murine portant la mutation P101L, (correspondant à la mutation P102L humaine, responsable d'un GSS) est exprimée dans ce modèle mais ne permet pas la détection de PrP résistante à la PK.

Une série d'études a ensuite été menée en utilisant un modèle de drosophiles transgéniques exprimant la PrP ovine (variants ARQ ou VRQ). L'expression de ces PrP suffit à induire un phénotype (atteinte locomotrice et survie diminuée) (Thackray, Muhammad, Zhang, Di, et al. 2012). Ce modèle semble pouvoir subir une infection, effectivement, lorsque les larves de mouches exprimant la PrP ovine ARQ sont exposées oralement à des homogénats de cerveaux de tremblante, la progression de la maladie est accélérée et l'on retrouve une accumulation de PrPsc dans le cerveau (**Figure 15**) (Thackray, Muhammad, Zhang, Denyer, et al. 2012). La toxicité induite chez ces mouches semble être transmissible à une nouvelle génération de drosophiles transgéniques, par exposition de cette nouvelle génération à des homogénats de têtes de drosophiles infectées (Thackray et al. 2014). Les drosophiles transgéniques semblent être relativement sensibles à l'infection car une réponse neurotoxique a été observée après exposition à des dilutions d'homogénats de cerveaux de tremblante allant de 10^{-2} à 10^{-10} (Thackray, Andreoletti, and Bujdoso 2016). De façon très intéressante les mouches exposées à des plasmas ovins de tremblante en phase préclinique montrent une réponse neurotoxique, qui est transmissible par exposition d'homogénats de leurs cerveaux à d'autres drosophiles transgéniques (Thackray, Andreoletti, and Bujdoso 2016).

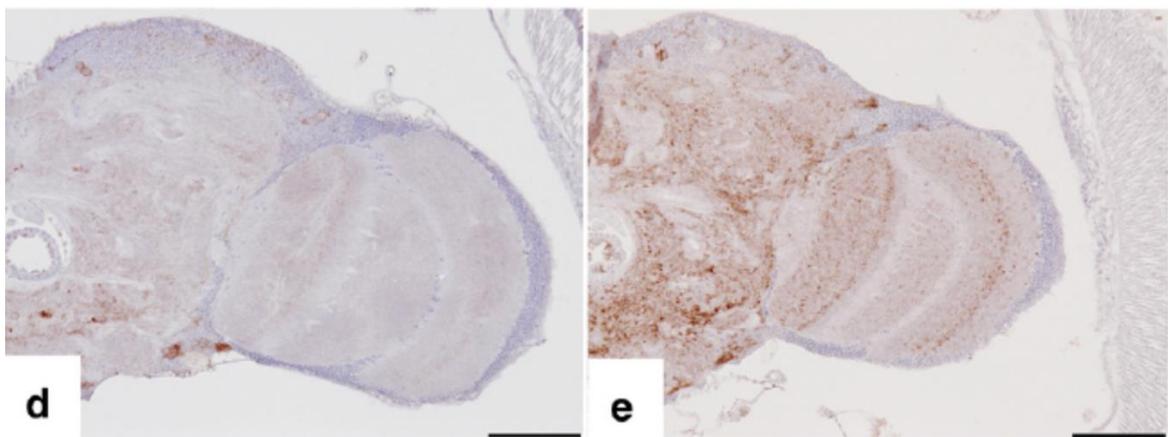


Figure 15 : Accumulation de PrPsc dans le cerveau de drosophiles

Cerveaux de drosophiles transgéniques exprimant la PrPc ovine ayant été (e) ou non (d) exposés à des homogénats de tremblante. Détection à l'aide de l'anticorps 2G11, échelle=50 μ M (Thackray, Muhammad, Zhang, Denyer, et al. 2012).

3. Modèles *in vivo* murins

L'étude de la propagation des prions *in vivo* est très généralement réalisée à l'aide d'hamsters ou de souris. Ceci s'explique par leur facilité d'entretien mais aussi car ces

animaux présentent des temps d'incubation relativement courts et permettent de caractériser et différencier les souches de prions. Bien que les hamsters peuvent avoir des périodes d'incubation plus courtes (Kimberlin and Walker 1977), les souris sont souvent préférées, notamment grâce à l'existence de nombreux outils permettant de manipuler leur génome. Les modèles murins disponibles pour l'étude des maladies à prions sont certainement supérieurs à ceux existants pour les autres maladies neurodégénératives. En effet, les animaux infectés développent une authentique pathologie, regroupant toutes les caractéristiques neuropathologiques et biochimiques des maladies humaines ou animales.

Le pouvoir infectieux des prions est un avantage dans les modèles *in vivo*, les animaux sont facilement inoculables. Le test typique est l'inoculation intracérébrale de souris sauvages (WT) à l'aide d'un échantillon infectieux adapté à la souris (Chandler 1961). Les animaux vont, après une période d'incubation dépendante de la souche et de la dose, progressivement développer des signes cliniques caractéristiques d'une maladie neurodégénérative et vont finir par succomber à la maladie. Cet essai est particulièrement robuste, si le titre infectieux de l'échantillon utilisé est suffisamment élevé, il apparaît que 100% des souris inoculées vont déclarer une pathologie. De plus l'observation des cerveaux de ces animaux inoculés permet l'observation des caractéristiques neuropathologiques des ESST (spongiose, dépôts de PrP^{Sc} et gliose astrocytaire). D'autres voies d'inoculation sont possibles, notamment au niveau périphérique, même si dans ces cas les périodes d'incubation observées sont généralement plus longues.

Ces essais réalisés sur souris WT permettent de quantifier le niveau d'infectiosité, ou titre infectieux, des échantillons utilisés. Des séries de dilutions d'un même échantillon sont inoculées à différents groupes de souris et le titre infectieux est déterminé par la méthode de Spearman-Kärber.

Ces essais, bien que très utiles et fiables, présentent toutefois quelques défauts. Premièrement, les temps d'incubation restent relativement longs et ces expériences consomment alors beaucoup de temps. Pour y remédier, certains utilisent des souris transgéniques surexprimant la protéine prion, ce qui accélère le processus de la maladie. Le temps d'incubation chez ces animaux peut être réduit de 50 à 60 jours (Carlson et al. 1994). Une autre lignée transgénique permet de réduire le temps nécessaire au diagnostic, sans utiliser la surexpression de la PrP^{Sc} mais l'imagerie bioluminescente. Les souris expriment la luciférase de *Photinus pyralis* (luciole) sous le contrôle du promoteur de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). Au cours du développement de la maladie, elles montrent une

augmentation d'un signal bioluminescent au niveau du cerveau. Ce signal peut être détecté 60 jours après l'inoculation, soit moitié moins de temps que nécessaire pour l'apparition des signes cliniques (Tamguney et al. 2009).

Un autre défaut non négligeable est que ce test n'est valable que pour des souches préalablement adaptées à la souris à cause de l'effet de la barrière d'espèce (Pattison 1965; Tateishi et al. 1996). Le simple fait d'utiliser des souris transgéniques exprimant le gène de la PrPc correspondant à la souche à étudier permet la transmission de la maladie. Ainsi les lignées transgéniques exprimant le gène humain sont sensibles à des souches de MCJ (Telling et al. 1994; Telling et al. 1995). De la même façon les lignées transgéniques exprimant la PrPc ovine sont sensibles aux souches de tremblante et les lignées exprimant le gène bovin sont sensibles aux souches d'ESB (Vilote et al. 2001; Scott et al. 1997; Buschmann et al. 2000). Pour que la transmission de la maladie soit possible dans ces lignées transgéniques, le gène murin *Prnp* doit être retiré car il apparaît que la présence de la PrPc murine interfère dans le processus de conversion (Telling et al. 1995).

Ces modèles transgéniques sont d'un intérêt particulier pour étudier les souches humaines et tout particulièrement pour l'investigation de nouvelles thérapeutiques efficaces vis-à-vis de ces souches. En effet il a été observé que l'efficacité des traitements anti prion est particulièrement souche spécifique (Miller-Vedam and Ghaemmaghami 2013). Ainsi, des composés permettant l'allongement du temps de survie de souris transgéniques inoculées par une souche de tremblante adaptée à la souris se retrouvent sans effet sur des souris transgéniques infectées par des souches humaines de MCJ (Berry et al. 2013). Ces lignées transgéniques exprimant la PrPc humaine sont donc impérativement nécessaires à l'évaluation de thérapies efficaces sur les souches humaines.

La majorité des maladies à prions sont d'origines sporadique ou génétique. Dans ces cas, la maladie se développe spontanément en l'absence de source exogène de PrPsc. Afin de mimer cette physiopathologie, des lignées murines transgéniques ont été créées, exprimant une PrP humaine portant une mutation liée à une maladie à prion génétique. Les résultats sont assez décevants puisqu'aucun changement neuropathologique n'a pu être observé dans de nombreuses lignées, et ce malgré une surexpression de la PrP mutée (Telling, Haga, et al. 1996; Asante et al. 2009; Asante et al. 2013).

La mutation la plus étudiée chez les souris transgéniques est la mutation P102L, responsable d'un GSS. La lignée murine surexprimant la PrP murine portant la mutation correspondante (P101L) développe une maladie spontanée, avec des dépôts de PrP au niveau

du cerveau (Telling, Haga, et al. 1996; Hsiao et al. 1990; Nazor et al. 2005). Les lignées transgéniques exprimant la même protéine, mais à un niveau physiologique, ne développent pas de maladie, ce qui suggère que la surexpression est requise pour que la pathologie puisse apparaître durant le temps de vie normal d'une souris (Nazor et al. 2005). De plus il est intéressant de noter que la lignée surexprimant la PrP humaine portant la mutation P102L ne développe pas de maladie spontanée alors que la lignée surexprimant la PrP bovine portant la mutation correspondante montre une pathologie (Asante et al. 2009; Torres et al. 2013). Ceci suggère que les autres résidus de la protéine prion sont importants dans le déclenchement d'un phénotype pathologique chez la souris.

L'équipe de Susan Lindquist a aussi développé deux modèles murins de maladie à prions génétique. Ces lignées ont été créées grâce à la technique du « knock-in » et expriment soit une mutation responsable de l'Insomnie Fatale Familiale (D177N), soit une mutation responsable d'une MCJ génétique (E200K) (Jackson et al. 2009; Jackson et al. 2013). Les animaux porteurs des mutations développent tardivement mais spontanément une maladie à prions et, de façon particulièrement intéressante, les phénotypes et les lésions neuropathologiques observés ressemblent à ceux observés chez l'Homme. De plus ces maladies sont expérimentalement transmissibles à des souris sauvages. Ces lignées sont donc capables de développer une maladie spontanée sans surexpression de PrP, et les caractéristiques des maladies humaines, spécifiques de chaque mutation, sont retrouvées chez ces animaux. Ces modèles sont donc d'un intérêt particulier pour étudier ces maladies génétiques ainsi que des potentiels traitements spécifiques à ces mutations.

IV/ La protéine tau et les tauopathies

1. La protéine tau

La protéine tau (de l'anglais tubule-associated unit) a été découverte en 1975 comme une protéine associée aux microtubules (Microtubule-Associated Tau-Protein ou MAPT), qui stimule la polymérisation de la tubuline (Weingarten et al. 1975). Les microtubules sont un composant essentiel du cytosquelette, ils sont impliqués dans le support structural (morphologie neuronale, formation axonale, ...) et jouent aussi un rôle majeur dans le transport cellulaire.

a. Expression et fonction

Le gène *MAPT* codant pour la protéine tau est situé sur le chromosome 17 (17q21) et contient 16 exons (**Figure 16**). Les exons 4A, 6 et 8 ne sont retrouvés que dans la protéine tau périphérique, alors que les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont des exons constitutifs. L'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 est à la fois spécifique des tissus dans lesquels la protéine tau est exprimée mais aussi dépendant du stade développemental.

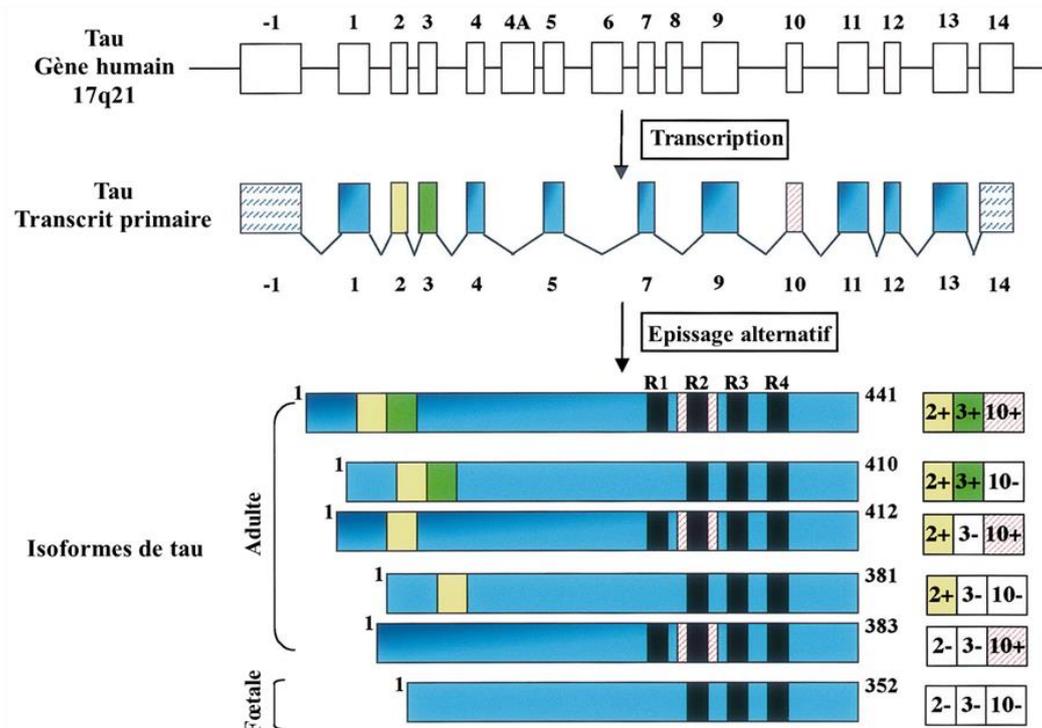


Figure 16 : Représentation schématique du gène humain de tau, du transcrit humain primaire et des 6 isoformes de tau dans le SNC.

D'après Buée L et al. (Buée et al. 2000)

Dans le cerveau adulte humain on retrouve ainsi six isoformes de la protéine tau, de 352 à 441 acides aminés selon l'épissage alternatif. La protéine est divisée en quatre régions : une région N-terminale appelée domaine de projection, suivie d'une région riche en proline, puis la répétition de trois ou quatre motifs de liaison aux microtubules (R1 à R4), et enfin la région C-terminale. Chaque isoforme est alors caractérisée par la longueur du domaine N-terminal ainsi que par la présence de 3 ou 4 motifs de répétition.

La fonction principale de la protéine tau est d'établir et de maintenir un réseau organisé de microtubules. Elle se lie aux microtubules par sa région C-terminale qui stimule leur assemblage et son domaine de répétition (R3 ou R4) maintient la stabilité des microtubules déjà formés, pendant que ses parties N-terminale et riches en proline interviennent dans l'organisation parallèle et l'espacement entre les microtubules (**Figure 17**). Enfin la protéine tau est aussi impliquée dans le maintien de la structure du neurone par son interaction avec la membrane plasmique (Schraen-Maschke et al. 2008).

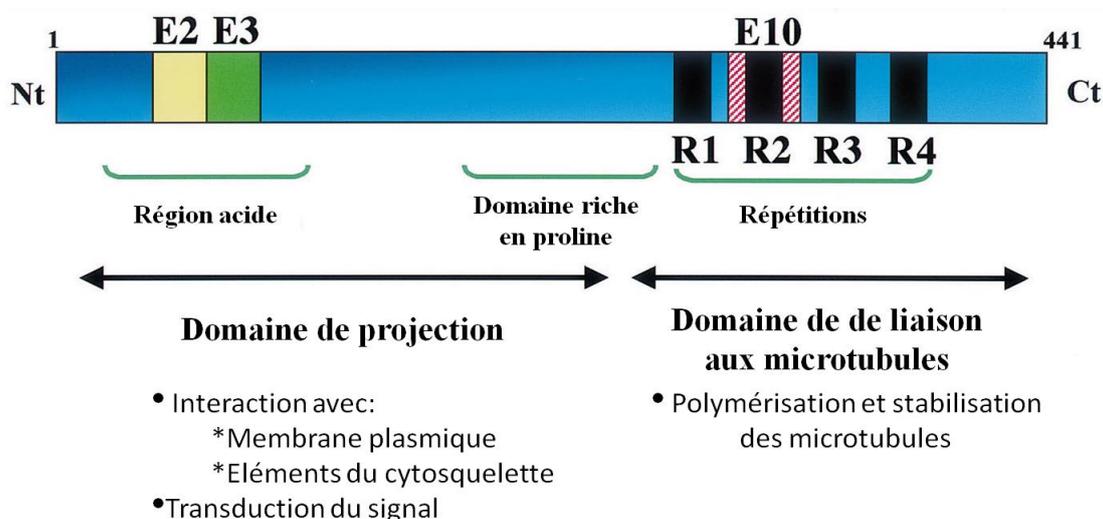


Figure 17 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la plus longue isoforme de tau. (D'après (Buée et al. 2000)).

La protéine tau interagit aussi avec des protéines motrices comme la dynésine-1 et le complexe dynactine/dynésine, suggérant un rôle dans la dynamique du transport axonal (Magnani et al. 2007). La région riche en proline est capable de se lier au domaine SH3 de certaines protéines kinases de la famille SRC, comme la protéine Fyn par exemple, mais aussi à la phospholipase C-gamma 1 ou à une sous unité de PI3K (Reynolds et al. 2008). Ces

interactions sont en faveur d'un rôle de la protéine tau dans la transduction de signal au niveau intracellulaire.

b. La protéine tau pathogène

Lors des tauopathies la protéine tau est retrouvée sous une forme hyperphosphorylée et agrégée, formant des paires de filaments hélicoïdaux (PHF). Ces structures sont le composant principal de différents types d'inclusions, appelées dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Figure 18).

Plus de 80 mutations pathologiques de la protéine tau ont été décrites et il est intéressant de noter que la grande majorité de ces mutations se trouvent dans le domaine de liaison aux microtubules (G272V, N279K, Δ K280, P301L, V337M, ...). L'impact observé sur la protéine tau est en général une diminution de son affinité pour les microtubules ainsi qu'une augmentation de ses propriétés d'agrégation (Hong et al. 1998).

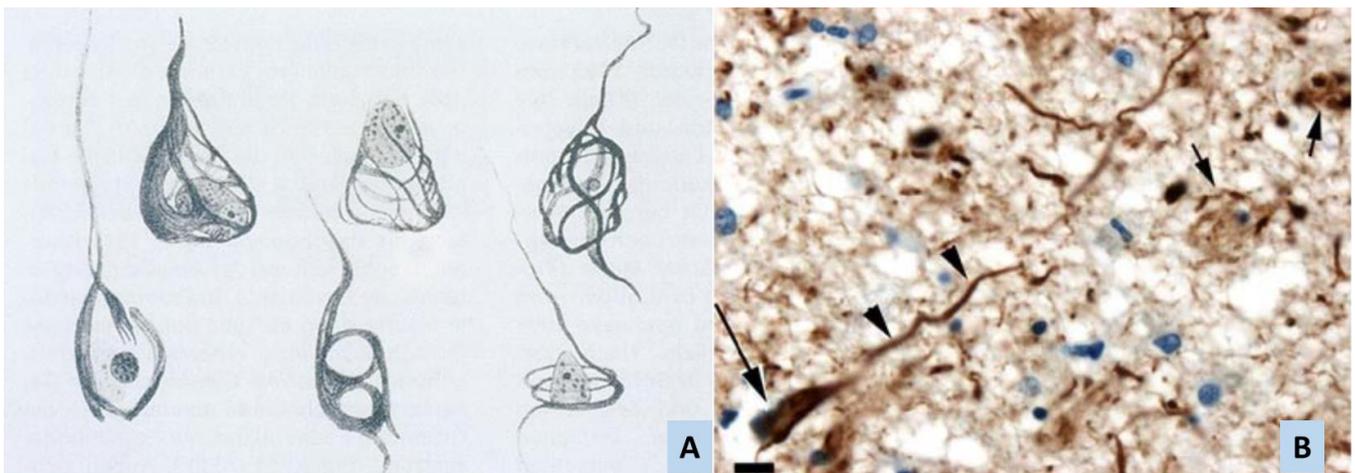


Figure 18 : Les dégénérescences neurofibrillaires

A : Premières représentations de DNF par Alois Alzheimer à partir d'observations de coupes histologiques de cerveau. **B** : DNF typique en forme de flamme (flèche entière) marquée par l'anticorps AT8 (d'après (Duyckaerts, Delatour, and Potier 2009)).

La protéine tau ayant une structure tertiaire non repliée, sa propension à s'agréger et former des fibres est assez contradictoire. Pourtant deux courts motifs d'hexapeptides au début de R2 et R3 montrent une tendance à former un feuillet β et sont essentiels pour l'agrégation de tau. Le motif VQIVYK au début de R3 s'est ainsi montré suffisant *in vitro* pour former des fibres composées d'assemblages de deux feuillets β étroitement entrecroisés. Les mutations entraînant la rupture de ce motif suppriment la tendance de la protéine tau à

s'agréger, en revanche, lorsque des mutations (comme Δ K280 ou P301L) renforcent la structure en feuillets β , l'agrégation de tau se trouve accélérée, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Khlistunova et al. 2006).

L'agrégation de tau peut aussi être accélérée en présence de cofacteurs qui compensent les charges répulsives positives de tau (exemple de l'héparine ou des acides nucléiques) (Kampers et al. 1996; Paudel and Li 1999).

La protéine tau possède 85 sites potentiels de phosphorylation pour sa plus longue isoforme (**Tableau 3**). Au moins 17 sites au motif thréonine-proline ou sérine-proline sont d'un intérêt particulier car ils sont retrouvés anormalement phosphorylés lors de tauopathies. Les kinases impliquées dans la phosphorylation de tau sont les PDPK ou Proline-Directed Protein Kinases, et les non-PDPK (non-Proline-Directed Protein Kinases). Les PDPK comprennent la kinase cycline-dépendante 5 (cdk5), la Mitogen Activated Protein kinase (MAP), la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) ainsi que la tau-tubuline kinase. Dans les non-PDPK on trouve par exemple la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante II (CaMKII), la protéine kinase AMP-cyclique dépendante (PKA) ou les Microtubule Affinity-Regulating Kinases (MARKs, aussi appelées PAR1 kinases). La protéine tau peut aussi être phosphorylée par les tyrosines kinases comme la famille des SRC kinases qui comprend notamment Fyn.

L'hyperphosphorylation observée dans les conditions pathologiques pourrait survenir d'un déséquilibre d'action entre les kinases et les phosphatases. En effet, la protéine phosphatase 2 (PPA2) est la principale phosphatase impliquée dans la déphosphorylation de tau et son activité a été trouvée fortement diminuée dans des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Gong et al. 1993). Les autres phosphatases impliquées dans la régulation de tau sont les phosphatases PP1, PP2B, PP2C et PP5.

Une phosphorylation anormale de la protéine tau sur certains sites conduit à une diminution de son affinité pour les microtubules, notamment lors d'une phosphorylation sur la sérine 262. Une hyperphosphorylation de tau peut aussi conduire à de nombreuses anomalies. La protéine anormalement phosphorylée pourrait subir un mauvais adressage et se retrouver dans les compartiments somatodendritiques plutôt que dans les axones, ce qui conduit à une dysfonction synaptique. La protéine tau anormalement phosphorylée (particulièrement sur la sérine 262 ou 356) ne sera plus reconnue par les protéasomes et ne sera donc plus dégradée correctement. Les changements de phosphorylation de tau semblent aussi capables d'inhiber ou d'engendrer de mauvaises interactions avec ses partenaires (Wang and Mandelkow 2016). Enfin, il est possible que la phosphorylation anormale de tau facilite son agrégation. Effectivement, bien qu'il semble que l'hyperphosphorylation de tau soit nécessaire pour son agrégation, celle-ci ne suffit pas en elle-même à obtenir des formes agrégées de tau. Ceci est observé dans certaines conditions *in vivo* lors de l'hibernation ou de l'hypothermie induite par anesthésie, on retrouve alors une hyperphosphorylation de tau comparable à celle trouvée dans la maladie d'Alzheimer, cependant aucune agrégation de tau n'est observée (Arendt et al. 2003; Planel et al. 2007).

D'autres modifications post-traductionnelles peuvent être impliquées dans la physiopathologie de tau. Ainsi selon le site d'acétylation de la protéine tau (sur les résidus lysines) celle-ci pourrait voir sa dégradation inhibée ou bien au contraire facilitée. Une O-GlcNAcylation de la protéine serait une protection contre une hyperphosphorylation et donc contre l'agrégation de tau. En revanche une N-glycosylation de tau pourrait jouer dans le maintien et la stabilisation des PHF (Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996).

Enfin d'autres modifications comme la glycation, la désamination ou l'isomérisation ont été retrouvées sur la protéine tau associée aux PHF mais pas sur la protéine tau normale. Ces modifications post-traductionnelles pourraient donc aussi jouer un rôle dans la physiopathologie des tauopathies (Martin, Latypova, and Terro 2011).

2. Tauopathies

Un certain nombre de pathologies sont regroupées sous le terme de tauopathies : ces maladies neurodégénératives ont en commun une agrégation et une hyperphosphorylation de la protéine tau, avec des inclusions de protéine tau insoluble ainsi qu'une perte neuronale. Au

niveau clinique les symptômes communs sont une démence souvent associée à des troubles moteurs (souvent une rigidité et ou une bradykinésie).

a. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA), est la cause de démence la plus fréquente. Elle associe une tauopathie (accumulation intraneuronale de protéine tau) à une amyloïdopathie (accumulation extracellulaire de peptide A β). Elle est généralement diagnostiquée à partir de 65 ans bien qu'il existe des formes précoces. Le premier signe est une amnésie antérograde, qui s'accroît au cours de la maladie et à laquelle vont s'associer des troubles cognitifs plus sévères (désorientation, troubles de l'humeur, des émotions et du langage) ainsi que des praxies. Au niveau du SNC on observe une atrophie corticale et hippocampique. Les six isoformes de la protéine tau sont retrouvées impliquées dans les DNF des cerveaux des patients.

De façon intéressante Heiko Braak a remarqué que la distribution des DNF dans le cerveau corrèle le mieux avec la durée et la sévérité de la démence (contrairement aux plaques amyloïdes). Ainsi les six stades de Braak (**Figure 19**), décrivent un profil évolutif des DNF au cours du temps (Braak and Braak 1991).

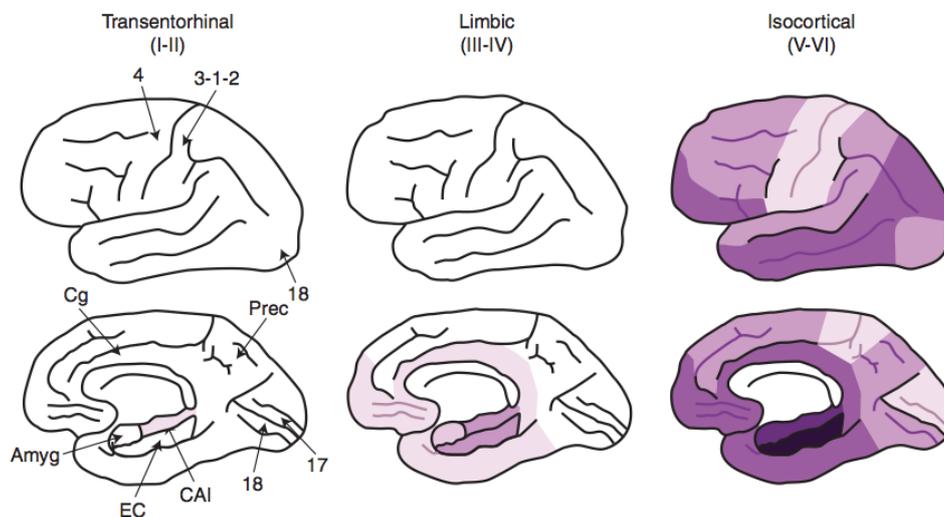


Figure 19 : Représentation schématique de la progression spatio-temporelle des DNF

La distribution de la DNF est représentée en violet, les intensités de couleurs correspondant à leurs densités. Amyg : Amygdale ; EC : Cortex entorhinal ; CA1 : aire CA1 de l'hippocampe ; Cg : Cortex cingulaire ; Prec : Précuneus ; 4 : Cortex primaire moteur ; 3-1-2 : Cortex primaire sensoriel ; 17 : Cortex primaire visuel ; 18 : Cortex associatif visuel. .

Les plaques amyloïdes extracellulaires, appelées aussi plaques séniles, sont constituées de peptides amyloïdes hydrophobes de 40 ou 42 acides aminés appelés A β -40 et A β -42. Il existe deux formes de plaques séniles : les plaques diffuses et les plaques à noyaux denses. Les plaques diffuses sont mal délimitées morphologiquement et ne sont pas reconnues par une coloration au rouge Congo ou à la thioflavine S, tous deux connus pour reconnaître les structures en feuillets β . Ces plaques peuvent être retrouvées chez des individus sains ne présentant pas de déficits cognitifs, alors que les plaques denses sont généralement associées à la MA. Les plaques à noyau dense sont constituées d'un cœur de peptides amyloïdes prenant une conformation en feuillets β très insoluble, entouré par une couronne neuritique tau immunoréactive (**Figure 20**).

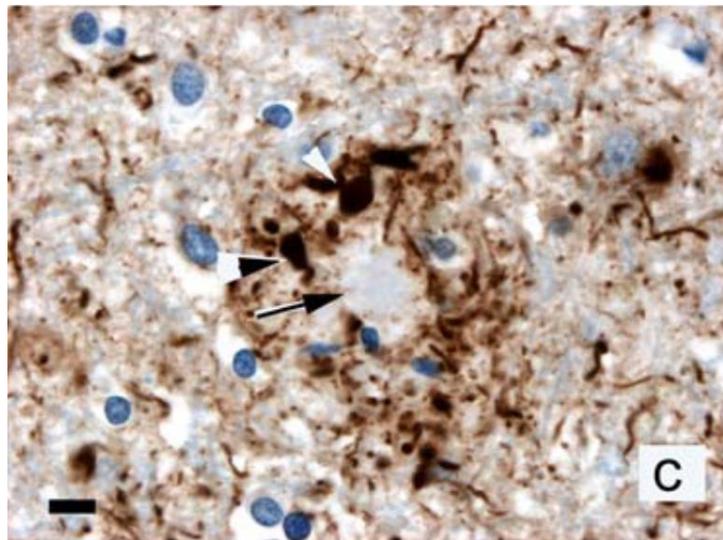


Figure 20 : Plaque sénile et sa couronne de neurites dystrophiques.

Cœur amyloïde d'une plaque sénile (flèche), entouré d'une couronne neuritique tau positive (têtes de flèches, anticorps AT8). (Duyckaerts, Delatour, and Potier 2009).

Autour de ces plaques, la réponse inflammatoire est présente avec un recrutement et une activation des cellules astrocytaires (Beach and Mc Geer 1989; Itagaki et al. 1989) et microgliales (Rogers, Lubner-Narod, and Styren 1988; Itagaki et al. 1989; Masliah et al. 1991; Duyckaerts, Delatour, and Potier 2009).

Contrairement aux stades de Braak décrits plus haut, associés aux dépôts de la protéine tau, plusieurs études ont montré que la durée et la sévérité de la démence ne sont pas corrélées avec la charge amyloïde cérébrale (Arriagada et al. 1992; Hyman, Marzloff, and Arriagada 1993; Gómez-Isla et al. 1997; Giannakopoulos et al. 2003; Ingelsson et al. 2004).

b. Paralyse Supranucléaire Progressive

La Paralyse Supranucléaire Progressive (PSP) est une des maladies neurodégénératives les plus communes, avec une prévalence de 5 personnes pour 100 000. L'âge moyen de survenue de la maladie est de 63 ans. Le premier signe clinique observé est une instabilité posturale, associée à une atteinte oculomotrice, qui évolue en troubles moteurs importants auxquels vont s'associer des troubles cognitifs. Les dégénérescences neurofibrillaires tau-positives sont retrouvées dans le pallidum, les noyaux sous-thalamiques et dans la substance noire. En plus de ces dépôts neuronaux sont retrouvés des dépôts insolubles de tau dans les cellules gliales, formant des touffes gliales. Tous ces dépôts sont majoritairement composés de tau 4R.

c. Dégénérescence Cortico-Basale

Une autre tauopathie, plus rare, partage de nombreux points communs avec la PSP. Il s'agit de la Dégénérescence Cortico-Basale (DCB). Son incidence est estimée à moins de 1 cas pour 100 000 par an, la maladie survient vers 60-70 ans et dure rarement plus de 10 ans. Les signes cliniques associent fréquemment une bradykinésie asymétrique (souvent des membres supérieurs, avec le symptôme de la main étrangère ou capricieuse) avec une rigidité et des myoclonies. Les dépôts dans le SNC sont semblables à ceux de la PSP (dépôts neuronaux et gliaux, prédominance de tau 4R) mais sont différenciés par la présence de neurones ballonnés achromatiques et des plaques astrocytaires tau-positives.

d. Maladie de Pick

La maladie de Pick (PiD) est une démence fronto-temporale décrite en 1892 par Pick et est cliniquement caractérisée par des troubles du comportement et une aphasie survenant dans la sixième ou septième décennie et pouvant progresser pendant plus de dix ans. Au niveau neuronal cette pathologie est caractérisée par la présence de nombreuses inclusions cytoplasmiques sphériques tau-positives, appelées corps de Pick. Ceux-ci sont observés dans les cortex frontal et temporal et particulièrement dans l'hippocampe. L'accumulation de la protéine tau est surtout retrouvée dans les neurones et peu dans les cellules gliales, et les inclusions sont ici composées majoritairement de protéine tau 3R.

e. Démence fronto-temporale liée au chromosome 17

La démence fronto-temporale liée à une mutation sur le chromosome 17 (DFTP-17) est une maladie neurodégénérative familiale et progressive. Les syndromes sont liés à des mutations de la protéine tau et les manifestations cliniques sont variées, bien que prédictibles selon le site de mutation sur le gène. Les signes les plus fréquents sont des troubles de la personnalité et du comportement, évoluant vers une aphasie non fluente qui se détériore en mutisme. On observe aussi des troubles moteurs incluant une bradykinésie symétrique, une rigidité et une instabilité posturale. Les dépôts de protéine tau peuvent être retrouvés dans les neurones uniquement ou à la fois dans les neurones et les cellules gliales et sont surtout localisés dans le télencéphale et le cervelet.

e. Autres tauopathies

Un certain nombre d'autres maladies sont aussi des tauopathies, comme la démence à grains argyrophiles qui représente 5% des démences. On retrouve, dans le SNC des patients, des grains et des inclusions fusiformes, colorés par imprégnation argentique (méthode de Gallyas), situés dans les prolongements nerveux, ainsi qu'une hyperphosphorylation de tau dans les neurones de la région hippocampique (Togo et al. 2002). La protéine tau retrouvée est sous la forme 4R.

La démence pugilistique est une démence se développant après des traumatismes crâniens (démence relativement fréquente chez les boxeurs et les joueurs de foot américains). Des dépôts amyloïdes de peptide A β ainsi que des dépôts neurofibrillaires de la protéine tau sont observés dans le SNC, avec le même profil que les isoformes retrouvées dans la MA (Schmidt et al. 2001). Cette démence est souvent associée à un parkinsonisme car le locus niger fait partie des zones fréquemment endommagées par les chocs répétés.

Parmi les tauopathies on retrouve aussi des maladies plus rares comme le parkinsonisme atypique de Guadeloupe, avec une pathologie tau à prédominance 4R (Caparros-Lefebvre and Lees 2005) ; la maladie de Niemann Pick de type C, caractérisée par une accumulation de cholestérol non estérifié et de glycolipides (Malnar et al. 2014) ; et la dystrophie myotonique de Steinert, où l'accumulation de tau serait due à un mauvais épissage de cette protéine (Caillet-Boudin et al. 2014).

f. Maladies à prions

Certaines maladies à prions sont associées à une tauopathie neurofibrillaire. C'est le cas notamment du syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), maladie due à plusieurs mutations du gène de la PrP (P102L, A117V, F198S, E211D, Y218N et Q217R) (Hsiao et al. 1992; Tranchant et al. 1997; Ishizawa et al. 2002; Alzualde et al. 2010; Peoc'h et al. 2012). Dans cette pathologie l'observation du SNC montre que les dépôts de PrP^{Sc} forment des plaques amyloïdes multicentriques et sont associés à de la protéine tau hyperphosphorylée (Ghetti et al. 1989; Ghetti et al. 1994; Ghetti et al. 1995; Ghetti et al. 1996).

Une tauopathie est aussi observée dans les cas de vMCJ, pathologie caractérisée par des dépôts de PrP sous la forme de plaques florides. Les études de différents cas de vMCJ décrivent de nombreux marquages phospho-tau positifs au niveau des neurites, le plus souvent autour des plaques (**Figure 21**), mais aussi péri-vacuolaires ainsi que quelques rares neurones positifs (Giaccone et al. 2008; Reiniger et al. 2011). Au contraire de ce qui est observé dans la MA, il n'est pas possible de détecter de protéine tau hyperphosphorylée insoluble ni de DNF dans la vMCJ.

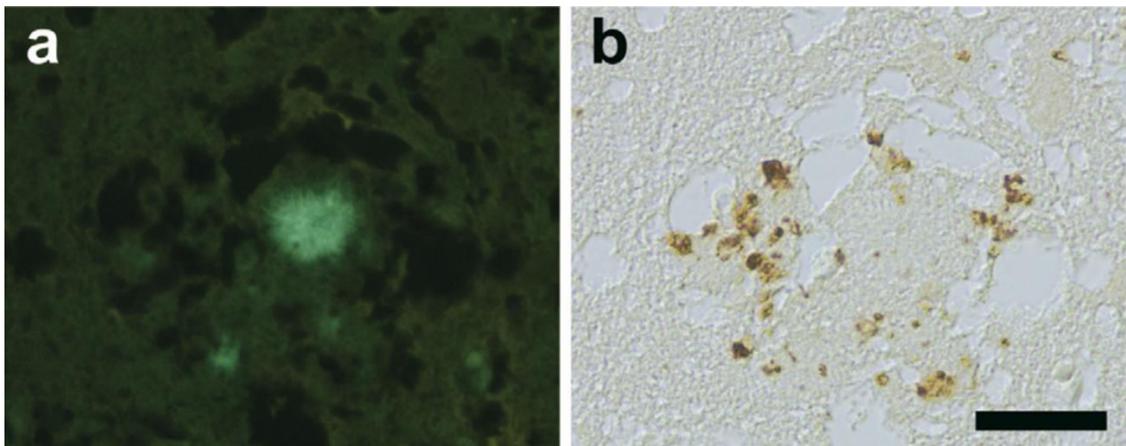


Figure 21 : Plaque amyloïde et marquage tau-positif dans le cerveau d'un patient vMCJ. La même section du cortex cérébral d'un cerveau de patient atteint de vMCJ a été traitée à la thioflavine S (**a**) et immunomarkée à l'aide de l'anticorps anti-tau AT8 (**b**) (Giaccone et al. 2008).

De façon générale une tauopathie est observée dans les maladies à prions induisant des plaques amyloïdes. Ainsi des études récentes rapportent le même profil d'immunoréactivité de la protéine tau phosphorylée au niveau des neurites entourant les plaques dans des cohortes

de patients atteints de MCJ génétique (mutation E200K) ou de MCJ sporadique (Reiniger et al. 2011; Kovacs et al. 2011; Kovacs et al. 2016).

L'interaction des protéines tau et prion a été observée *in vitro*, concluant qu'elles étaient capables d'interagir entre elles (Wang et al. 2008). Cette étude montre que le domaine de répétition de la PrP semble essentiel à la liaison, et que les mutations de *PRNP* peuvent influencer sur cette liaison. Plus récemment l'équipe de Bruce Chesebro a étudié *in vivo* la progression d'une pathologie prion amyloïde en infectant des souris exprimant ou non la protéine tau humaine (Race et al. 2016). Les résultats montrent une détection abondante de la protéine humaine tau phosphorylée, associée aux dépôts de PrPsc, en revanche l'expression ou non de la protéine tau n'a pas d'influence négative sur le temps de survie des animaux.

Bien qu'une relation entre ces deux protéines ait été décrite, les voies de signalisation impliquées, les assemblages spécifiques et les mécanismes qui engendrent une tauopathie en présence de PrPsc restent inconnus.

On peut aussi noter que la détection de la protéine tau dans le LCR est utile pour le diagnostic des maladies à prions. En effet, les niveaux de détection de la protéine 14-3-3 et de tau totale sont parmi les marqueurs les plus sensibles pour le diagnostic des MCJ sporadiques (Zanusso et al. 2011). L'association de l'augmentation de tau totale et du ration tau totale/tau-phospho a une forte spécificité pour la MCJ sporadique et facilite le diagnostic différentiel avec la MA (dans laquelle les niveaux de phospho-tau sont augmentés) (Skillback et al. 2014). Enfin, selon une étude réalisée sur des patients portant la mutation E200K, il semblerait que le niveau de tau totale mesurée dans le LCR serait en corrélation avec la sévérité de la maladie et de l'avancement du déclin cognitif (Cohen et al. 2015).

L'évaluation du niveau de phospho-tau dans le LCR telle qu'elle est effectuée aujourd'hui (épitope pT181) ne semble ni sensible ni spécifique pour le diagnostic des ESST, mais on peut imaginer que des mesures utilisant d'autres épitopes soient plus pertinentes (Kovacs et al. 2016).

V/ Approche thérapeutique dans les maladies à prions

A ce jour, aucun traitement de référence n'existe dans la thérapeutique des maladies à prions. Ce domaine de recherche reste complexe, car comme pour l'ensemble des maladies du SNC, les molécules candidates doivent être capables de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE), et se retrouver en concentration efficace au niveau du cerveau. De plus, ces traitements étant administrés pour une relativement longue durée, les molécules doivent être bien tolérées d'une façon générale et avoir une toxicité intrinsèque la plus faible possible. Une autre difficulté commune aux maladies à dépôts de protéines est de pouvoir trouver un traitement efficace alors que les signes cliniques sont déjà déclarés et que les lésions au niveau du SNC sont constituées.

L'accumulation de protéines mal conformées est un phénomène commun à de nombreuses pathologies neurodégénératives (pour revue (Carrell and Lomas 1997)), ainsi il est possible qu'une approche efficace dans les maladies à prions puisse ouvrir des pistes de recherches dans le traitement d'autres neuropathologies (et inversement). L'avantage de la recherche thérapeutique dans les ESST est d'avoir des mesures claires et non ambiguës du résultat dans les modèles expérimentaux qui reproduisent la pathologie *in toto*.

Plusieurs molécules de classes thérapeutiques très différentes ont déjà été évaluées dans les maladies à prions. En effet, les premières tentatives de traitement ont été réalisées avec des antiviraux (amantadine, aciclovir, ...), lorsqu'il n'était pas encore clairement admis que l'agent responsable était une protéine. Ensuite une des approches la plus utilisée a été de cibler la PrP afin de limiter sa conversion. Pour cela des modèles permettant un criblage à haut débit ont permis de sélectionner non seulement des composés résultants d'études de conception mais aussi de nombreuses molécules déjà utilisées chez l'Homme pour d'autres affections. Le repositionnement de molécules possède en effet un avantage certain : ces thérapies étant déjà utilisées chez l'Homme, leurs pharmacocinétiques (passage de la BHE) et leurs tolérances sont déjà bien connues. De plus, en cas d'efficacité certaine dans les modèles *in vitro* et *in vivo*, ces molécules peuvent être rapidement disponibles pour une évaluation clinique.

Plusieurs molécules ont déjà été testées dans ce domaine, avec plus ou moins d'efficacité. Plusieurs stratégies d'attaques sont possibles :

- i) intervenir dans la conversion de la PrPc en PrPsc, en interagissant directement avec une des formes de la PrP ou bien avec un des cofacteurs de la conversion ;
- ii) diminuer la quantité de PrPc disponible, soit en diminuant son expression ou sa présentation à la membrane cellulaire ou bien en augmentant sa dégradation ;
- iii) augmenter la dégradation de la PrPsc ; iiiii) agir sur les conséquences en aval du processus de conversion.

1. Inhibition de la conversion

Après avoir observé que les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) endogènes étaient liés aux dépôts de PrPsc dans les ESST (Snow et al. 1989), l'effet anti-prion de polyanions sulfatés a été évalué. Ces composés, incluant le pentosan polysulfate (PPS) et les héparanes mimétiques, montrent une inhibition de la propagation de la PrPsc et/ou une diminution de l'accumulation de PrPsc dans des cultures cellulaires infectées et permettent un allongement de la période d'incubation chez des rongeurs inoculés par voie périphérique par des souches de tremblantes (Ehlers and Diringer 1984; Diringer and Ehlers 1991; Ladogana et al. 1992; Caughey and Raymond 1993; Adjou et al. 2003; Larramendy-Gozalet al. 2007). Le PPS a aussi été étudié chez des souris inoculées intracérébralement par une souche de tremblante, le traitement par perfusion intraventriculaire continue pendant quatre semaines de PPS permettait un allongement significatif du temps de survie (Doh-ura et al. 2004). Le mécanisme d'action le plus probable est que ces composés rentrent en compétition avec les HSPG endogènes pour lier la PrPc, la rendant non disponible pour la conversion en PrPsc.

Ces résultats prometteurs, notamment pour le PPS, ont abouti à son administration chez l'Homme. Le traitement au PPS se fait par perfusion intraventriculaire continue, la molécule étant incapable de franchir la BHE. L'administration chez les patients semble avoir un effet bénéfique sur la survie dans quelques cas de vMCJ, mais ne permet pas d'améliorer les déficits déjà installés ni d'empêcher l'évolution vers une atrophie cérébrale majeure (Todd et al. 2005; Whittle, Knight, and Will 2006; Parry et al. 2007; Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009; Terada et al. 2010). Toutefois, la difficulté à mettre en place ces traitements et les effets secondaires graves qu'ils peuvent entraîner (épanchement sous dural et saignements intraventriculaires) ne permettent pas d'envisager une utilisation systématique du PPS.

Notons que le rouge Congo (RC), un colorant utilisé notamment en histopathologie comme marqueur des dépôts amyloïdes, a un mécanisme d'action similaire aux HSPG. Le

traitement de cultures infectées par la tremblante entraîne jusqu'à 90% de diminution de l'accumulation de PrP^{sc} (Caughey and Race 1992; Caughey and Raymond 1993; Cronier et al. 2007). De la même façon son évaluation *in vivo* montre un allongement du temps de survie, et cet effet bénéfique est d'autant plus marqué que le traitement est proche du moment de l'infection (Ingrosso, Ladogana, and Pocchiari 1995; Poli et al. 2004). Néanmoins cette molécule est toxique et ne passe pas la BHE, ce qui ne permet pas son administration en clinique humaine.

Une autre stratégie pour inhiber la conversion de la PrP^c en PrP^{sc} est l'utilisation d'anticorps anti-PrP^c. Effectivement la formation du complexe anticorps-PrP^c empêche la transconformation de cette dernière. L'utilisation *in vitro* d'anticorps sur des cultures de cellules infectées par la tremblante entraîne une réduction significative de PrP^{sc} (Enari, Flechsig, and Weissmann 2001; Peretz, Williamson, et al. 2001; Beringue et al. 2004; Griffin and Cashman 2005; Buchholz et al. 2006). Les anticorps entiers tels qu'ils sont synthétisés ne sont pas capables de passer la BHE, c'est pourquoi des anticorps modifiés ou des fragments d'anticorps ont été développés, ce qui permettrait une administration non invasive (Padiolleau-Lefevre et al. 2007; Jones et al. 2010). Les évaluations *in vivo* d'anticorps chez des souris infectées par la tremblante montrent une diminution de la PrP^{sc} au niveau périphérique ainsi qu'un allongement du temps de survie (White et al. 2003). Une étude utilisant l'administration interventriculaire d'anticorps montre un retard de l'apparition de la maladie, une augmentation de la survie et une diminution des lésions neuropathologiques, de plus la progression de la maladie peut même être ralentie lorsque le traitement est initié tardivement (120 jours après l'inoculation) (Song et al. 2008).

L'immunothérapie serait donc une piste intéressante pour le traitement des ESST, surtout dans les maladies génétiques où l'on connaît la séquence de la PrP et pour lesquelles des anticorps contre des épitopes particuliers peuvent être spécialement sélectionnés (pour revue (Cardinale and Biocca 2013)). Le plus gros challenge de ces thérapies est l'innocuité, d'autant plus que l'agent visé est une protéine de l'hôte.

Un autre groupe de composés montrant des effets anti-prion sont les peptides synthétiques. Ces peptides ont démontré une interaction directe avec la PrP^c, en formant des complexes (Kaneko, Wille, et al. 1997). D'autres études ont montré que des peptides synthétiques de la partie centrale de la PrP (PrP106-136 et PrP109-141 notamment) étaient

capables d'inhiber *in vitro* la conversion acellulaire de la PrPc (Chabry, Caughey, and Chesebro 1998).

D'autres peptides synthétiques dits peptides briseurs de feuillets β (BsBp) ont aussi été étudiés. Ces peptides ont été spécifiquement conçus pour interagir avec la PrPc afin de prévenir sa transconformation en feuillets β mais aussi pour désorganiser les feuillets β déjà formés (Soto 1999; Soto et al. 2000). Les BsBp montrent une homologie partielle avec le fragment de la PrPc impliqué dans le repliement anormal, mais contient un résidu proline dans une structure en feuillet β , or ce résidu est incapable de soutenir une telle structure (Li et al. 1996). L'incubation *in vitro* de PrPsc avec le BsBp iPrP13 induit une diminution de la résistance à la protéinase K de la PrPsc (Soto et al. 2000). Le pré-traitement d'inoculum avec ce même peptide entraîne une augmentation du temps d'incubation chez les souris inoculées, ce pré-traitement permettrait une diminution de 90 à 95% de l'infectiosité et serait dose-dépendant (Soto et al. 2000).

Plusieurs études se sont intéressées à un effet de type dominant négatif. Effectivement nous avons pu voir que certains polymorphismes de la PrPc ne formaient pas de PrPsc, et confèrent une résistance à l'infection (Kaneko, Zulianello, et al. 1997). Des mutants de la PrPc contenant ces épitopes dominants négatifs ont été exprimés *in vitro* dans des modèles cellulaires ainsi que *in vivo*, et ont montré qu'ils étaient incapables de propager l'infection tout en prévenant la conversion de la PrPc endogène (Kaneko, Zulianello, et al. 1997; Perrier et al. 2002). L'équipe de Véronique Perrier s'est ensuite intéressée à des composés qui seraient capables de se lier à ces épitopes et ainsi inhiber la conversion de la PrPc sans ingénierie génétique (Perrier et al. 2000). Cette stratégie est bénéfique puisque le traitement inhibe la formation de PrPsc dans des cultures cellulaires nouvellement infectées et rend la PrPsc indétectable dans des cellules chroniquement infectées.

Une approche complémentaire dans l'utilisation de l'effet dominant négatif est l'apport exogène de mutants PrP dominants négatifs. Les cultures de cellules chroniquement infectées bénéficiant d'un traitement par peptides recombinants dominants négatifs ou bien de l'administration de lentivirus codant pour des mutants dominants négatifs montrent une diminution voire une inhibition complète de la formation de PrPsc (Crozet et al. 2004; Kishida et al. 2004). L'injection de lentivirus codants pour des mutants dominants négatifs a aussi été réalisée *in vivo* dans un modèle de souris (C57Bl/6J) infectées par la tremblante (ME7) (Toupet et al. 2008). Il apparaît qu'une seule injection de lentivirus à 105 jours post infection permet d'augmenter la survie. La survie est d'autant plus augmentée que l'injection

est précoce, toutefois les niveaux de PrPsc des animaux traités ou contrôles sont semblables au stade terminal, montrant que l'expression d'un mutant dominant négatif à l'aide de lentivirus n'est pas stoechiométriquement suffisant pour inhiber complètement la formation de PrPsc.

Une série de composés a été découverte à l'aide d'un test ELISA à haut débit, en sélectionnant les molécules diminuant significativement l'accumulation de PrPsc dans une lignée N2a chroniquement infectée par la souche RML (ScN2a) (Ghaemmaghami et al. 2010; Wagner et al. 2013; Berry et al. 2013; Giles et al. 2015; Giles et al. 2016). Ces molécules sont capables de doubler le temps de survie de souris infectées par la souche RML. Notons toutefois que ces résultats impressionnants résultent de traitements initiés dès le jour de l'inoculation et allant jusqu'à 200mg/kg/j (Giles et al. 2016). Ces composés agiraient en interagissant directement avec la PrPsc, ce qui leur confère une grande spécificité de souche. Ainsi leur évaluation *in vivo* sur les souches humaines n'a à ce jour montré aucune efficacité.

Un intérêt tout particulier a été porté aux antibiotiques tétracycliques tels que la tétracycline et la doxycycline. En effet ces molécules ont démontré un fort pouvoir anti-prion, *in vitro* en inhibant la formation de fibrilles, en diminuant le titre infectieux de tissus infectés et en rétablissant la sensibilité de la PrPsc aux protéases (Tagliavini et al. 2000; Forloni et al. 2002). Les cyclines sont aussi capables d'inhiber la perte neuronale et la prolifération gliale induites *in vitro* par le peptide 106-126 de la PrP (Tagliavini et al. 2000). L'administration de cyclines à des hamsters infectés par la souche de tremblante 263K allonge le temps de survie, de façon différente selon le composé et la voie d'administration (De Luigi et al. 2008).

Ces résultats très encourageants ont abouti à des essais compassionnels non contrôlés, en Italie et en Allemagne. La comparaison de la survie des patients traités avec la doxycycline *versus* des patients non traités, appariée pour l'âge et le codon 129, montre un doublement significatif de la survie (Tagliavini 2008; Ponto and Zerr 2013). Ces données positives ont permis la mise en place d'un essai clinique européen, randomisé et en double aveugle (doxycycline 100mg *per os*, vs placebo), appelé Doxyprions. Les résultats de cet essai ont été décevants, aucune différence de temps de survie n'ayant pu être démontrée (Haïk et al. 2014). En compilant les résultats de l'essai européen avec des données d'essais observationnels, l'équipe allemande permet de mettre en avant une légère amélioration du temps de survie, chez les patients MM, due au traitement par la doxycycline (Varges et al. 2016).

L'effet de la doxycycline n'ayant pas encore été évaluée *in vivo* sur des souches humaines, nous ne pouvons pas conclure si les résultats de l'essai Doxyprions sont dus à une efficacité moindre de la doxycycline vis-à-vis des souches humaines, ou bien à un sous dosage de la doxycycline *per os*.

La doxycycline est actuellement évaluée dans un essai clinique chez des patients asymptomatiques porteurs de mutations responsables de l'IFF (doxycycline 100mg *per os*, vs placebo) (EudraCT 2010-022233-28).

2. Diminution de la PrPc disponible à la conversion

Une des approches thérapeutiques est de diminuer la quantité de PrPc disponible à la conversion afin de limiter la propagation de la maladie. La quinacrine est une molécule utilisée dans le traitement de la malaria. Ses propriétés lysosomotropiques ont attiré l'attention car les lysosomes seraient un des sites de conversion de la PrPc en PrPsc (Caughey et al. 1991; Magalhaes et al. 2005). Une autre étude a montré que la quinacrine était aussi capable de lier de façon non spécifique à la PrPc (Kamatari et al. 2013). *In vitro* cette molécule est effectivement capable de diminuer l'accumulation de PrPsc en inhibant sa formation (Doh-ura, Iwaki, and Caughey 2000; Barret et al. 2003). Bien que la quinacrine puisse passer la BHE, ses effets *in vivo* sont très limités voire inexistantes (Collins et al. 2002; Barret et al. 2003). Cette molécule étant déjà sur le marché pour une autre pathologie, elle a rapidement été utilisée chez l'Homme, mais cette fois encore les résultats obtenus ne montrent pas d'effets bénéfiques au niveau de la clinique et du temps de survie (Furukawa et al. 2002; Nakajima et al. 2004; Haïk et al. 2004; Collinge et al. 2009; Geschwind et al. 2013).

La quinacrine a aussi été utilisée en association avec la chlorpromazine, un inhibiteur de phospholipase A2. Même si ces deux molécules ont montré une inhibition de la formation de PrPsc dans des cultures infectées (Korth et al. 2001), leur utilisation en clinique ne permet pas une amélioration des symptômes ni de la survie (Benito-León 2004; Martinez-Lage et al. 2005).

L'amphotéricine B est un antifongique, capable d'interagir avec le cholestérol pour rompre les membranes cellulaires. Il permettrait donc une diminution de la présentation de la PrPc à la membrane cellulaire. Cet antifongique, ou son analogue moins toxique (MS-8209), est capable de bloquer la formation de PrPsc *in vitro* (Mangé et al. 2000) et permet d'allonger les temps d'incubation, en diminuant l'accumulation de PrPsc au niveau du SNC, et de

retarder l'apparition des signes cliniques, lors de son évaluation sur des souches ovines ou bovines (Pocchiari, Schmittinger, and Masullo 1987; Xi et al. 1992; Adjou et al. 1997; Adjou et al. 2000). Certaines études ont même montré un allongement du temps de survie chez des hamsters infectés par des souches de tremblantes (Adjou et al. 1995; Demaimay et al. 1997; Demaimay, Race, and Chesebro 1999). La seule évaluation en clinique humaine de l'amphotéricine B, portant sur deux patients, n'a pas apporté d'éléments en faveur d'une quelconque efficacité (Masullo et al. 1992).

D'autres composés agissant au niveau du cholestérol de la membrane sont les antidépresseurs tricycliques, comme la désipramine. Son effet *in vitro* sur des cellules ScN2a est une diminution de l'accumulation de PrPsc (Klingenstein et al. 2006). Les auteurs ont aussi synthétisé un nouveau composé, le quinapyramine, fusion de la quinacrine et de la désipramine. Ce composé a un effet bénéfique synergique. De façon intéressante cet effet est encore amélioré lors de l'administration conjointe de simvastatine, un inhibiteur de la HMG-CoA réductase, réduisant la biosynthèse de cholestérol et ralentissant ainsi la réorganisation des membranes lipidiques.

Plus récemment l'équipe de Benoit Schneider s'est intéressée à l'action de TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme, aussi appelée ADAM 17) sur la présentation de la PrPc à la membrane. En effet, en condition physiologique TACE est située à la membrane cellulaire et permet le clivage α de la PrPc, libérant la PrPc soluble, qui n'est alors plus disponible à la membrane cellulaire. En revanche, en contexte infectieux la kinase PDK1 est suractivée et entraîne l'internalisation de TACE, la PrPc membranaire n'est alors plus clivée et est disponible pour la conversion (**Figure 22**). De plus TACE permet aussi le clivage α du récepteur au TNF α , le TNFR1, ce qui permet de diminuer la sensibilité des cellules au TNF α qui est une cytokine impliquée dans les processus d'inflammation. L'utilisation d'un inhibiteur de PDK1 (appelé BX912) sur des lignées cellulaires (1C11) ou sur des cultures primaires de neurones en grains du cervelet infectés montre une diminution de l'accumulation de PrPsc (Pietri et al. 2013). L'administration de BX912 à des souris infectées par la souche de tremblante 22L entraîne une augmentation de la survie de ces rongeurs, une diminution des dépôts de PrPsc dans le SNC et une amélioration générale des lésions neuropathologiques, et ce bien que le traitement soit initié seulement 10 jours avant l'apparition des signes cliniques (soit 130 jours post infection). Son action sur des lignées cellulaires montre aussi un rétablissement du clivage du TNFR1. L'inhibition de PDK1 semble donc être une piste

thérapeutique intéressante dans les maladies à prions mais aussi dans d'autres maladies neurodégénératives, son administration à des modèles de MA engendrant également des effets bénéfiques (Pietri et al. 2013).

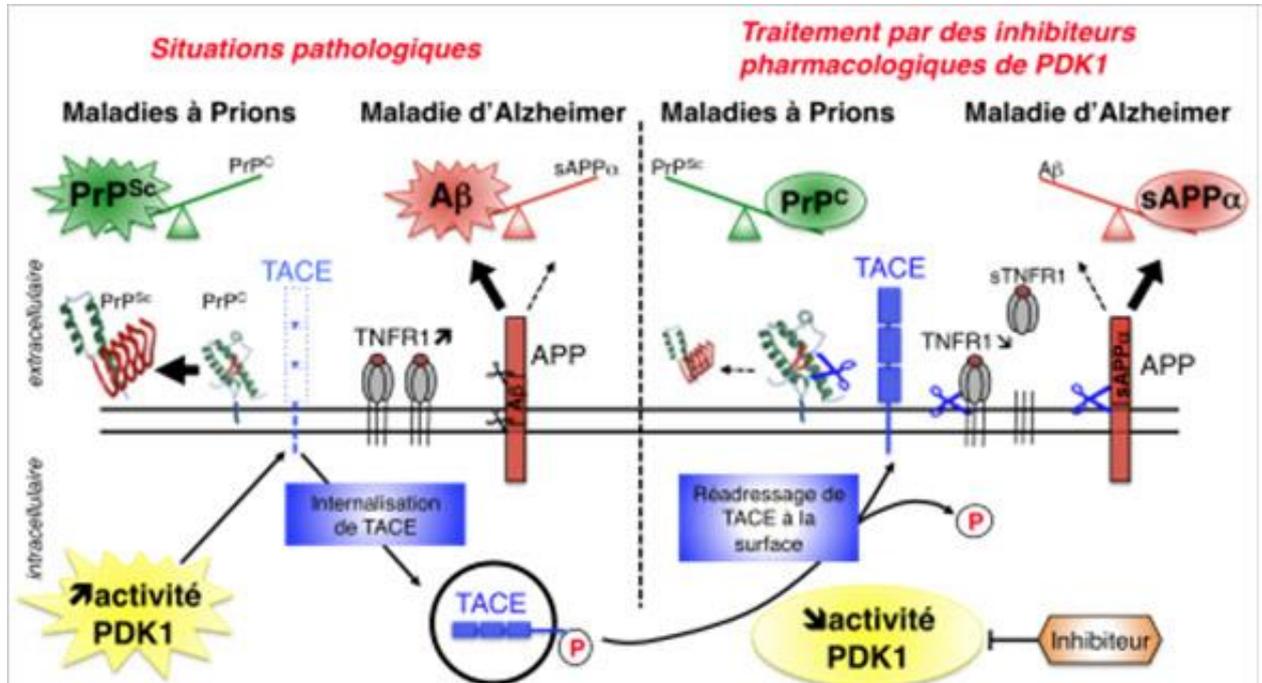


Figure 22 : Implication de TACE et de PDK1 dans la physiopathologie des maladies à prions et de la MA. (Pietri et al. 2013)

Une autre approche permettant de diminuer la quantité de PrPc disponible à la conversion est tout simplement l'inhibition de son expression par ARN interférent. Cette technique a montré de bons résultats *in vitro*, en inhibant la réplication en PrPsc dans des cultures cellulaires (Tilly et al. 2003). Certaines études ont évalué l'impact de ces ARNi *in vivo*, avec la création d'animaux transgéniques ayant intégré l'ARN interférent. Il apparaît que les niveaux de PrPc sont réduits non seulement chez la souris mais aussi chez des embryons expérimentaux de chèvres et de bovins (Pfeifer et al. 2006; Golding et al. 2006). Melanie White et ses collègues se sont intéressés à l'utilisation de l'ARNi comme traitement et non plus comme outil génétique : ils ont ainsi injecté des lentivirus contenant des ARNi à des souris inoculées par une souche de tremblante (White et al. 2008). Une seule injection dans les deux hippocampes des souris à 8 semaines post inoculation est suffisante pour augmenter le temps d'incubation et la survie, tout en réduisant la spongieuse (et ce même au-delà des sites d'injections). Cette approche semble donc être extrêmement intéressante, bien

qu'aujourd'hui l'administration ne peut se faire autrement que par injection directe au niveau du cerveau.

3. Diminution de la PrPsc

Il existe deux voies de dégradation principales dans la cellule : l'Ubiquitine Proteasome System (UPS) et la protéolyse lysosomale (incluant les voies de l'autophagie). Il a été montré que des formes agrégées et oligomérisées de protéines impliquées dans les maladies conformationnelles inhibent l'activité du protéasome, aussi bien dans des modèles cellulaires que *in vivo* (Kristiansen et al. 2007; Deriziotis et al. 2011; Andre and Tabrizi 2012; Hong, Huang, and Jiang 2014). L'altération de l'UPS entraîne une suractivation de l'autophagie (Korolchuk, Menzies, and Rubinsztein 2010).

L'induction de l'autophagie par des composés divers (tréhalose, lithium ou rapamycine) sur des cultures infectées permet la clairance de la PrPsc et augmente le temps de survie dans des modèles murins infectés (Aguib et al. 2009; Heiseke et al. 2009; Cortes et al. 2012).

De façon étonnante le resvératrol, connu pour ses propriétés antioxydantes, permet aussi l'induction de l'autophagie. En effet il agit comme un activateur de Sirt1 (Silent information regulator 1) qui va alors réguler positivement l'activation de l'autophagie. Cette action permet de diminuer la mort neuronale engendrée par l'infection et une inhibition de la toxicité médiée par la PrP aussi bien en culture (Seo et al. 2012; Jeong et al. 2012; Wang et al. 2016) que dans un modèle de *C. elegans* (Bizat et al. 2010).

L'astemizole est un antihistaminique de seconde génération qui a été utilisé dans le traitement des allergies jusqu'en 1999. Il a en effet été retiré du marché pour cause d'effets secondaires rarissimes mais potentiellement fatals (arythmies cardiaques). Son activité anti-prion permet d'inhiber la réplication dans des cultures de neuroblastomes par induction de l'autophagie (Karapetyan et al. 2013). L'administration d'astemizole à des souris inoculées par la souche RML, de 20 à 50 jours post inoculation, permet un rallongement significatif de la survie.

4. Diminution des conséquences neuropathologiques

La flupirtine est un analgésique non opioïde montrant des effets neuroprotecteurs dans des cellules exposées à la PrP106-126 (Perovic et al. 1995; Perovic et al. 1997; Perovic et al. 1998). Un essai clinique en double aveugle, flupirtine *versus* placebo, a permis de constater que les patients atteints de MCJ sporadique d'évolution lente présentaient un ralentissement du déclin cognitif (Otto et al. 2004). En revanche aucune amélioration significative de la survie n'a été observée.

Des études récentes se sont intéressées à l'Unfolded Protein Response (UPR), mécanisme activé par le stress du réticulum endoplasmique lors de l'accumulation de protéines mal repliées (**Figure 23**). Son activation permet, via la voie Bip/PERK/eIF2, de diminuer transitoirement la synthèse protéique afin d'assurer la survie de la cellule. La protéine PERK a été retrouvée sous sa forme phosphorylée (active) dans des cerveaux de patients atteints de MA, de maladie de Parkinson ou de Sclérose Latérale Amyotrophique (Hoozemans et al. 2007; Hoozemans et al. 2009; Atkin et al. 2008).

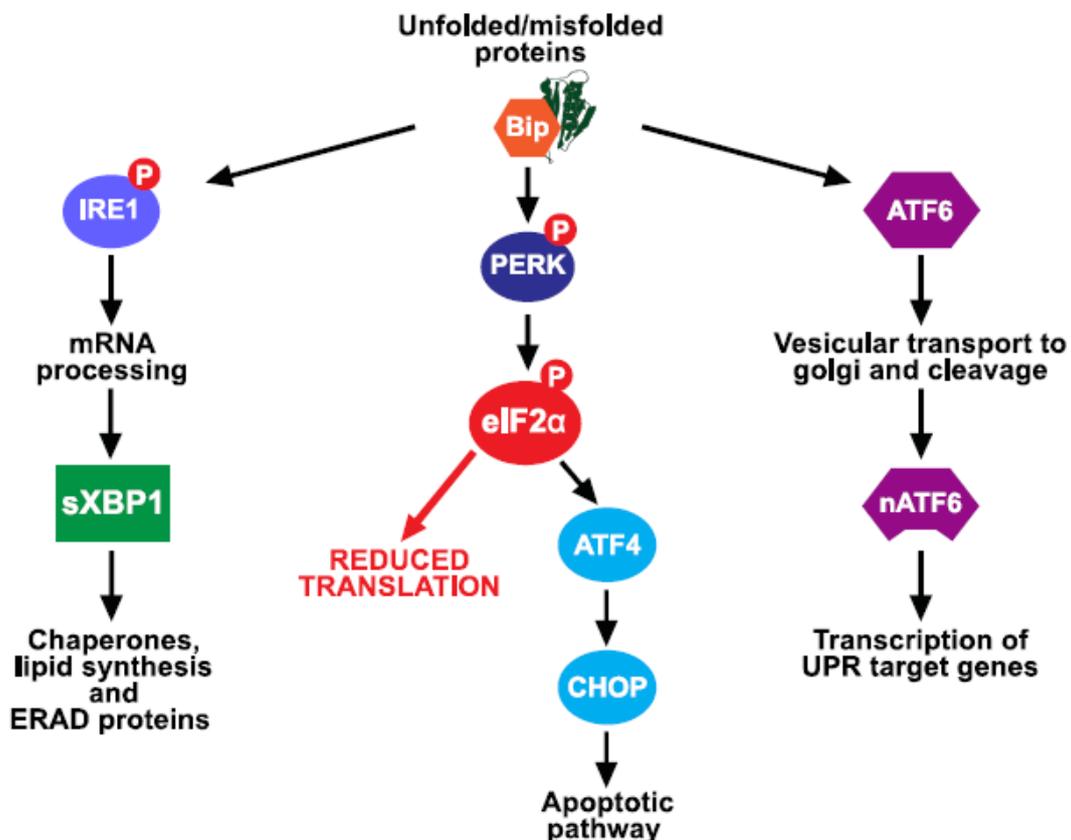


Figure 23 : L'Unfolded Protein Response et ses cascades d'activation.

(Moreno et al. 2013)

L'administration d'un inhibiteur de PERK (GSK2606414) chez des souris infectées par une souche de tremblante engendre des bénéfices importants (Moreno et al. 2013). En effet les animaux ne montrent pas de signes cliniques dus à l'infection et on retrouve au niveau du cerveau des animaux une diminution des lésions de perte neuronale, de spongiose et d'astrocytose. En revanche le traitement n'a pas d'effet sur l'accumulation de PrP^{sc}.

Ce traitement a aussi été testé avec succès dans un modèle murin de démence fronto-temporale, démontrant que l'effet protecteur d'un inhibiteur de PERK est aussi efficace vis-à-vis d'une tauopathie (Radford et al. 2015).

Néanmoins ces résultats très encourageants sont associés à une perte de poids importante et une hyperglycémie chez les animaux. En effet, les souris traitées ne montraient pas de signes de maladies à prions mais présentaient une perte de poids de plus de 20%, ce qui a conduit à leur sacrifice. Ces effets secondaires sont dus au rôle essentiel de PERK au niveau des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Harding et al. 2000; Harding et al. 2001). Les souris déficientes en PERK développent effectivement une hyperglycémie sévère dès 4 semaines de vie et leurs cellules β disparaissent progressivement par apoptose.

Cette approche thérapeutique reste extrêmement intéressante dans le traitement des maladies à prions, des études supplémentaires seront nécessaires pour viser à diminuer les effets périphériques des inhibiteurs de PERK.

Des études ont montré que de nombreux nouveaux neurones pouvaient être générés à partir des cellules souches neurales adultes et être intégrés dans les circuits neuronaux pré-existants (Cameron and McKay 2001). Ces données ont suggéré que l'utilisation de cellules souches, par leur stimulation ou par greffe, serait un traitement possible pour les maladies neurodégénératives.

Le premier essai de greffe de cellules souches neurales fœtales (NSCs), issues d'embryons de souris KO pour la PrP, chez des souris inoculées par une souche de tremblante n'a pas montré l'effet bénéfique escompté, puisqu'aucune amélioration de la survie n'a été observée (Brown et al. 2001). Une augmentation du nombre de neurones fonctionnels a toutefois été rapportée chez ces animaux greffés. Par la suite, des auteurs ayant réalisé une greffe de NSCs 20 jours seulement avant la phase clinique chez des souris infectées, ont pu observer une augmentation du temps d'incubation ainsi que de la survie (Relano-Gines et al. 2011). Les résultats observés dépendent du moment de la greffe, puisqu'aucun effet bénéfique n'a été observé lorsque la greffe était réalisée après l'apparition des signes cliniques. En

revanche le type génétique du greffon (cellules issues de souris WT ou KO pour la PrPc) n'a pas d'influence sur les résultats.

5. Autres composés

Notons que l'utilisations des antiviraux (aciclovir, virabidine, interferon, amantadine) dans la thérapeutique des maladies à prions n'a pas montré d'efficacité (David, Grant, and Ballantyne 1984; Furlow, Whitley, and Wilmes 1982; Kovanen, Haltia, and Cantell 1980; Neri et al. 1984).

D'autres molécules plus inattendues ont pu montrer une efficacité anti-prion sans que leurs mécanisme d'action soit connu. C'est le cas notamment du curcumin, pigment principal du curcuma, qui est un polyphénol possédant des propriétés anti cancéreuses et anti inflammatoires (pour revue (Kunnumakkara et al. 2016)). Son utilisation sur des cellules infectées engendre une diminution de l'accumulation de PrPsc en inhibant la conversion de la PrPc (Caughey et al. 2003). Le traitement à l'aide de doses faibles de curcumin (50mg/kg/j) de souris inoculées avec une souche de tremblante, à partir de 100jours post infection, montre un allongement significatif du temps de vie (Riemer et al. 2008). En revanche aucune amélioration n'a pu être mise en évidence à l'aide du traitement à hautes doses (500mg/kg/j).

6. Conclusion

Comme nous venons de le voir, un nombre non négligeable de composés ont été étudiés pour leurs effets anti-prion. Pourtant aucun n'a réussi à démontrer une efficacité en clinique sur les ESST humaines. Plusieurs points sont en effet questionnables dans le domaine de la recherche thérapeutique dans les maladies à prions.

Tout d'abord nous avons pu voir qu'un grand nombre de molécules est évalué sur des souches animales, or les traitements peuvent être souches spécifiques, notamment pour les composés interagissant avec la PrP. Ainsi le développement de composés extrêmement efficaces contre la tremblante n'est à ce jour pas bénéfique pour la thérapeutique humaine.

De plus, les essais *in vivo* sont souvent peu représentatifs de ce qu'il peut se passer en clinique humaine. En effet, les traitements expérimentaux sont souvent initiés bien avant la phase clinique, voire simultanés à l'infection. Une efficacité de ces composés est prometteuse pour les porteurs de mutation du gène *PRNP*, pouvant bénéficier de traitements

prophylactiques, mais sera moins pertinente pour la majorité des cas d'ESST humaines (MCJ sporadiques).

Afin de pouvoir évaluer le plus grand nombre de composés en un temps réduit, il apparaît donc nécessaire de disposer d'un modèle *in vitro* permettant la propagation des souches humaines. Les molécules efficaces devront pouvoir être évaluées lors de la phase toxique de la maladie et non uniquement lors de la phase répliquative, afin d'extrapoler leur éventuelle efficacité en clinique humaine.

Enfin, dans ce type de pathologie à évolution rapide il y a un risque de biais de recrutement dans les essais cliniques. En effet, le temps nécessaire à la pose du diagnostic et au recrutement dans l'essai peut être long et ne permet pas de recruter des patients ayant une évolution rapide, rendant indispensable la mise en place d'essais contrôlés.

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail de thèse sont axés autour de l'utilisation d'un modèle de cultures primaires de neurones afin d'étudier deux thèmes principaux : tout d'abord une approche physiopathologique, en explorant la relation entre la protéine prion et les anomalies de la protéine tau, puis une approche thérapeutique, en recherchant des effets anti-prion de certains composés pharmacologiques.

Dans la première partie nous avons étudié la toxicité induite par la présence de protéines PrP mutées, notamment en observant les anomalies de tau dans un modèle cellulaire exposé à des PrP recombinantes. En effet, les événements moléculaires qui aboutissent à l'agrégation et à l'hyperphosphorylation de tau en présence de l'accumulation de protéines amyloïdes sont encore mal connus. Nous avons pu observer que l'exposition de cultures primaires corticales à des PrP recombinantes mutées induisait une hyperphosphorylation de tau. Nous avons pu étudier l'impact du niveau d'expression de la PrPc sur l'hyperphosphorylation de tau et identifier les assemblages de PrP déclenchant ces anomalies. Une approche pharmacologique nous a aussi permis d'identifier une voie de signalisation cellulaire impliquant la PrPc dans la phosphorylation anormale de la protéine tau.

Dans la deuxième partie nous nous sommes intéressés à la mise au point d'un modèle cellulaire de réplication des souches humaines de prions, permettant une évaluation relativement rapide de l'efficacité de molécules anti-prion vis-à-vis de ces souches. Aucun traitement n'est actuellement disponible en clinique. Cela est notamment dû à l'absence de modèle cellulaire répliquant les prions humains de façon stable. En se basant sur notre système de cultures permissifs aux souches de tremblantes, et à l'aide de souris transgéniques surexprimant la PrPc humaine, nous avons pu développer un modèle cellulaire d'infection de neurones primaires permettant la réplication de différents isolats humains en passage primaire. Ce modèle nous a permis de tester plusieurs molécules à visée thérapeutique. Les effets bénéfiques de ces traitements *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par un allongement du temps de survie de souris inoculées par des souches humaines et traitées par ces molécules.

RÉSULTATS

PARTIE 1

Introduction

Dans cette première partie nous proposons d'aborder la question du lien entre protéine amyloïde et déclenchement de la pathologie tau en faisant appel à un modèle prion original. En effet, dans certaines maladies à prions, en plus de l'accumulation de la PrP^{sc} il a été rapporté une tauopathie associée. C'est le cas notamment dans certaines formes génétiques de maladies à prions comme le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), ou bien chez les patients atteints de vMCJ (Ghetti et al. 1989; Giaccone et al. 2008; Reiniger et al. 2011). La PrP^{sc} est donc capable, dans certaines conditions, de déclencher une pathologie tau, sans les mécanismes impliqués soient connus.

De plus, dans le cas de la maladie d'Alzheimer (MA), bien que l'hyperphosphorylation et l'agrégation de tau soient considérées comme critiques dans le relais de la toxicité induite par le peptide A β , les événements moléculaires qui sous-tendent les anomalies de tau en réponse à l'accumulation d'A β restent imparfaitement connus.

Ce projet est notamment fondé sur des données obtenues par l'équipe chez des patients atteints de formes génétiques de maladies à prions et porteurs de mutations au niveau du codon 211 du gène *PRNP* (Peoc'h et al. 2012). Une des mutations (E211D), qui se manifeste par un GSS, est associée, à proximité des nombreuses plaques amyloïdes de PrP^{sc}, à des lésions tau neurofibrillaires (couronnes neuritiques et dégénérescences neurofibrillaires) comparables à celles observées dans la MA. Ces dépôts de tau ne sont pas observés chez les patients porteurs d'une autre mutation (E211Q) et qui développent une maladie de Creutzfeldt-Jakob. En dynamique moléculaire, les deux substitutions ont des effets différents sur la conformation de la PrP. Leurs cinétiques d'agrégation sont également distinctes. Ces mutations de *PRNP* constituent donc un outil moléculaire précieux pour l'étude des mécanismes conduisant à la phosphorylation anormale et à l'agrégation de la protéine tau.

Cette étude vise à caractériser l'interaction entre la PrP pathologique et les anomalies de tau dans des modèles cellulaires exposés à des PrP recombinantes. Les mutations E211 nouvellement identifiées seront utilisées en exposant des cultures de neurones aux monomères et oligomères de PrP recombinantes E211D, E211Q et sauvage, obtenus *in vitro* par un processus de polymérisation. Les objectifs sont de déterminer si cette approche permet de

modéliser les effets mutation-spécifiques sur les altérations de la protéine tau observés chez l'Homme, de décrypter les événements moléculaires et cellulaires qui conduisent à une pathologie tau dans certaines maladies à prions, d'étudier l'implication du niveau d'expression de la PrP^c dans ces phénomènes, et d'identifier les conformères de PrP^{sc} responsables. Des approches pharmacologiques contribueront à l'étude des voies de signalisations impliquées dans la pathologie de tau et du dysfonctionnement neuronal.

Les résultats issus de cette étude devraient contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie tau neurofibrillaire induite par les prions, et, au travers de ce paradigme, apporter un nouvel éclairage sur la relation pathologique A β -tau au cours de la maladie d'Alzheimer.

Résultats

Article 1:

Mutation-specific effect of human prion proteins on tau abnormal phosphorylation in neurons through a PrP- and PDK1-dependent pathway

Alexianne Gougerot^{1,2}, Katarina Grznarova^{1,2}, Atenas Posada-Borbon^{1,2}, Loyal Maatouk^{1,2}, Valeria Parrales^{1,2}, Samia Hannaoui^{1,2}, Serfildan Yildirim^{1,2}, Etienne Levavasseur^{1,2}, Nicolas Privat^{1,2}, Nicolas Bizat^{1,2}, Human Rezaei³, Stéphane Haïk^{1,2,4,5}

¹ Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris VI UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris, France,

² Centre National de Référence des Agents Transmissibles Non Conventionnels, Paris, France,

³INRA, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France,

⁴AP-HP, Cellule Nationale de Référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob, G.H. Pitié-Salpêtrière, Paris, France,

⁵AP-HP, Laboratoire de Neuropathologie R. Escourolle, G.H. Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Abstract

To identify factors that contribute to the relationship between prion and tau pathologies, we took advantage from mutations at codon 211 of *PRNP*. The substitution of glutamate (E) at codon 211 with either glutamine (Q) or aspartate (D), leads to distinct disorders. In E211D patients, in addition to the classical prion pathology, we observed abundant tau pathology, similar to that observed in Alzheimer's disease (AD), although the amyloid core was composed of abnormal PrP instead of Abeta peptides. Here we assessed the effect of PrP assemblies on tau phosphorylation by exposing primary cortical neuronal cultures from transgenic mouse lines with various levels of PrP expression to monomers and protein assemblies formed by recombinant human PrPs (wild type, E211D and E211Q). Exposure to oligomeric PrP assemblies had a significant impact on abnormal phosphorylation of tau unlike the exposure to monomeric preparation. This effect was E211-mutation dependent with a marked effect of E211D-PrP and was partially dependent of PrPc expression. Inhibition of the PDK1 kinase, involved in both prion diseases and AD significantly reduced E211D-induced tau abnormal phosphorylation. Our results are very consistent with what has been observed in E211D/Q patient brains and provide a novel *in vitro* model to study PrP-tau interplay.

Introduction

Human prion diseases are a complex group of fatal subacute neurodegenerative diseases that are clinically characterized by progressive dementia associated with various neurological symptoms. Neuropathological hallmarks associate spongiform change, neuronal loss, astrocytosis and microglial proliferation and inconstant amyloid plaques in the central nervous system ¹. Unlike other brain proteinopathies, prion diseases include sporadic, infectious and genetic forms, which can be transmitted experimentally to non-human primates and rodents. An almost constant biochemical hallmark is the accumulation of an abnormal partially protease-resistant isoform (PrP^{Sc}) of the host-encoded cellular prion protein (PrP^C). PrP^C is a membrane GPI-anchored glycoprotein of 253 amino acids in humans with a highly conserved sequence between species. According to the "protein only" hypothesis ², the transmissible agent is thought to be solely composed of PrP^{Sc} and propagates by converting PrP^C into PrP^{Sc}, which is prone to aggregation and partially resistant to proteases ³. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease is the most common form of prion diseases in humans and accounts for more than 80 percents of the cases with a yearly incidence of 1 to 1.5 case per million. Genetic forms (also called inherited or familial prion diseases) are of autosomal dominant inheritance and are genetically linked to mutations in the PrP coding sequence such as the E200K mutation in familial CJD, the P102L mutation in Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) syndrome, and the D178N/M-129 haplotype in familial fatal insomnia ⁴⁻⁷. Recently, we reported a novel mechanism governing the phenotypic expression of genetic prion diseases. We observed that substitutions at codon 211 of *PRNP* drive a phenotypical shift between two distinct inherited prion diseases (CJD due to E211Q mutation versus GSS syndrome due to E211D mutation) ⁸. While E211Q-CJD showed a classical neuropathological pattern of spongiform encephalopathy, E211D-GSS syndrome was characterized by abundant amyloid plaques of the multicentric type associated with massive tau pathology with numerous neurofibrillary tangles, neuropil threads and dystrophic neurites around amyloid plaques. The PrP^{res} fragments generated by the digestion with proteinase K of PrP^{Sc} found in the brain of E211 mutation-associated CJD and GSS patients were different and exhibited distinct behaviors in an *in vitro* model of prion protein conversion, suggesting that mutations at position 211 impact differently the protein stability. This was confirmed by molecular dynamics and the study of oligomerization pathway of the corresponding recombinant mutant PrPs ⁸.

In this study, we took advantage of mutations at codon 211 to investigate the mechanisms leading to tau abnormal phosphorylation that are observed in some genetic but also infectious forms of prion diseases. Abnormal tau phosphorylation was reported in GSS syndrome due notably to P102L, A117V and P105L mutations, and in inherited prion diseases associated

with insertions into the N-terminal octarepeat region or to the stop mutation 145X⁹⁻¹⁵. In young patients with variant CJD, due to a contamination by the prion responsible for bovine spongiform encephalopathy, the presence of tau pathology was also detected^{16, 17}. While tau lesions correlate with prion protein burden and generally predominate around amyloid PrP plaques¹⁷, how PrP amyloid triggers tau pathology remains unclear. Beyond the prion field, a better understanding of the interplay between misfolded amyloid proteins and the triggering of tau abnormal phosphorylation is of interest in other neurodegenerative diseases, notably in Alzheimer's disease. Indeed, prion-induced tau lesions such as those associated with E211D-GSS syndrome are similar to the neuritic plaques, tangles and neuronal threads observed in AD¹⁸ where the amyloid component is composed of A-beta peptides instead of abnormal PrP. Using primary cortical neuronal cultures from transgenic mouse lines with various levels of PrP expression, we assessed the effect of recombinant human PrPs (wild type, E211D and E211Q) on tau alteration and investigated whether this effect is dependent on PrP assemblies and on the level of PrP^C expression by the exposed neurons. In addition, the role of the signaling pathway that involved PDK1 activation recently reported in both prion and Alzheimer's diseases was investigated¹⁹.

Materials and methods

Mouse lines

Four different mouse lines were used for primary neuronal cells cultures: the C57/Bl6 line from René Janvier, Le Genest-St-Isle, France; transgenic lines including tg650 mice overexpressing human PrP with a methionine at codon 129 (expression rate x6 as compared with the human brain)²⁰ and tga20 overexpressing mouse PrP (expression rate x10 as compared with the mouse brain) backcrossed on C57Bl/6 that was kindly provided by Pierre Aucouturier (INSERM UMRS 938, Paris, France)²¹; and the PrP^{-/-} backcrossed on C57Bl/6 background that was kindly provided by Vincent Béringue (Institut National de Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France)²². Animal experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals (Directive 86/609EC) and all efforts were made to minimize suffering. Experiments were approved by Ethics Committee of the French Ministry of Research (authorization n° 02298.03).

Primary Neuronal Cells Cultures

Cortical neurons were obtained by dissecting 15-day-old embryos extracted from pregnant mice as previously described^{23,24}. Briefly, embryonic brains were removed and transferred to PBS supplemented with glucose. Cortices were dissected, then dissociated mechanically and enzymatically. After decanting for 5 min, cells were collected by centrifugation at 115 x g (Eppendorf, rotor 5417R) for 7 min at 4°C. Cells were then plated onto plastic culture wells precoated with 10µg/mL poly-D-lysine (PDL) (Sigma-Aldrich, France) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium–Glutamax I high glucose (DMEM) (Life Technologies, France), supplemented with penicillin and streptomycin (Life Technologies), 3% fetal calf serum (FCS) (Life Technologies), and N2 and B27 supplements (Life Technologies). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After 2 days, the culture medium was replaced with serum-free DMEM supplemented with N2 and B27. Prior to exposure to recombinant proteins, cortical cultures comprised 94% neurons and 6% astrocytes and no detectable microglial cells²⁴.

Recombinant proteins and preparation of oligomers

Recombinant proteins were prepared as described²⁵. E211Q and E211D mutations were performed on Met129 WT human PrP scaffold as previously described⁸. Monomeric solutions (50µM) were obtained by dissolving lyophilized proteins in MOPS (3-(*N*-morpholino)

propanesulfonic acid), pH 7,0 at 20mM. Oligomers were then obtained by heating monomeric solutions at 60°C during 1 hour ^{8,26}.

Proteinase K digestion of recombinant PrPs

Rec PrPs were incubated with proteinase K (PK) (Promega, France) at different ratios of concentrations (from 0 to 1:5000) for 1 hour at 37°C. Digestion was stopped by adding phenylmethylsulfonide fluoride (PMSF). Proteins were precipitated by the addition of methanol to the samples and incubated for 1h at -20°C. The samples were then centrifuged at 16,000 × *g* (5417R rotor; Eppendorf) for 30 min. Pellets were resuspended in loading buffer and heated at 95°C for 5 min and samples were loaded onto precast 4 to 12% Bis-Tris gels (Invitrogen). The separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Whatman, France). Proteins were first immunostained with various monoclonal anti-PrP antibodies (mAb) 3F4 (1/5,000; epitope 109–112, Eurogentec, France), Sha31 (1/25,000; epitope 148–159, SPI-Bio, France), SAF32 (1/1000; epitope 58-89; Bertin Pharma, France), and anti-mouse Ig secondary antibody (GE Healthcare Europe GmbH, France). Labeled proteins were detected with the ECL chemiluminescence kit (GE Healthcare Europe GmbH).

Size exclusion chromatography

Just before exposure of cortical cultures, samples of fresh oligomeric preparations (incubation at 60°C for one hour of monomeric solution of recombinant PrP) were submitted to size exclusion chromatography. Experiments were performed using TSK 4000SW column with sodium citrate 20 mM, pH 4, as a running buffer as previously described ^{8,27}.

Electron microscopy

One drop of monomeric or oligomeric solution of each recombinant PrP was put on formvar/carbon coated grids (Delta Microscopies). After 4 washes with ultrapure water (Sigma), samples were contrasted for 5 minutes with UranylLess (Delta Microscopies) and then washed again 4 times. Once samples were dry, observations were performed with a Hitachi HT7700 electron microscope, operating at 80kV. Pictures (2048 x 2048) were taken with an AMT41B camera (pixels 7,4µM x 7,4µM).

Neuronal exposition to recombinant PrPs

Monomeric and oligomeric solutions were incubated at 37°C for 10min before exposition to neuronal cultures. They were added to the medium to reach final concentrations of 50; 100 and 200µg/mL in wells. Plates were incubated at 37°C during the appropriate times of

expositions and cells were then fixed or lysed. In a set of experiments, a PDK1 inhibitor, BX912 (Sigma), was used. BX912 was first dissolved and stocked in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma). It was extemporaneously diluted in DMEM and then added to the medium to reach appropriate concentrations. Same amount of DMSO was added in control wells.

Total cell viability assay

Cell viability was measured using 3, [4,5, dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyltetrazolium or MTT assay (Sigma). Cells were grown in 96-well plates precoated with PDL and exposed to different concentrations of the recombinants PrPs. After determined times of exposure, 15 μ L of a MTT solution at 5mg/mL were added in each well and incubated for at least 2,5 hours. Then the medium was replaced with propan-2-ol and HCl (92:8 V/V). The absorbance was measured at 570 nm on a microplate reader (Sunrise; Tecan, Männedorf, Switzerland).

Immunofluorescence experiments

Cells grown on PDL-coated glass coverslips were rinsed twice with PBS (Life Technologies) and then fixed with paraformaldehyde (PFA) 4%. Fixed cells were permeabilized with 0,1% Triton X-100 for 10min at room temperature (RT) and then saturated with a solution of 2% FCS and 2% BSA for 30min at RT. Phosphorylated tau was detected with pS262 antibody (pAb, 1/1000; Life Technologies) and AT8 antibody (mAb, 1/1000, ThermoFischer) and neurons were labeled with anti-microtubule associated protein (MAP2) (mAb, 1/500; Sigma-Aldrich). Alexa-conjugated secondary antibodies were incubated with the appropriate primary antibodies. Cells were mounted in Prolong Gold antifade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies). Immunolabeling was observed using a Zeiss Axiovert 200 epifluorescence microscope. Images from 3 independent experiments performed in triplicates were acquired under the same conditions using a cooled digital camera (CoolSnap HQ; Roper Scientific Princeton Instrument) and threshold levels were maintained constant across all images to avoid artifacts. We quantified the number of tau positive neuritic beads in 54 fields of at least ten cells for each condition, using Image J software.

Statistical analysis

The software GraphPad Prism 6 was used. The Mann-Whitney test was used to compare two groups and a two way ANOVA was used for multiple comparisons. Significant differences are represented for *p* value of <0.05: *; <0.01: **; <0.001 ***; <0.0001: ****.

Results

Electronic microscopy, size exclusion chromatography and PK digestion of recombinant PrP

Monomeric and oligomeric preparations of the different recombinant PrPs were submitted to mild PK digestion. The resistant fragments were observed by Western blot, using three anti-PrP antibodies targeting various epitopes: 3F4 (epitope 109-112); sha31 (epitope 148-159) and SAF32 (epitope 59–89). The three antibodies revealed the same fragments in all PrP preparations (WT, E211Q, E211D). While no difference was detectable in the digestion of the monomeric recombinant PrPs (data not shown), the sensitivity to PK digestion of oligomeric preparations varied with the mutation at codon 211 (Figure 1). Indeed, E211D PrP oligomers were detectable after a treatment at the highest concentration of PK, while the other PrPs (WT and E211Q) oligomers were fully digested.

Electronic microscopy characterization showed that, as expected, monomeric and oligomeric preparations of recombinant PrP did not exhibit any structures suggestive of protofibrils or fibrils (Figure 2). In addition, size exclusion chromatography of oligomeric preparation of E211Q and E211D PrP confirmed that PrP oligomers were the major species in both preparations. Remaining monomers were less than 5% E211D PrP in E211D PrP preparations and less than 20% in E211Q preparations.

Exposure of cortical neurons to oligomeric recombinant PrPs impacts on tau phosphorylation

The effect of recombinant PrPs in monomeric and oligomeric forms on tau phosphorylation was first studied in embryonic cortical cultures from two mouse lines (tga20 and tg650). Cortical cultures were exposed during 4.5 or 9h at protein concentrations of 50 or 100 µg/mL, as preliminary observations, using larger kinetics and range of concentration, suggested that there might be an effect under these conditions. In contrast with the results obtained with AT8 antibody, immunostaining with the pS262 phospho-tau antibody revealed the presence of neuritic beads in exposed cortical cultures (Figure 4). This effect was not observed with the vehicle alone (MOPS). In addition, the impact of recombinant PrPs on pS262 tau phosphorylation depended not only on the presence of a E211 mutation but also on the type of E211 mutation. Indeed, while exposure to the WT PrP did not lead to any formation of neuritic beads in any conditions, the mutants PrPs, and especially the E211D one, led to a significant increase in the level of tau pS262 neuritic beads (Figures 5 and 6). In cultures from

both tga20 and tg650 mouse lines, the effect of E211D PrP was significantly higher compared with that induced by E211Q PrP which was, when present, of limited importance. The impact of exposure to E211D PrP on pS262 tau phosphorylation was particularly notable after exposure to the oligomeric forms rather than the monomeric forms in cortical cultures from both tga20 and tg650 lines ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$ respectively, Mann-Whitney test). In tga20 mice, overexpressing mouse wild-type PrP, no effect of the monomeric preparations was observed while in cultures from tg650 mice overexpressing human wild-type PrP, a slight effect of the monomeric preparation was observed. The effect of E211D PrP oligomeric preparations was maximum in tga20 mouse cortical cultures at both concentrations (50 and 100 μ g/mL) and both exposure times (4.5 and 9h). In tg650 mouse cortical cultures, E211D PrP oligomer-induced tau phosphorylation was mainly observed at 100 μ g/mL after exposure of 4.5 and 9 hours.

Effect of oligomeric recombinant PrPs on tau phosphorylation in cultures from PrP^{-/-} mice

Since the maximum effect of E211D PrP oligomeric preparations was observed in neuronal cultures from tga20 mice with a very high expression rate of mouse PrP (x10 as compared to the mouse brain, C57Bl/6 genetic background), we aimed to assess whether this effect could also be observed in cortical cultures from mice expressing physiological level of mouse PrP (C57Bl/6) or devoid of mouse PrP expression (PrP^{-/-} C57Bl/6).

First, we confirmed in cultures from C57Bl/6 mice the results obtained in cultures prepared from mouse lines overexpressing PrP. The impact of exposure to E211 oligomeric preparations on tau pS262 phosphorylation was depending on the presence of a mutation (no effect with WT PrP) and on the mutation at codon 211 itself (no effect with E211Q PrP) (Figure 7). Using E211D oligomeric preparation, a significant effect was observed as soon as 4.5h of exposure and from at 50 μ g/mL concentration of exposure. The effect of exposure to 100 μ g/mL of E211D oligomeric preparation was significantly lower than that observed in cultures from tga20 mice ($p < 0.0001$, Mann-Whitney test) suggesting that the impact of E211D oligomers on tau phosphorylation can be dependent on the level of PrPc expression of the exposed neurons.

We then exposed cortical neurons prepared from PrP^{-/-} mice to oligomeric preparations of recombinant PrPs. No effect of E211D PrP oligomeric preparation on tau pS262 phosphorylation was observed in all conditions of exposure, except in neurons exposed to the highest concentration (100 μ g/mL) for the longest period (9h) indicating that, in neuronal cultures devoid of endogenous PrPc, the effect of E211D PrP assemblies is slower and limited compared to cells from wild-type but also tg mouse line expressing PrPc (Figure 8).

Effect of exposure to recombinant PrPs on cellular viability

We assessed whether the effect of recombinant PrPs on pS262 tau phosphorylation could be related to alterations of cell survival. Using a MTT assay, we were not able to observe any alteration of the cellular viability of neuronal cultures from PrP-expressing mouse lines exposed to recombinant PrPs at the concentration and period of exposure previously used (50 or 100µg/mL for 4.5 or 9h). Results were similar for monomeric and oligomeric preparations whatever the presence of E211 mutations and regardless of the mutation itself (E211D or E211Q) (Figure 9). Then, since a neurotoxic effect of oligomers formed by murine wild-type recombinant PrP on cortical neurons had been reported at a concentration of 200µg/mL²⁸, we studied the impact on cell survival of an exposure to a 200µg/mL concentration of WT, E211Q and E211D human PrP oligomers in C57Bl/6 cortical cultures. At this concentration, the earliest significant effect was observed with E211Q oligomeric preparation only after 24h of exposure (Figure 10). At 36h of exposure, a decrease in cell survival was observed for all the recombinant PrPs including WT PrP, E211Q PrP oligomers being the most toxic species.

Linking PDK1 activation to tau pS262 phosphorylation induced by exposure to E211D PrP oligomeric forms.

Since PDK1 activation has been recently shown as an important contributor of the PrPc-dependent signaling pathways involved in neurodegeneration in both prion and Alzheimer's diseases, we assessed whether an inhibitor of PDK1 kinase could modify the effect of E211D PrP oligomeric preparation on tau pS262 phosphorylation. Cortical cultures from the tga20 mouse line were exposed to oligomeric forms of the E211D PrP for 9h. Two hours or one hour before the end of the exposure, various concentrations of a PDK1 inhibitor (BX912) were added to the medium. We observed that the inhibitor of PDK1 was sufficient to significantly inhibit PrP E211D-induced tau abnormal phosphorylation in every condition tested. It was a dose-dependent effect and time-dependent effect (Figure 11).

Discussion

Building on our previous results showing that E211 mutations govern the occurrence of a tau pathology in patients with inherited prion diseases⁸, we demonstrate here that exposure to mutant PrP are able to induce the abnormal phosphorylation of tau at serine 262 in cultured cortical neurons. This PrP-induced tau alteration was governed by the mutation at codon 211 and by the oligomeric assemblies formed by the recombinant PrP. It was in part dependent on PrP^c expression by the neurons and involved PDK1 activation. These results help to better understand the triggering of tau alterations in specific inherited prion diseases and open new avenue to explore the interplay of amyloid formation and tau pathology in both prion and Alzheimer's diseases.

To our knowledge, this is the first study demonstrating a specific biological effect of full-length PrP assemblies with a pathogenic mutation in primary neurons. Prion-induced pS262 phosphorylation was observed only with mutant PrP and not with wild-type PrP. In addition, this effect was mainly seen when E211D was applied. The difference observed between E211D and E211Q mutations could not be explained by the difference observed in oligomer content of recombinant PrP preparations. Indeed, the effect of E211D oligomers (95% of recPrP are in an oligomeric form) was observed at 50µg/ml while no effect was observed with E211Q preparation (80% recPrP are in an oligomeric form) even at 100µg/ml. Remarkably, the biological *in vitro* effect was highly consistent with the neuropathological findings in patients where tau pathology associated with prion deposits is observed in E211D but not E211Q patients⁸. This suggests that the sole presence of the E211D PrP is able to initiate tau abnormal phosphorylation in the brain of affected patients. Indeed, phosphorylation at serine 262 of tau is regarded as an early event in tau pathological cascade^{29, 30}. PS262 immunostaining is a marker of pre-tangles as compared to PHF or AT8 immunostaining that stain mature fibrillary tangles and was not modified in our neuronal cultures exposed to recombinant PrP. The kinetics of E211D PrP-induced phosphorylation of tau at serine 262 that occurred within a few hours in our cellular model is consistent with an early pathological event. The effect of E211D PrP oligomeric preparations on pS262 tau phosphorylation contrasted with the absence or the faint effect of monomeric preparation notably in tga20 cortical cultures that were the most responsive to PrP exposure. The relationship between the formation of oligomeric assemblies of recombinant PrP peptides and proteins and their neurotoxic properties has been reported by several studies^{31, 28, 32}. Wild-type PrP oligomers from various species have been shown neurotoxic while recombinant PrP converted into fibrils lost its toxic effects^{28, 31}. Recombinant ovine PrP-ARR with reduced ability to form large aggregates and fibrils is much more toxic for neuroblastoma cells than ovine PrP-ARQ³³. PrP fibrillar structures

are however important for the infectious properties and the propagation of prions. Interestingly, recent evidences support an uncoupling of prion propagation and toxicity both in vivo and in primary neuronal cultures^{24, 34, 35}. When propagation reaches a steady state, the toxic phase occurs where alternative PrP species such as oligomers may be harmful. Here, we show that formation of oligomeric assemblies is important for the effect of recombinant PrP on tau abnormal phosphorylation. In addition, recombinant PrP effect on tau was specific to E211D PrP. This suggests that the effect is governed by a specific pathway of oligomerization driven by PrP sequence that, in addition to a toxic function associated with prion disease occurrence in both E211D and E211Q mutations, provides a tau pathology-triggering effect as observed with E211D mutation only⁸. Such dissociation between neurotoxic and tau-triggering phosphorylation effects of recombinant PrP preparations was confirmed in our cortical cultures. Indeed, no alteration of cell survival was observed in neuronal cultures exposed to oligomeric preparation of E211D, E211Q and WT PrPs even at the concentration of 100µg/mL and for the duration that induced the highest effect on pS262 tau phosphorylation. In addition, since a neurotoxic effect of murine wild-type PrP oligomers at a higher concentration was reported previously²⁸, we assess the toxicity of PrP oligomeric preparations at 200µg/mL after various times of exposure. A significant decrease in cell survival was observed after 24 hours with the E211Q PrP preparation only. At 36 hours, WT and E211D PrPs showed similar effect on cell survival while E211Q PrP showed a higher toxic effect. Thus, the E211 PrP oligomeric preparation showing the earliest and the highest toxicity (E211Q PrP) was not able to induce tau-pS262 phosphorylation in cortical cultures.

Interestingly, the effect of E211D oligomers was higher in cortical cultures from mice overexpressing PrP^C compared with wild-type mice and was delayed and only observed at the highest concentration (i.e. 100µg/mL) in cultures from PrP^{-/-} mice. This suggests that endogenous PrP^C is involved in the pathway leading to tau abnormal phosphorylation triggered by E211D oligomers. Because this is reminiscent of the PrP^C-dependent effect of A-beta oligomers on neuronal function and survival, we thought to explore pathways involved in both Alzheimer's and prion diseases. We hypothesized that PDK1 activation, recently reported as a key factor in neurodegeneration induced by both A-beta peptides and abnormal PrP in animal and cellular models¹⁹, may be involved in kinase activation induced by E211D PrP. In our cellular model, a treatment by the PDK1-specific inhibitor BX912 inhibited the effect of E211D on tau phosphorylation in a dose- and time-dependent manner. Also of note, phosphorylation of the serine 262 in tau is performed by several kinase including the glycogen synthase kinase-3β (GSK3β) and the cAMP-dependent protein kinase (PKA)³⁶. GSK3β is regarded as a pivotal molecular link between the A-beta pathology and tau abnormal phosphorylation in AD³⁷. However, PDK1 mediates activation of the serine/threonine kinase Akt³⁸ leading to N-terminal serine phosphorylation and the inhibition of GSK3β^{39, 40}. Thus, PKA is a better candidate to

mediate the PDK1- and PrPc-dependent pS262 tau phosphorylation triggered by exposure to E211D PrP oligomers in cortical neurons. Indeed, PDK1 phosphorylates and activates the catalytic subunit of PKA⁴¹. Interestingly, a role for PrPc in transducing cell signals via PKA has been described in neurons from the neonatal retina and the hippocampus^{42,43}. A role of PKA signaling pathway in stimulating PrPsc formation in scrapie-infected cells was also reported⁴⁴. Altogether, these results are consistent with a role of a PrPc/PDK1/PKA pathway leading to pS262 tau phosphorylation in PrP E211D exposed cortical neurons.

To conclude, by taking advantage of PrP E211 mutations, we identified a neuronal model allowing a better understanding of the interplay between the accumulation of misfolded amyloid proteins and the occurrence of tau alterations in neurodegenerative diseases where PrPc and PDK1 signaling pathway may play a pivotal role.

Funding

The research leading to these results has received funding from the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06. This research received support from the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)", the "Fondation Thierry et Annick Desmarest – Institut de France" and from the "Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)".

Acknowledgements

We thank Dominique Langui for his precious help in electron microscopy, Aurélien Dauphin for his helpful support in pS262 positive neuritic bead quantification and the "Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié Salpêtrière" (ICM, Paris, France). We are grateful to Vincent Béringue (INRA, Jouy-en-Josas, France) and Pierre Aucouturier (INSERM, Paris, France) for kindly provided us with PrP^{+/+} and tga20 back-crossed on C57Bl/6 background respectively.

Bibliography

1. Budka H, Aguzzi A, Brown P, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (Prion diseases). *Brain pathology*. 1995;5(4):459-66.
2. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982;216:136-44.
3. Prusiner SB. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13363-83.
4. Goldfarb LG, Brown P, Goldgaber D, et al. Identical mutation in unrelated patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 1990;336:174-5.
5. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*. 1989 Mar 23;338(6213):342-5.
6. Medori R, Tritschler HJ, Leblanc A, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon-178 of the prion protein gene. *The New England journal of medicine*. 1992;326(7):444-9.
7. Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*. 1992;258:806-8.
8. Peoc'h K, Levavasseur E, Delmont E, et al. Substitutions at residue 211 in the prion protein drive a switch between CJD and GSS syndrome, a new mechanism governing inherited neurodegenerative disorders. *Hum Mol Genet*. 2012 Dec 15;21(26):5417-28.
9. Ghetti B, Tagliavini F, Masters CL, et al. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family. *Neurology*. 1989;39(11):1453-61.
10. Amano N, Yagishita S, Yokoi S, et al. Gerstmann-Straussler Syndrome - A Variant Type - Amyloid Plaques and Alzheimer's Neurofibrillary Tangles in Cerebral Cortex. *Acta neuropathologica*. 1992;84(1):15-23.
11. Boellaard JW, Doerr-Schott J, Schlote W. Miniplaques and shapeless cerebral amyloid deposits in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Acta neuropathologica*. 1993;86(5):532-5.
12. Tranchant C, Doh-Ura K, Steinmetz G, et al. [Mutation of codon 117 of the prion gene in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease]. *Rev Neurol (Paris)*. 1991;147(4):274-8.
13. Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, et al. A variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease carrying codon 105 mutation with codon 129 polymorphism of the prion protein gene: a clinicopathological study. *J Neurol Sci*. 1994 Dec 01;127(1):77-86.
14. Campbell TA, Palmer MS, Will RG, Gibb WRG, Luthert PJ, Collinge J. A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation in the prion protein gene. *Neurology*. 1996;46(3):761-6.
15. Capellari S, Vital C, Parchi P, et al. Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a basque family. *Neurology*. 1997;49(1):p.
16. Giaccone G, Mangieri M, Capobianco R, et al. Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*. 2008 Dec;29(12):1864-73.
17. Reiniger L, Lukic A, Linehan J, et al. Tau, prions and Abeta: the triad of neurodegeneration. *Acta neuropathologica*. 2011 Jan;121(1):5-20.
18. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Jul;118(1):5-36.

19. Pietri M, Dakowski C, Hannaoui S, et al. PDK1 decreases TACE-mediated alpha-secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. *Nat Med.* 2013 Sep;19(9):1124-31.
20. Beringue V, Herzog L, Reine F, et al. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerging infectious diseases.* 2008 Dec;14(12):1898-901.
21. Fischer M, Rüllicke T, Raeber A, et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 1996;15(6):1255-64.
22. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 1993;73:1339-47.
23. Haik S, Peyrin J, Lins L, et al. Neurotoxicity of the Putative Transmembrane Domain of the Prion Protein. *Neurobiology of disease.* 2000;Dec; 7 (6 Pt B):644-56.
24. Hannaoui S, Maatouk L, Privat N, Levavasseur E, Faucheux BA, Haik S. Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type. *J Virol.* 2013 Mar;87(5):2535-48.
25. Rezaei H, Marc D, Choiset Y, et al. High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *Eur J Biochem.* 2000 May;267(10):2833-9.
26. Rezaei H, Eghiaian F, Perez J, et al. Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *J Mol Biol.* 2005 Apr 1;347(3):665-79.
27. Eghiaian F, Daubenfeld T, Quenet Y, et al. Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 01;104(18):7414-9.
28. Simoneau S, Rezaei H, Sales N, et al. In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog.* 2007 Aug 31;3(8):e125.
29. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica.* 2002 Jan;103(1):26-35.
30. Schraen-Maschke S, Sergeant N, Dhaenens CM, et al. Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. *Biomark Med.* 2008 Aug;2(4):363-84.
31. Chiovitti K, Corsaro A, Thellung S, et al. Intracellular accumulation of a mild-denatured monomer of the human PrP fragment 90-231, as possible mechanism of its neurotoxic effects. *J Neurochem.* 2007 Dec;103(6):2597-609.
32. Corsaro A, Thellung S, Villa V, Nizzari M, Florio T. Role of prion protein aggregation in neurotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2012;13(7):8648-69.
33. Paludi D, Thellung S, Chiovitti K, et al. Different structural stability and toxicity of PrP(ARR) and PrP(ARQ) sheep prion protein variants. *J Neurochem.* 2007 Dec;103(6):2291-300.
34. Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature.* 2011 Feb 24;470(7335):540-2.
35. Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, et al. Prion neuropathology follows the accumulation of alternate prion protein isoforms after infective titre has peaked. *Nat Commun.* 2014 Jul 09;5:4347.
36. Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 2009 Mar;15(3):112-9.
37. Llorens-Martin M, Jurado J, Hernandez F, Avila J. GSK-3beta, a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci.* 2014;7:46.

38. Williams MR, Arthur JS, Balendran A, et al. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol*. 2000 Apr 20;10(8):439-48.
39. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
40. Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 2004 Feb;29(2):95-102.
41. Cheng X, Ma Y, Moore M, Hemmings BA, Taylor SS. Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):9849-54.
42. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J*. 2002;21(13):3317-26.
43. Caiati MD, Safiulina VF, Fattorini G, Sivakumaran S, Legname G, Cherubini E. PrPC controls via protein kinase A the direction of synaptic plasticity in the immature hippocampus. *J Neurosci*. 2013 Feb 13;33(7):2973-83.
44. Nordstrom E, Fisone G, Kristensson K. Opposing effects of ERK and p38-JNK MAP kinase pathways on formation of prions in GT1-1 cells. *FASEB J*. 2009 Feb;23(2):613-22.

Figures and Legends

Figure 1

PK digestion of the oligomeric forms of the recombinant PrPs.

PrP detection after a moderate PK digestion of oligomeric preparation of the various recombinant PrPs. Concentrations of PK were applied as ratio: 0= no PK; 1= 1:5000; 2=1:500; 3=1:100 and 4=1:50. Western blots were performed under denaturing conditions and revealed using 3F4, sha31 or SAF32 monoclonal anti-PrP antibody.

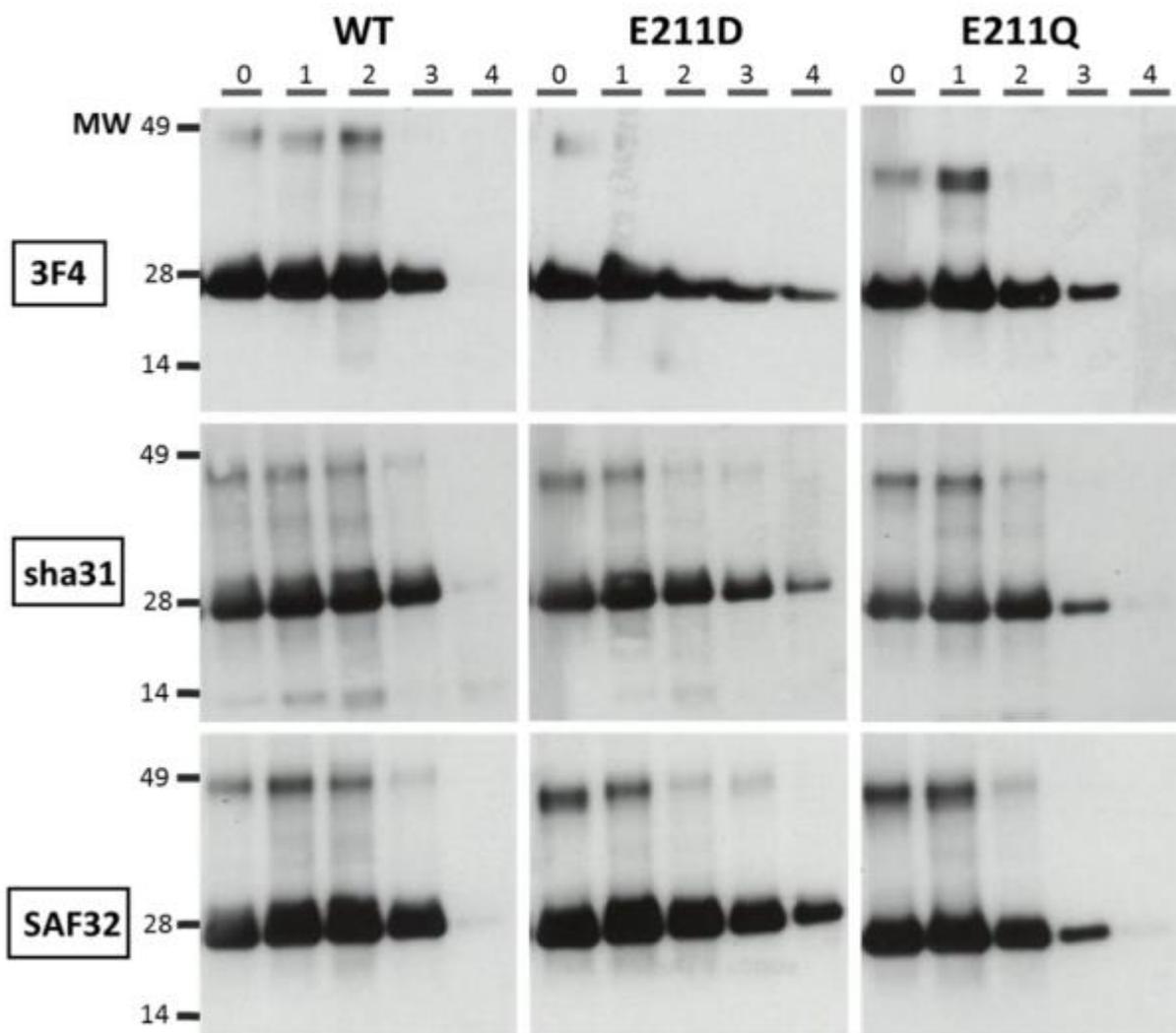


Figure 2

Electron microscopy analysis of monomeric and oligomeric preparations of recombinant PrPs.

Monomeric preparations of WT (**A**), E211D (**B**) and E211Q (**C**) PrPs, and oligomeric preparations of WT (**D**), E211D (**E**) and E211Q (**F**). As expected, no one shown protofibrillar or fibrillary structures.

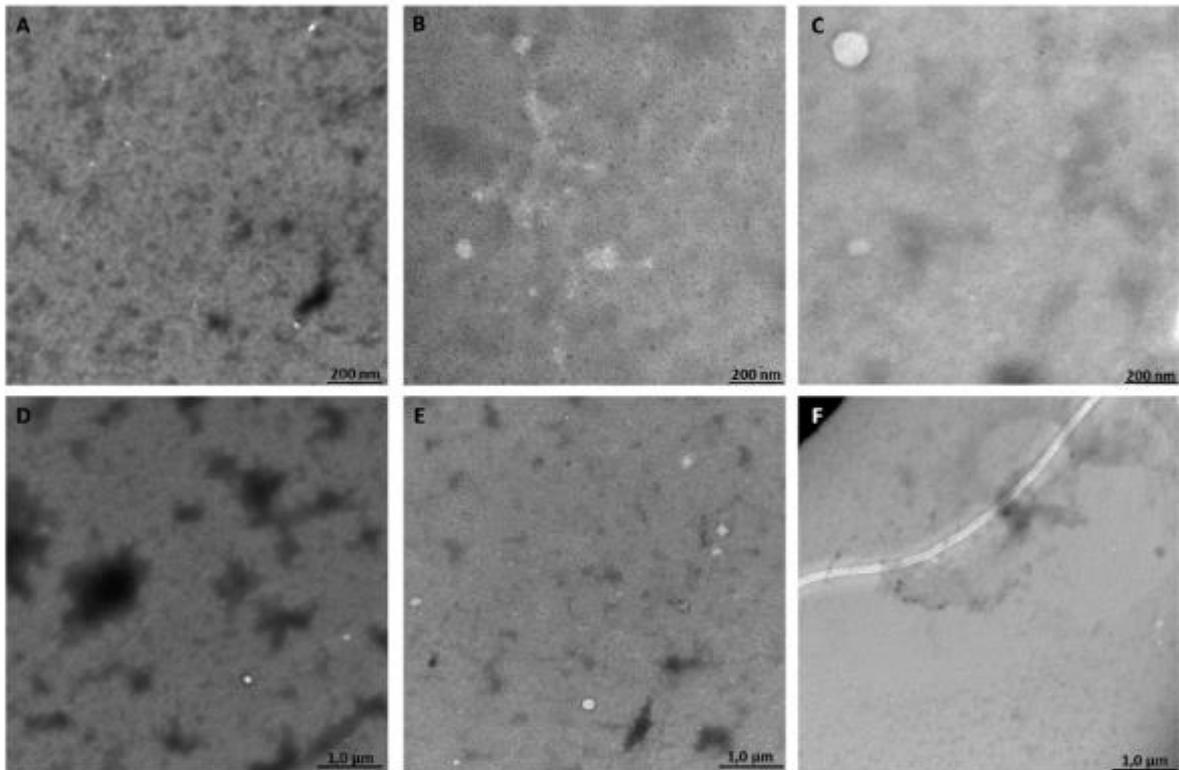


Figure 3

Size exclusion chromatography analyze of oligomeric preparations of recombinant mutant PrPs

The oligomerization propensity as analyzed by SEC indicated that both mutations tend to destabilize the native state and that E211D PrP has a higher propensity to aggregate, and forms more oligomers of bigger size.

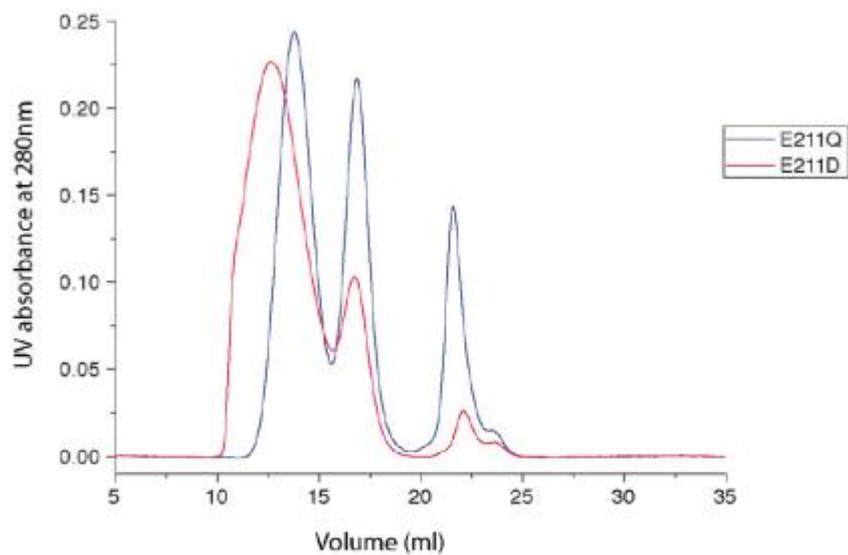


Figure 4

Immunostaining of tga20 cortical cultures exposed to recPrPs.

Representative pictures of tga20 cortical cultures after 9h of exposure to the oligomeric forms of recPrPs at 100µg/mL. Left pictures show pS262 immunostaining, arrows pointing to neuritic beads; middle pictures show the MAP2 immunostaining of neurons and right pictures show cell nuclei as stained by DAPI. Scale bar represents 50µm.

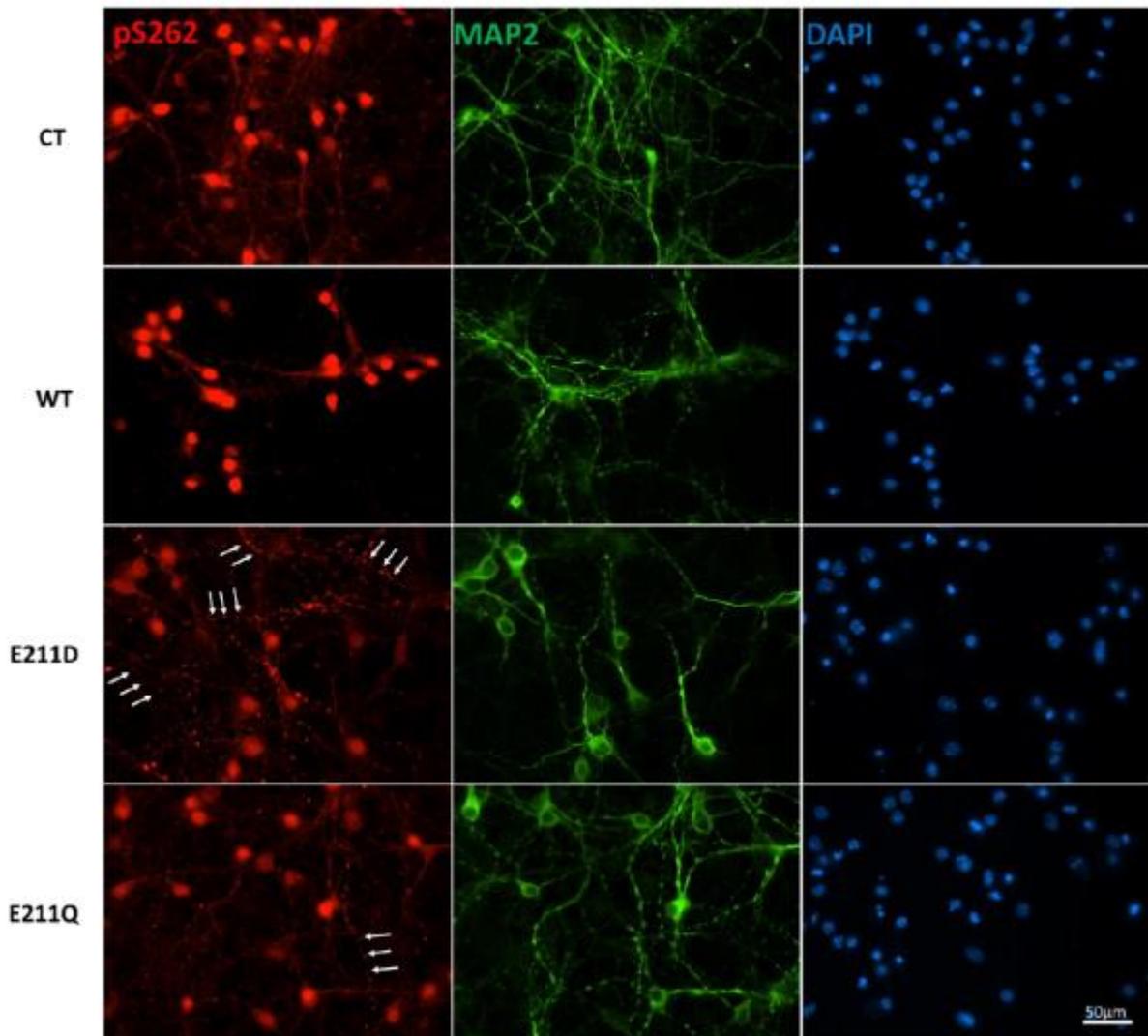


Figure 5

Level of tau pS262 phosphorylation in tga20 cortical cultures exposed to recPrPs.

Tga20 cortical cultures were exposed to recombinant PrPs as well as the vehicle MOPS (CT), in monomeric solutions during 9h at 50 μ g/mL (**A**) or 100 μ g/mL (**D**); or in oligomeric solutions during 4.5 at 50 μ g/mL (**B**) or 100 μ g/mL (**E**) and during 9h at 50 μ g/mL (**C**) or 100 μ g/mL (**F**). The number of neuritic beads pS262 positive were quantified and expressed relative to the control. Results show the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates. Differences from control values were significant at a p value of <0.05: *; p<0.01: **; p<0.0001: ****, determined by a Mann-Whitney test.

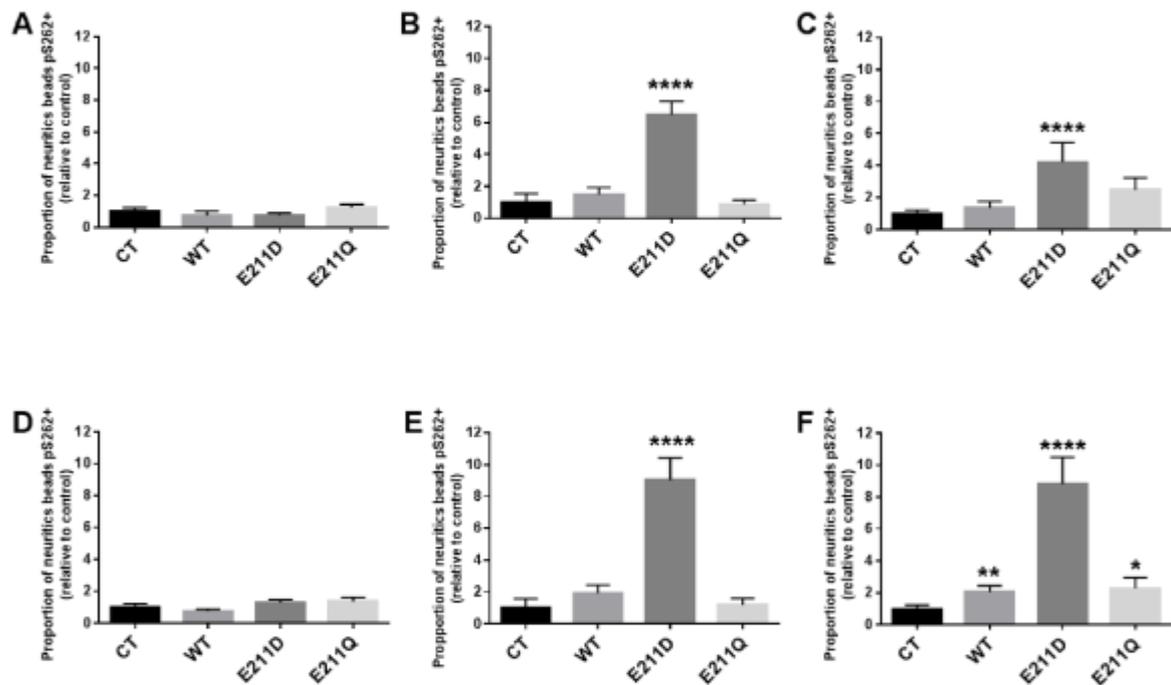


Figure 6

Level of tau pS262 phosphorylation in tg650 cortical cultures exposed to recPrPs.

Tg650 cortical cultures were exposed to recombinant PrPs as well as the vehicle MOPS (CT), in monomeric solutions during 9h at 50µg/mL (A) or 100µg/mL (D); or in oligomeric solutions during 4.5 at 50µg/mL (B) or 100µg/mL (E) and during 9h at 50µg/mL (C) or 100µg/mL (F). The number of neuritic beads pS262 positive were quantified and expressed relative to the control. Results show the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicates. Differences from control values were significant at a p value of <0.05: *; p<0.01: **; p<0.001 ***; p<0.0001: ****, determined by a Mann-Whitney test.

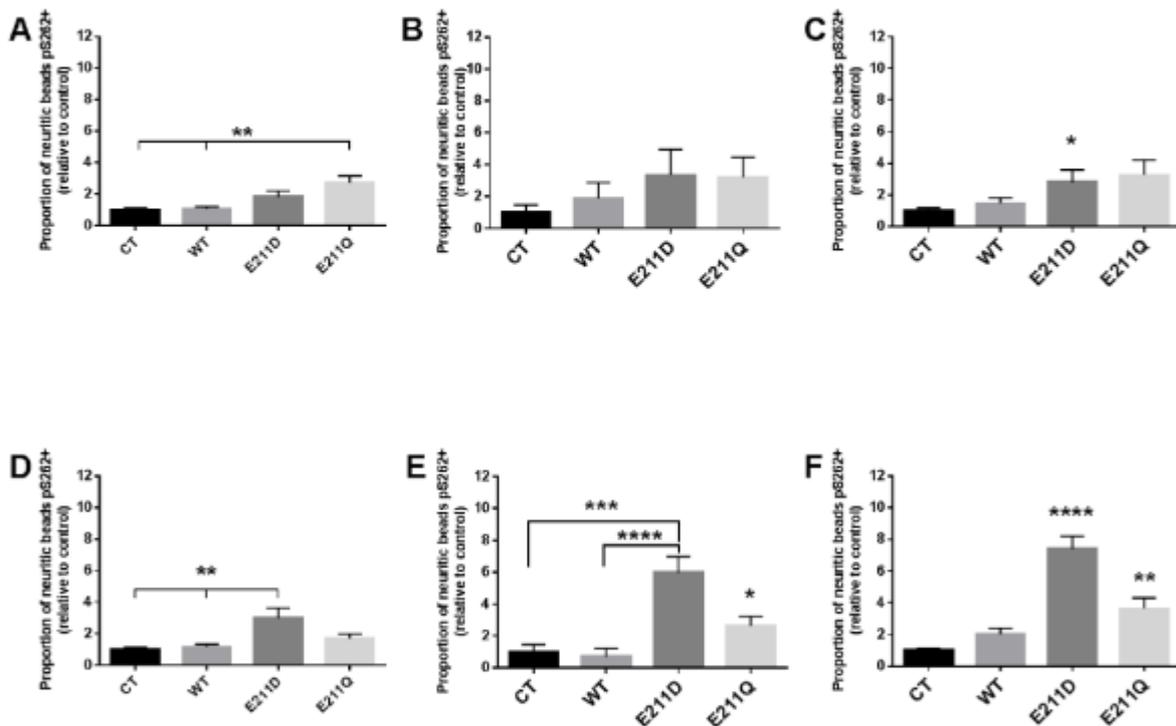


Figure 7

Level of tau pS262 phosphorylation in C57Bl/6 cortical cultures exposed to recPrPs.

C57Bl/6 cortical cultures were exposed to recombinant PrPs as well as the vehicle MOPS (CT), in oligomeric solutions during 4.5 at 50 μ g/mL (A) or 100 μ g/mL (C); or during 9h at 50 μ g/mL (B) or 100 μ g/mL (D). The number of neuritic beads pS262 positive were quantified and expressed relative to the control. Results show the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates. Differences from control values were significant at a p value of <0.05: *; p<0.01: **; p<0.001 ***; determined by a Mann-Whitney test.

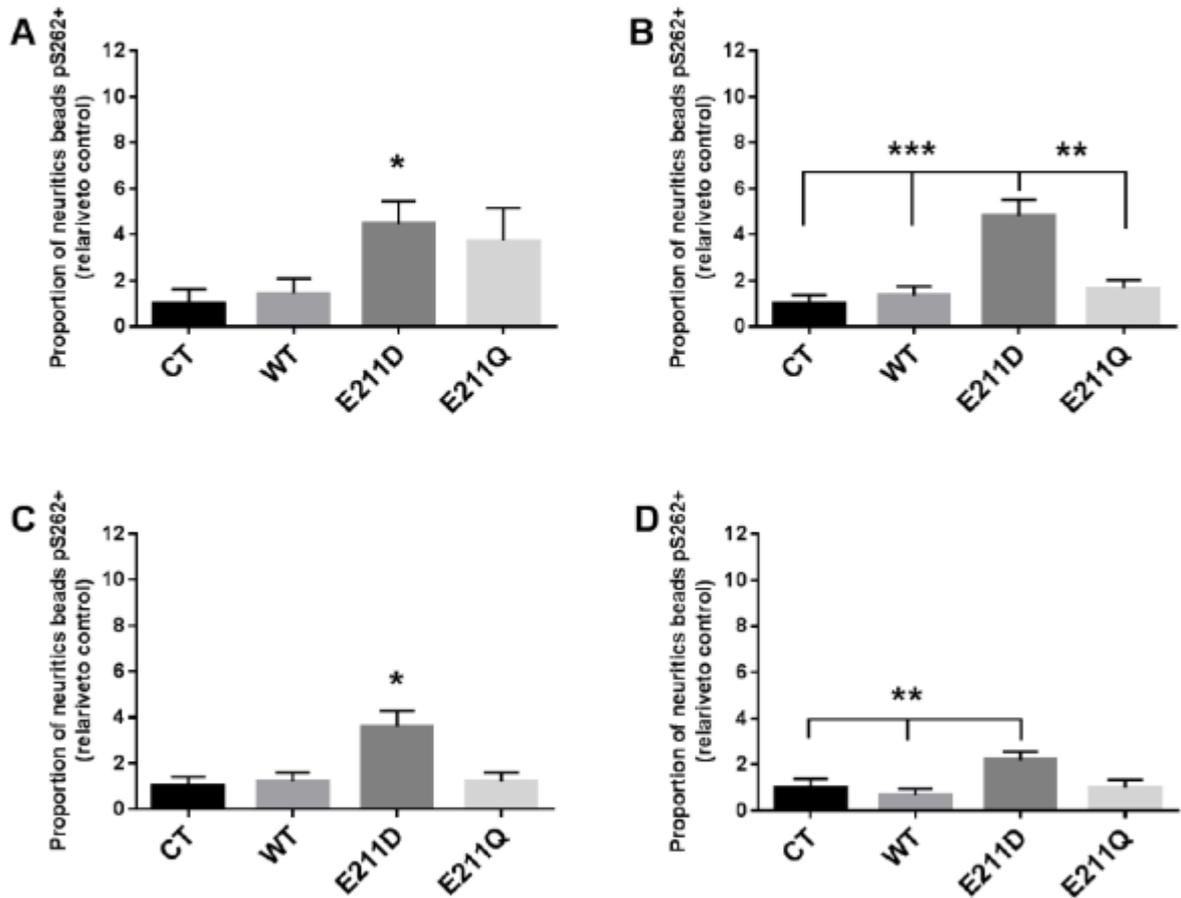


Figure 8

Levels of tau pS262 phosphorylation in PrP^{-/-} cortical cultures after exposure to recPrPs.

PrP^{-/-} cortical cultures were exposed to recombinant PrPs as well as the vehicle MOPS (CT), in oligomeric solutions during 4.5 at 50µg/mL (A) or 100µg/mL (C) and during 9h at 50µg/mL (B) or 100µg/mL (D). The number of neuritic beads pS262 positive were quantified and expressed relative to the control. Results show the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicates. Differences from control values were significant at a p value of p<0.0001: ****, determined by a Mann-Whitney test.

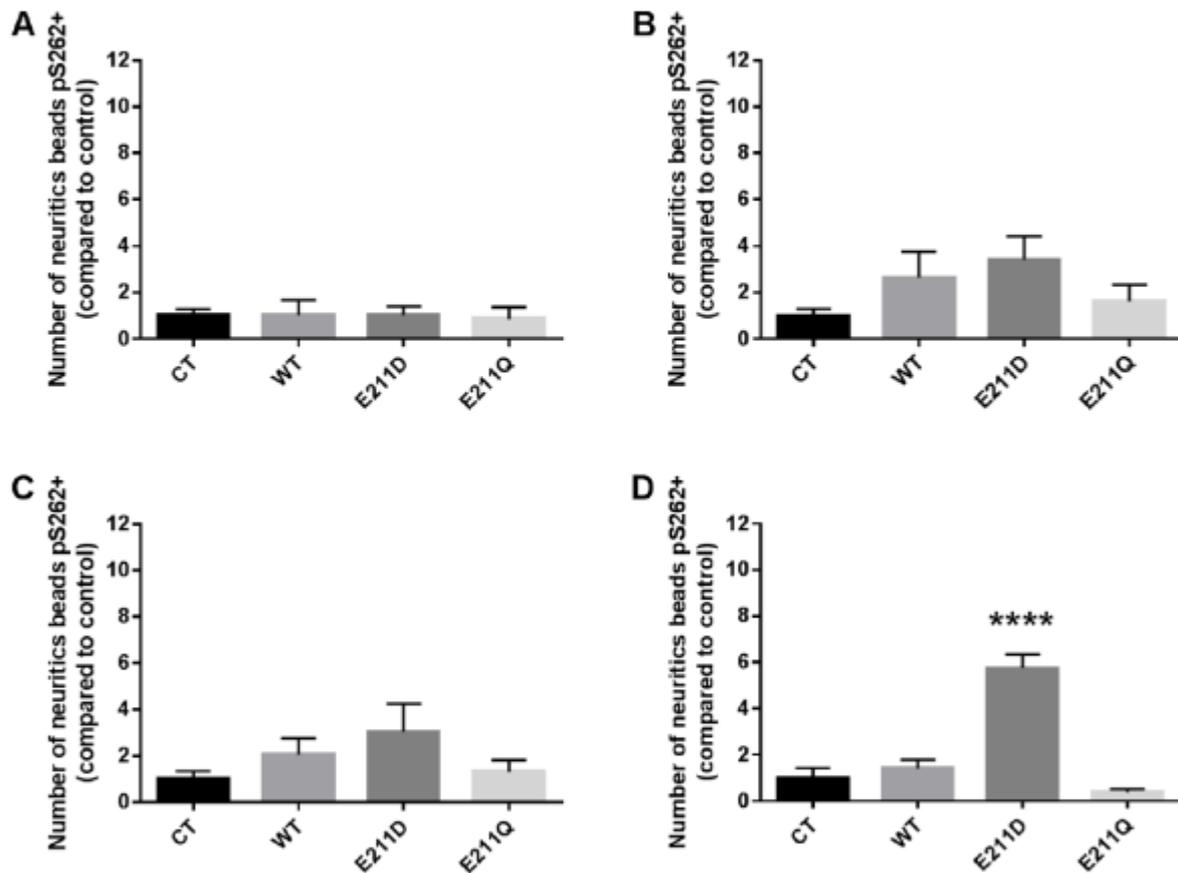


Figure 9

Cellular viability of tga20 cortical cultures after exposure to recPrPs.

Tga20 cell cultures were exposed to recombinant PrPs as well as the vehicle MOPS (CT), in monomeric solutions during 9h at 50 μ g/mL (**A**) or 100 μ g/mL (**D**); or in oligomeric solutions during 4.5 at 50 μ g/mL (**B**) or 100 μ g/mL (**E**) and during 9h at 50 μ g/mL (**C**) or 100 μ g/mL (**F**). The percentage of cellular viability was calculated relative to that of non treated cells (NT), in three independent experiments performed in sextuplicates.

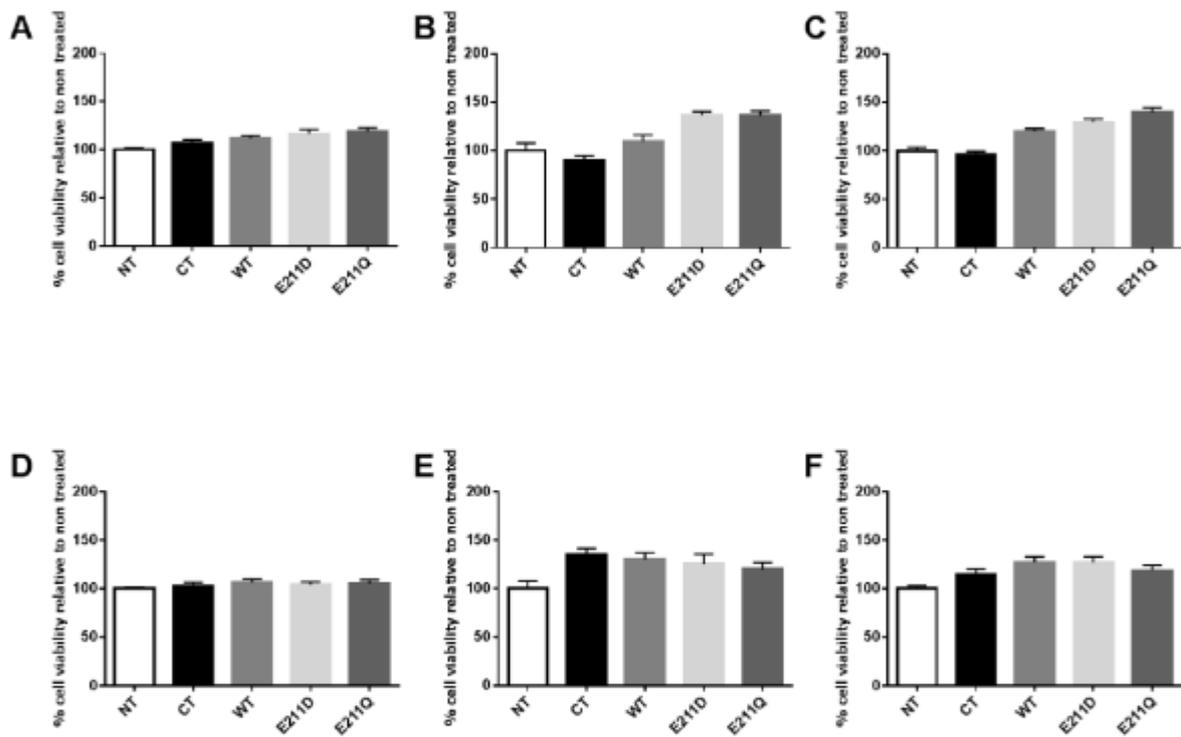


Figure 10

Cellular viability of C57Bl/6 cortical cultures after exposure to oligomers at 200µg/mL.

Cortical cultures from C57Bl/6 were exposed to recombinant PrPs in oligomeric forms at 200µg/mL, as well as vehicle MOPS alone (**CT**) during 36h. The percentage of viability was calculated relative to the control, in four independent experiments performed at least in triplicate. Curves represent mean \pm SEM. Differences from control values were significant at a p value of <0.05: *; p<0.01: **; p<0.001 ***; p<0.0001: ****, determined by a two way ANOVA test.

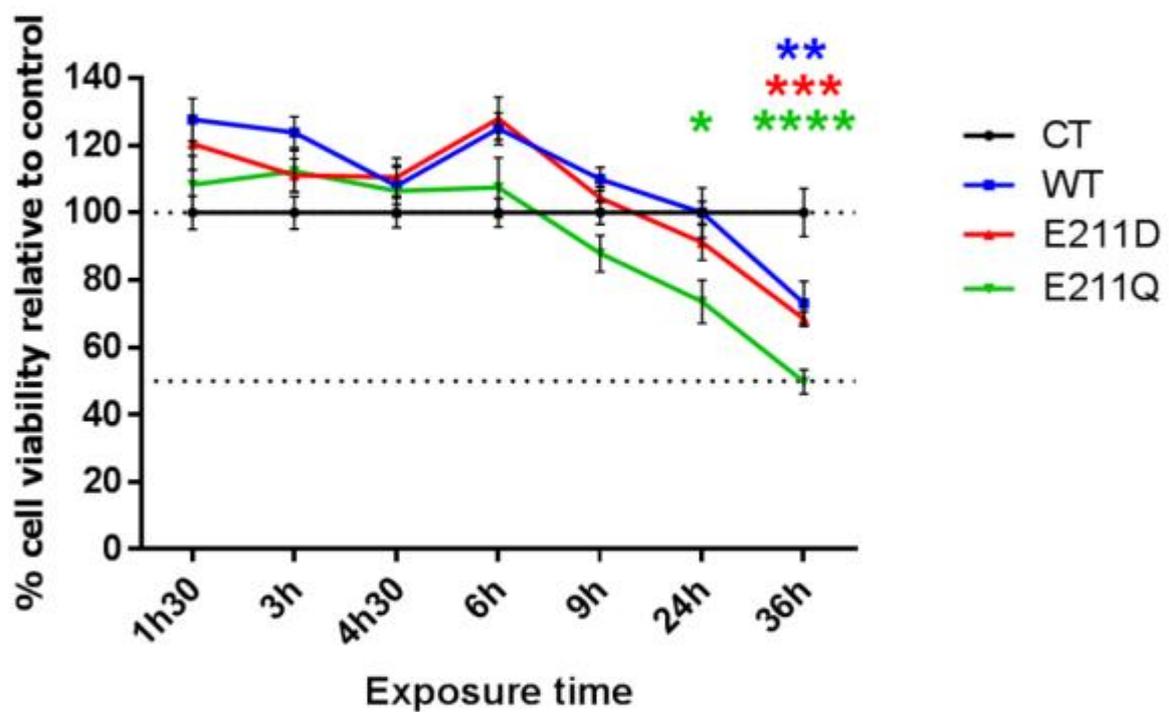
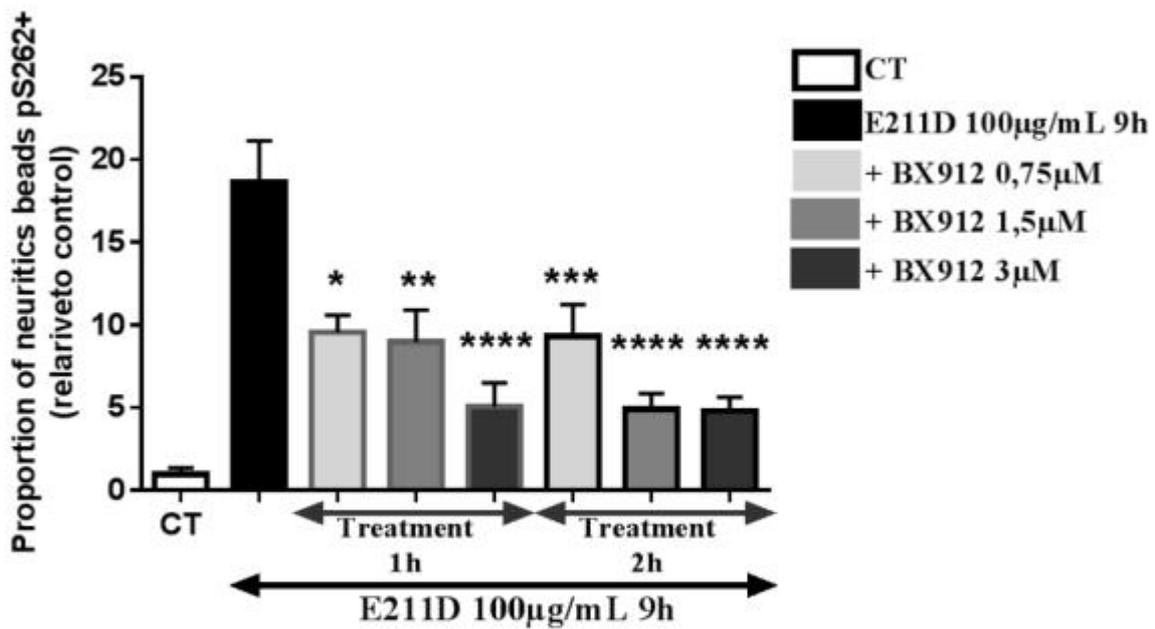


Figure 11

Effect of PDK1 inhibition on tau pS262 phosphorylation induced by E211D PrP oligomers in cortical cultures.

Tga20 cortical cultures were exposed to oligomeric form of E211D PrP or vehicle MOPS alone (CT) during 9h. The PDK1 inhibitor (BX912) was added 1h or 2h before the end of the exposure at different concentrations: 0.75; 1.5 or 3 μ M. Results represent the mean \pm SEM of the proportion of neuritic beads quantified relative to control, in three independent experiments realized in triplicates. Differences from E211D 100 μ g/mL values were significant at a p value of <0.05: *; p<0.01: **; p<0.001: ***; p<0.0001: ****, determined by a Mann-Whitney test.



Résultats complémentaires : modèle d'étude *in vivo* dans *Caenorhabditis elegans*

Grâce à une collaboration avec le laboratoire de Brian Kraemer à Seattle, nous avons pu obtenir une lignée transgénique de *C. elegans* exprimant la protéine tau humaine sauvage (Kraemer et al. 2003). L'expression de tau dans cette lignée est dirigée par le promoteur *aex-3*, ce qui signifie que son expression est pan neuronale. La protéine tau sauvage est l'isoforme 4R1N, possédant quatre répétitions du domaine de liaison aux microtubules (4R) et un insert N-terminal (1N). La forme 4R1N est la plus abondante dans le cerveau humain adulte. Cette lignée exprime également la GFP au niveau du pharynx, ce qui permet une visualisation rapide des animaux ayant intégré le transgène.

Dans notre laboratoire trois lignées ont été créées, exprimant à la fois la GFP et la PrP, wild-type, E211D ou E211Q. L'expression de la PrP et de la GFP est dirigée par le promoteur *pme-7*, ciblant les neurones mécanosensibles du ver.

Le croisement des lignées transgéniques tau et des lignées transgéniques PrP a permis l'obtention d'animaux co-exprimant les deux protéines d'intérêt. Les animaux montrant la double expression (pharynx et neurones mécanosensibles GFP positifs) ont été sélectionnés et leurs générations stabilisées.

Les travaux impliquant la construction des lignées ainsi que leur caractérisation ont été effectués au laboratoire par Nicolas Bizat, Valeria Parrales, Sofian Laoues et Sébastien Normant.

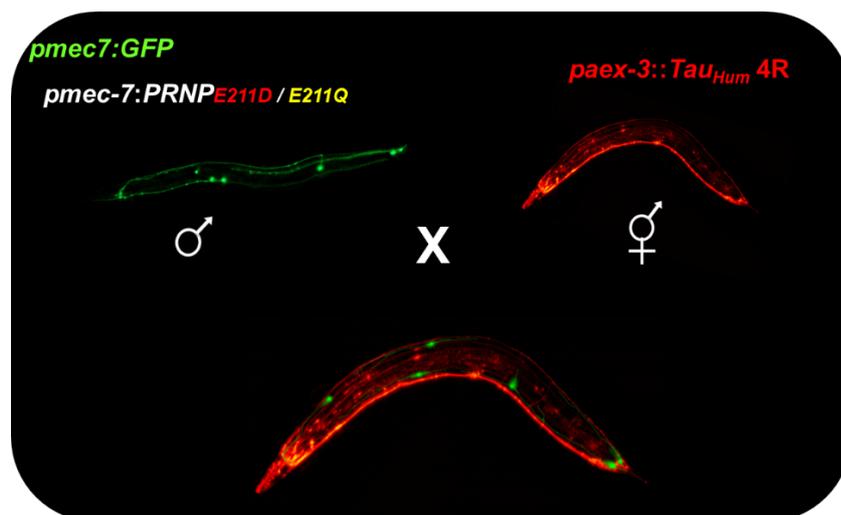


Figure 24 : Croisement de lignées et obtention d'animaux exprimant la protéine tau humaine dans tous les neurones et la PrP dans les neurones mécanosensibles.

Ces lignées sont d'un intérêt tout particulier puisqu'elles nous permettent d'observer, chez le même animal, des neurones co-exprimant les protéines tau et PrP (dans les neurones mécanosensibles) et des neurones jouant le rôle de contrôle interne, n'exprimant que la protéine tau.

Ces lignées ont été caractérisées, tout d'abord par qRT-PCR afin de sélectionner uniquement des lignées ayant des niveaux d'expression similaires pour les différentes protéines d'intérêt : GFP, tau et PrP (WT, E211D ou E211Q).

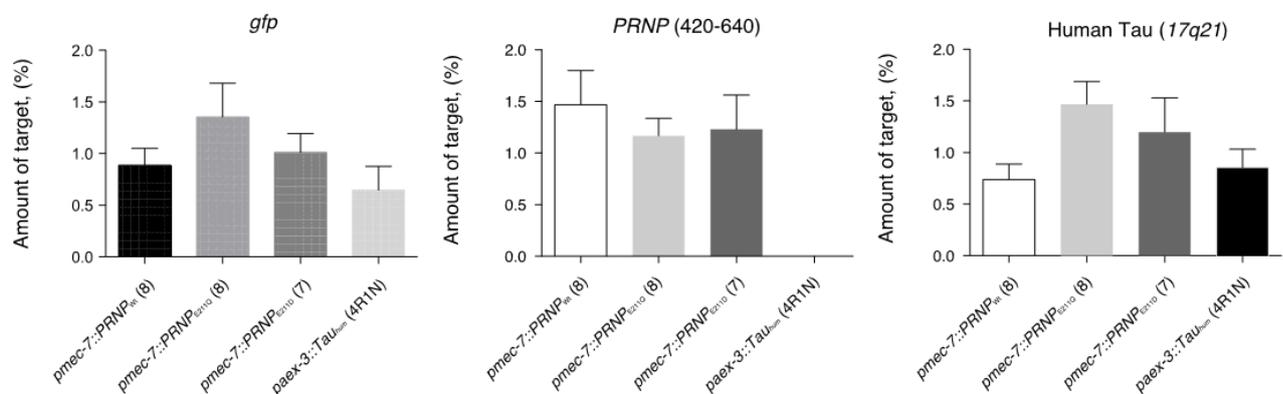


Figure 25 : Quantification par qRT-PCR des différents gènes d'intérêt.

Les résultats montrent la quantification de trois expériences indépendantes avec cinq extractions d'ARN réalisées systématiquement pour chaque lignée.

Une fois sélectionnées, ces lignées ont été séquencées pour le gène de la PrP et biochimiquement caractérisées en étudiant les profils de migration en western blot des différentes PrP exprimées. Les profils de migration obtenus étaient différents pour chaque mutation de *PRNP*, la PrP portant la mutation E211D présentant par exemple une bande de poids moléculaire plus élevée. Ces profils ne différaient pas entre les lignées exprimant la PrP seule ou en association avec la protéine tau.

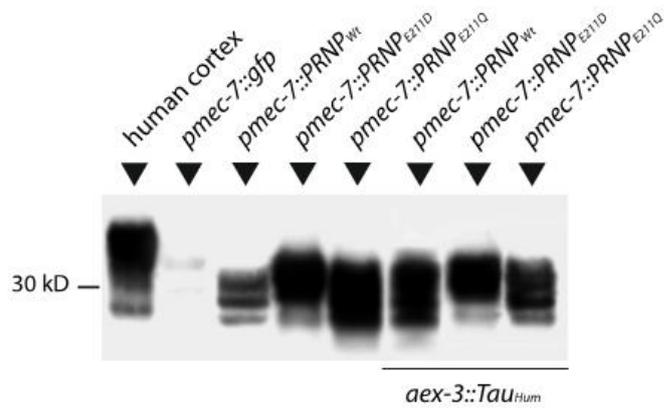


Figure 26 : Profils de migration de la PrP des différentes lignées *C. elegans*.

Profils électrophorétiques obtenus après détection de la PrP à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-PrP : sha31.

La résistance à la protéinase K de ces PrP exprimées dans le nématode a aussi été évaluée. Les échantillons d'extractions ont été soumis à une gamme de concentration de protéinase K avant leur analyse en western blot. Cette fois-ci encore, les profils obtenus sont différents selon la mutation, avec une résistance à la protéinase K plus élevée observée avec la PrP E211D.

Ces différences de profils suggèrent que les PrP mutées exprimées par les nématodes ont des conformations différentes.

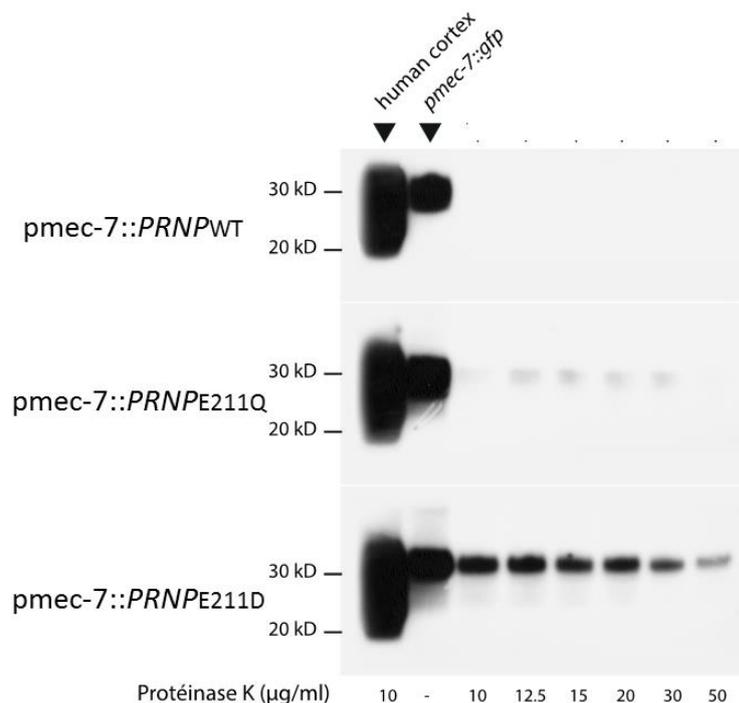


Figure 27 : Profils de migration après digestion à la protéinase K.

Profils électrophorétiques des PrP extraites des différentes lignées ayant été soumises à gamme de concentration de protéinase K, de 10 à 50µg/mL.

Mon travail au sein de ce projet était d'étudier les conséquences de l'expression des PrP mutées sur la protéine tau chez ces animaux.

Pour cela une étude de l'expression des transgènes par immunofluorescence a été effectuée. Plusieurs anticorps anti tau phosphorylée ont été utilisés: AT8 (pS202/pT205); CP13 (pS202); PHF-1 (pS396/pS404) et enfin pS262 reconnaissant la sérine 262 phosphorylée.

L'étude des images obtenues par microscopie en épifluorescence montrait qu'aucune hyperphosphorylation de tau n'a pu être détectée à l'aide des anticorps AT8 et CP13 dans ces modèles.

En revanche, un profil d'hyperphosphorylation de la protéine tau a pu être observé avec les anticorps PHF-1 et pS262. En effet, tandis que la phosphorylation de tau n'a pu être détectée dans les lignées de *C. elegans* n'exprimant pas la PrP, une hyperphosphorylation de tau apparaît dans les animaux exprimant une PrP mutée.

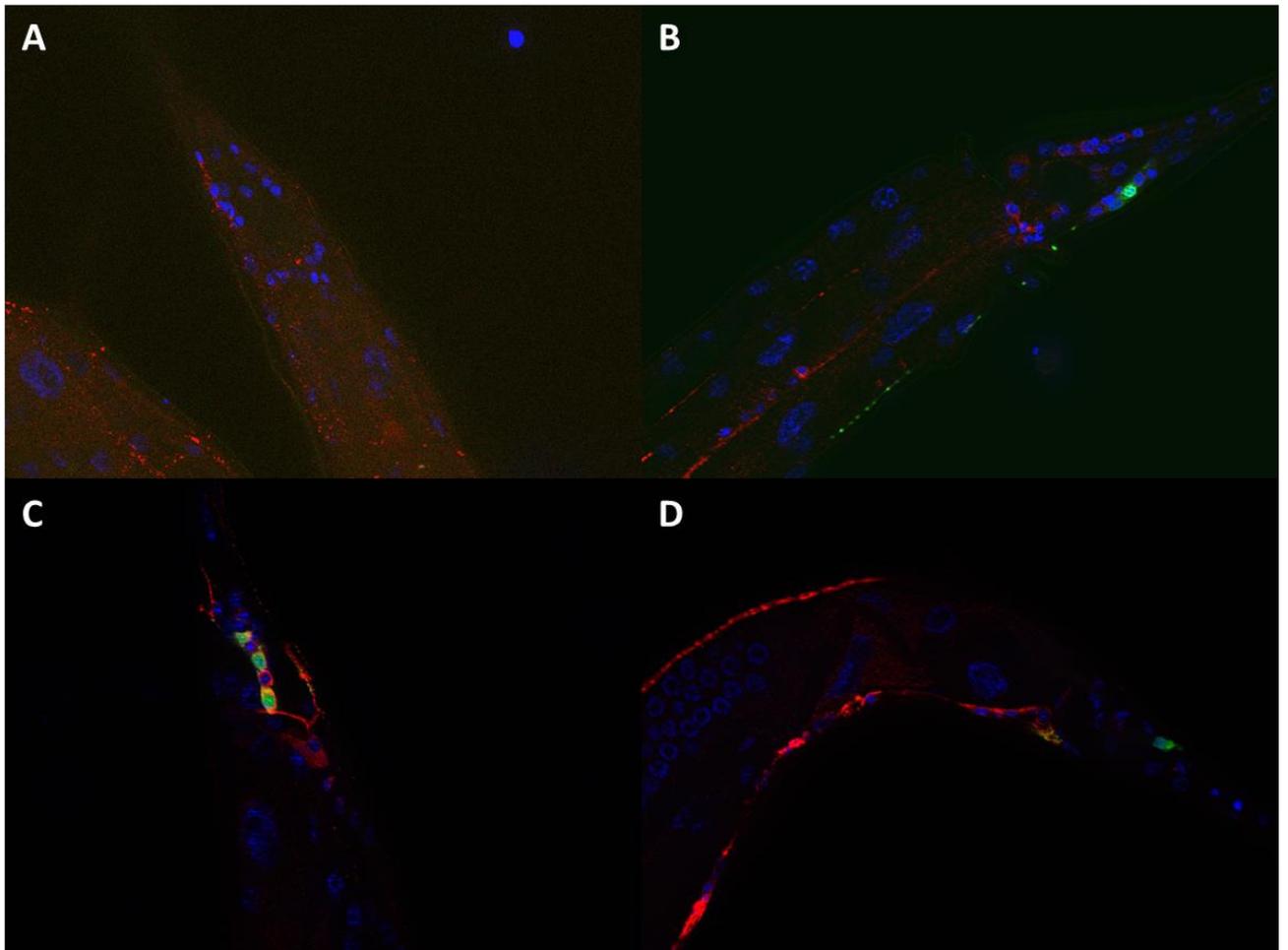


Figure 28 : Immunomarquage des lignées *C. elegans* à l'aide de l'anticorps PHF-1. Les différentes lignées : tau (A), tau x PrP WT (B), tau x PrP E211D (C) et tau x PrP E211Q (D) ont été soumises à un immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti tau phosphorylée PHF-1 (en rouge). Nous pouvons distinguer les neurones mécanosensibles grâce à la GFP (en vert), les noyaux sont marqués à l'aide de DAPI (en bleu).

Il nous faudra réitérer les expériences afin de pouvoir quantifier le nombre de neurones à la fois positifs pour la PrP et pour la phosphorylation de tau afin d'éventuellement mettre en évidence une différence de phosphorylation de tau selon la mutation de PrP exprimée.

Discussion

La pathologie tau est une des lésions cardinales dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Cette pathologie tau a également été décrite dans des formes familiales et infectieuses de maladies à prions humaines sans pathologie A β associée (Bautista et al. 2006; Giaccone et al. 2008; Reiniger et al. 2011).

Les objectifs de ces travaux étaient de caractériser l'impact de PrP recombinantes sur la physiopathologie de la protéine tau, afin de mieux caractériser la relation entre ces deux protéines et de déterminer quels conformères de PrP sont capables de déclencher ces anomalies de tau. Pour cela nous avons tiré avantage des mutations au codon 211 de la PrP qui ont été précédemment décrites par l'équipe (Peoc'h et al. 2012). La mutation E211D se manifeste par un GSS et engendre, au niveau du SNC, des lésions neurofibrillaires semblables à celles retrouvées dans la MA, ainsi que de nombreuses plaques amyloïdes. En revanche la mutation E211Q se manifeste par une maladie de Creutzfeldt-Jakob sans tauopathie associée.

Nous avons pu observer un effet des PrP recombinantes dans les cultures primaires de neurones corticaux. C'est à notre connaissance la première étude montrant un effet biologique *in vitro* de PrP recombinantes mutées. Cet effet se manifeste par la formation de renflements neuritiques pS262 positifs, ou « neuritic beads ». L'apparition de ces renflements neuritiques est décrite dans de nombreuses pathologies comme l'ischémie, l'épilepsie, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Takeuchi et al. 2005). Ces renflements seraient le reflet d'une toxicité ou d'une souffrance neuronale, et sont accompagnés d'une dysfonction mitochondriale ainsi que d'une déplétion cytosolique d'ATP (Greenwood et al. 2007). Leur présence est un témoin précoce de la dysfonction neuronale, notamment au niveau du transport, précédant la mort neuronale (Takeuchi et al. 2005). Cependant l'apparition de ces renflements semble être réversible et pourrait être un mécanisme de défense, leur formation ne mènerait donc pas systématiquement à la mort neuronale (Ikegaya et al. 2001; Greenwood et al. 2007). Les tests de viabilité cellulaire nous ont d'ailleurs permis de confirmer que l'apparition des renflements neuritiques n'était pas associée à une mort cellulaire à ces temps et doses d'expositions.

Nous avons observé un important effet des PrP recombinantes mutées sur la formation de renflements neuritiques tau pS262 positifs. Cet anticorps marque la protéine tau phosphorylée au niveau de la sérine 262 dès quelques heures d'exposition. Cet épitope est un

des sites majeurs de la phosphorylation de tau et sa phosphorylation a un effet majeur sur la liaison de la protéine tau aux microtubules (Biernat et al. 1993). Son marquage est associé aux « pre-tangle », soit les stades précoces de la pathologie tau au cours de la MA (Augustinack et al. 2002; Schraen-Maschke et al. 2008). Ainsi nos observations basées sur des expositions relativement courtes (moins de 12h) nous ont permis de détecter une phosphorylation de tau sur cet épitope. Au contraire, l'anticorps AT8, marqueur des dégénérescences neurofibrillaires et donc des stades plus tardifs de la pathologie de tau ,ne nous a pas permis de détecter une phosphorylation anormale au niveau de la sérine 202 et de la thréonine 205.

Nos résultats montrent que l'apparition de la phosphorylation anormale de tau dépend de la mutation portée par la PrP recombinante. En effet, l'exposition à une PrP mutée E211D est suffisante pour induire une phosphorylation anormale de tau, comparativement à l'exposition aux PrP WT et E211Q. Ceci est cohérent et corrèle parfaitement avec les données de neuropathologie retrouvées chez les patients porteurs de ces mutations (Peoc'h et al. 2012).

L'apparition des renflements neuritiques tau pS262 positifs est donc mutation dépendant mais nous avons pu observer qu'elle était aussi dépendante du type d'assemblages utilisés. Effectivement, la forme oligomérique des PrP recombinantes avait un impact plus important sur l'hyperphosphorylation de tau. Ces résultats sont en accord avec les données d'une étude précédente, décrivant un effet plus marqués des oligomères que des monomères sur la toxicité neuronale induite *in vitro* et *in vivo* (Simoneau et al. 2007). Nous avons d'ailleurs confirmé que les oligomères à forte dose (200µg/mL) pendant des temps d'exposition longs (jusqu'à 36h) avaient un effet délétère sur la survie cellulaire dans notre modèle de cultures. De façon intéressante nous avons observé une dissociation entre le conformère induisant une plus forte toxicité (E211Q) et celui aboutissant à l'augmentation de phosphorylation anormale de tau (E211D). Ceci laisse suggérer que l'hyperphosphorylation de tau n'entraîne pas, du moins dans les stades précoces, une toxicité accrue pour les neurones.

La différence observée dans les réponses provoquées par l'exposition à ces oligomères serait donc due à des assemblages de formes différentes selon les diverses PrP recombinantes. En effet, bien que les études de dichroïsme circulaire des PrP WT, E211D et E211Q montrent que les structures secondaires de ces PrP ont des répartitions identiques, les études de dynamique moléculaire et de chromatographie à exclusion stérique ont montré que la PrP E211D a une plus forte propension à former des oligomères de plus grande taille

comparativement aux PrP WT et E211Q (Peoc'h et al. 2012). Ceci serait dû à une stabilité moindre de la première hélice α de la PrP E211D. Nos données montrent que les oligomères de PrP E211D sont plus résistants à cette digestion, ce qui suggère également une différence de structure. L'ensemble de ces résultats est en faveur de l'accumulation, chez les patients atteints de GSS associé à la mutation E211D, d'assemblages spécifiques de PrP mal conformée, capables, une fois libérés dans l'espace extracellulaire, de déclencher chez les neurones environnementaux une phosphorylation anormale de la protéine tau.

Les effets que nous avons observés sont accentués dans les lignées surexprimant la PrPc. L'effet des oligomères mutés de PrP serait donc partiellement dépendant du niveau d'expression de la PrPc. Cependant, l'exposition des cultures neuronales issues de souris KO pour la PrPc a aussi montré une augmentation du nombre de renflements neuritiques pS262 positifs. Cet effet, associé à la mutation E211D, n'a pu être mis en évidence qu'à la plus forte concentration et au plus long temps d'exposition. Ceci suggère que la ou les voies activées menant à l'hyperphosphorylation de tau dans ces cultures sont des voies accessoires, contrairement à la voie passant par la PrPc dans les autres cultures.

Nous avons donc pu voir que l'effet de la PrP E211D sur la phosphorylation anormale de tau était en partie dépendant de la PrPc. Or il a été rapporté récemment qu'une voie de signalisation PrPc-dépendante était impliquée aussi bien lors des maladies à prions que lors de la MA, c'est la voie passant par l'activation de PDK1 (Pietri et al. 2013). Nous avons donc choisi d'explorer cette voie en utilisant un inhibiteur de PDK1 dans les cultures exposées à des oligomères de PrP E211D. L'inhibition de cette kinase a entraîné une très forte diminution des renflements neuritiques pS262 positifs observés. La phosphorylation anormale de tau dans notre modèle serait donc due à une activation de la kinase PDK1 suite à l'interaction d'oligomères de PrP E211D avec la PrPc. La PrPc a aussi été démontrée comme impliquée dans la toxicité neuronale induite par A β en jouant le rôle de récepteur pour ce peptide (Lauren et al. 2009). Il est possible que l'interaction de l'A β avec la PrPc entraîne les mêmes modifications sur la phosphorylation de tau que l'interaction d'oligomères de PrP E211D avec la PrPc. Une étude a d'ailleurs montré que l'exposition de cultures primaires de neurones hippocampaux de rats à des dimères d'A β , extraits et purifiés à partir de cerveaux atteints de MA, entraînait une désorganisation des microtubules ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de tau, détectable par les anticorps pS262 et AT8 (S202/T205) (Jin et al. 2011). Ainsi un mécanisme d'action commun entre ces deux pathologies serait l'interaction

d'oligomères de peptide amyloïde avec la PrPc transmembranaire, aboutissant à l'activation de PDK1 et la phosphorylation anormale de tau. Les deux kinases communes dans la phosphorylation de tau sur les épitopes S262, S202 et T205 sont les kinases GSK3 β et PKA (cAMP-dependent protein kinase) (Wang and Liu 2008; Hanger, Anderton, and Noble 2009). Lorsque PDK1 est activé, il entraîne la phosphorylation de GSK3 β en sérine 9, et donc son inactivation, par la kinase Akt (Hernandez et al. 2010). La phosphorylation anormale de tau suite à l'activation de PDK1 serait alors due à l'action de la PKA. En effet PDK1 sous sa forme active est capable de phosphoryler et donc d'activer la PKA (Cheng et al. 1998).

L'ensemble de ces données nous a donc permis de mettre en avant l'effet assemblage dépendant et partiellement PrPc dépendant de peptide amyloïde sur la phosphorylation anormale de tau. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec les types de lésions retrouvées en neuropathologie chez les patients porteurs des mutations E211. Cette étude nous a aussi permis de mettre en avant l'implication d'une nouvelle voie impliquée dans la phosphorylation anormale de tau en réponse à la présence de peptide amyloïde, passant par l'activation de PDK1. L'exploration et l'inhibition de cette voie dans des modèles de maladie à prions associée à une tauopathie ou de MA pourra permettre de mieux comprendre les processus lésionnels engendrés par la relation peptide amyloïde-tau.

Perspectives

Les perspectives de ce travail seront de pouvoir confirmer les effets observés *in vitro* dans un modèle *in vivo* à l'aide de lignées *C. elegans* triple transgéniques (GFP-PrP-tau). Ces lignées nous permettront de cibler l'effet des mutations de PrP dans une population particulière de neurones et ainsi de mieux caractériser la relation PrP-tau. L'usage d'ARN interférents ou d'animaux déplétés en PDK1 pourrait nous permettre d'explorer la voie de signalisation impliquant PrPc/PDK1/tau.

Une autre approche *in vivo* serait l'injection stéréotaxique d'oligomères de PrP recombinantes, en utilisant des lignées murines ayant des niveaux différents d'expression de la PrPc. Nous pourrions ainsi confirmer nos résultats obtenus *in vitro*, en évaluant la toxicité et la dysfonction neuronale induite par les différentes mutations au niveau cérébral.

Au niveau cellulaire, il nous faudra valider la voie de signalisation impliquant PDK1 dans la phosphorylation de tau induite par les PrP mutées. Une attention toute particulière sera portée à l'étude des partenaires de PDK1, en étudiant notamment les modifications des kinases Akt et PKA.

Il pourrait aussi être intéressant d'étudier l'infection de cultures neuronales primaires à l'aide d'homogénats de cerveaux humains atteints d'une maladie à prions associée à une tauopathie (vCJD par exemple, voir la deuxième partie des résultats). Nous étudierons si cette infection, au-delà de la propagation de l'agent infectieux, entraînerait une hyperphosphorylation de la protéine tau et si cette phosphorylation anormale pourrait être inhibée par des inhibiteurs de PDK1.

Afin de confirmer le rôle de PDK1 dans la phosphorylation anormale de tau induite par l'accumulation de protéines amyloïdes dans l'espace extracellulaire, les effets de ces inhibiteurs pourraient être évalués dans des modèles *in vitro* de maladie d'Alzheimer. La technologie récente de cultures en trois dimensions à partir de cellules souches neurales humaines, portant des mutations de MA familiale sur le gène du précurseur du peptide amyloïde A β (APP) et sur le gène de la préséniline (PS1) semble un bon modèle pour évaluer ce traitement (Choi et al. 2014; D'Avanzo et al. 2015). En effet ce modèle *in vitro* permet l'observation à la fois d'accumulation d'A β avec la formation de plaques amyloïdes, mais aussi de hauts niveaux d'hyperphosphorylation de tau et la présence de protéine tau sous forme fibrillaire. L'inhibition de PDK1 ayant déjà montré des effets bénéfiques sur l'accumulation d'A β dans un modèle *in vivo* de MA (sans pathologie tau associée), son évaluation dans ce système combinant les deux caractéristiques neuropathologiques de cette maladie serait extrêmement intéressante.

PARTIE 2

Introduction

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction générale, de nombreux composés ont été évalués pour leurs effets anti-prion mais aucun n'a à ce jour démontré une efficacité en clinique humaine. Une des étapes essentielles dans le développement de ces composés est de pouvoir tester leurs effets sur des souches humaines, dans des systèmes de criblage *in vitro* plus prédictifs que ceux utilisant des souches de tremblante par exemple.

La première étude de cette partie thérapeutique s'est concentrée sur la mise en place d'un modèle cellulaire permettant la propagation d'isolats humains. Nous avons utilisé des cultures primaires de neurones en grains du cervelet (CGN) issus de souris sauvages C57BL/6 ou de souris transgéniques tg650 surexprimant de la PrPc humaine, méthionine au niveau du codon 129, ces souris étant susceptibles à différentes souches humaines de prion (Beringue et al. 2008). Les CGN exprimant une PrP murine ou humaine, propageant respectivement des souches de tremblantes expérimentales (139A, ME7 ou 22L) ou des souches humaines (MCJ sporadique, vMCJ ou iMCJ) ont été utilisés pour tester l'effet des cyclines (tetra-, mino- et doxycycline) sur l'accumulation de PrPres dans les cultures infectées. En effet ces composés ont démontré à plusieurs reprises leur action anti-prion, aussi bien *in vitro* en diminuant les titres infectieux de tissus infectés ou en diminuant la toxicité induite par le peptide 106-126, que *in vivo* chez des hamsters inoculés par une souche de tremblante (Tagliavini et al. 2000; Forloni et al. 2002; De Luigi et al. 2008).

Cette étude a permis:

- 1) pour la première fois, de propager des isolats humains de maladie à prions dans un modèle cellulaire (neurones primaires, issus de souris transgéniques surexprimant de la PrPc humaine), sans passage préalable sur un modèle animal.
- 2) de montrer que l'efficacité des cyclines vis-à-vis de ces isolats humains et des souches animales variait d'une cycline à l'autre et selon l'agent considéré.

Résultats

Article 2 :

Cycline Efficacy on the Propagation of Human Prions in Primary Cultured Neurons is Strain-Specific

Samia Hannaoui, Alexianne Gougerot, Nicolas Privat, Etienne Levavasseur, Nicolas Bizat, Jean-Jacques Hauw, Jean-Philippe Brandel, and Stéphane Haïk

Cycline Efficacy on the Propagation of Human Prions in Primary Cultured Neurons is Strain-Specific

Samia Hannaoui,^{1,2,3,4} Alexianne Gougerot,^{1,2,3,4} Nicolas Privat,^{1,2,3,4} Etienne Levavasseur,^{1,2,3,4} Nicolas Bizat,^{1,2,3,4,5} Jean-Jacques Hauw,^{4,6} Jean-Philippe Brandel,^{1,2,3,4,7} and Stéphane Haik^{1,2,3,4,6,7}

¹Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (CRICM), UMR5 975, Equipe "Alzheimer's and Prion Diseases", ²INSERM, U 975, ³CNRS, UMR 7225, ⁴Centre National de Référence des Agents Transmissibles Non Conventionnels, Hôpital de la Salpêtrière, ⁵Université Paris Descartes, Université Paris 5, ⁶AP-HP, Laboratoire de Neuropathologie, Hôpital de la Salpêtrière, and ⁷AP-HP, Cellule Nationale de Référence des MCJ, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France

In prion diseases, a major issue in therapeutic research is the variability of the effect between strains. Stimulated by the report of an antiprion effect in a scrapie model and by ongoing international clinical trials using doxycycline, we studied the efficacy of cyclines against the propagation of human prions. First, we successfully propagated various Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) isolates (sporadic, variant, and iatrogenic CJD) in neuronal cultures expressing the human prion protein. Then, we found that doxycycline was the most effective compound, with important variations between isolates. Isolates from sporadic CJD, the most common form of prion disease, showed the highest sensitivity.

Keywords. Creutzfeldt-Jakob disease; isolates; prion; strain; treatment.

Human prion diseases, among which Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is the most common, are incurable transmissible diseases characterized by the accumulation of a misfolded isoform (PrP^{Sc}) of the endogenously expressed cellular prion protein (PrP^C). According to the "protein only" hypothesis [1], the transmissible agent is thought to be solely composed of PrP^{Sc} and propagates by converting PrP^C into PrP^{Sc}, which is prone to aggregation and partially resistant to proteinase K (PK).

Digestion of PrP^{Sc} with PK generates a resistant fragment called PrP^{res}. This group of fatal diseases is highly heterogeneous and includes sporadic, infectious, and genetic forms among which a limited number of human prion strains have been identified [2].

Few antiprion compounds such as quinacrine and pentosan polysulfate showed a therapeutic activity in vivo and in vitro, but none was proven effective in humans. A major issue in therapeutic research is the variability of the antiprion effect between strains [3]. It is thus of high interest to validate the efficacy of antiprion compounds that are proposed for clinical application toward human strains. Recently, based on the ability of cyclines to bind and to revert the protease resistance of PrP^{Sc}, to reduce the infectivity titer in tissues from prion-infected animals, and to prolong the survival of hamsters infected with an experimental scrapie strain [4–6], a treatment by doxycycline was proposed in observational studies in Italy and Germany. Encouraging results motivated an ongoing double-blind doxycycline versus placebo international trial in Italy, Germany, and France despite the absence of experimental data supporting an effect on the propagation of human prion strains. Prompted by these developments, we aimed to evaluate the efficacy of cyclines (tetra-, mino-, and doxycycline) against the propagation of sporadic, variant, and iatrogenic CJD prions. We thus infected primary cultures of cerebellar granule neurons (CGNs) derived from tg650 and tg152 transgenic mice expressing human PrP^C, with a methionine or a valine at codon 129 [7, 8], using different CJD isolates. We found that cyclines were effective against prion propagation in CJD-infected cells in a strain-specific manner.

MATERIALS AND METHODS

Primary Neuronal Cells Cultures

CGNs were mechanically extracted from the cerebellum of 6- to 7-day-old tg650 (CGN^{Hu-Met129}) or tg152 (CGN^{Hu-Val129}) mice that are known to be susceptible to various human prion isolates in vivo, or C57BL/6 (CGN^{Mo}) wild-type mice, and enzymatically dissociated as described [9, 10]. Cells were plated on plastic culture wells precoated with 10 µg/mL poly-d-lysine (Sigma-Aldrich, France). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium–Glutamax I high glucose (Life Technologies-Gibco, France) supplemented with penicillin and streptomycin (Life Technologies), fetal calf serum (Life Technologies), potassium chloride (Sigma-Aldrich), and N2 and B27 supplements (Life Technologies). Supplementation by penicillin and streptomycin are required for long-term primary

Received 16 June 2013; accepted 3 October 2013; electronically published 21 November 2013.

Correspondence: Stéphane Haik, MD, PhD, ICM, G-H Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013, Paris, France (stephane.haik@upmc.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2014;209:1144–8

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jit823

neuronal cultures with repeated interventions, and both antibiotics are not known to have any antiprion properties in cellular or animal models and are not known to directly interact with cyclines. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Every week, the medium was supplemented with glucose (1 mg/mL); in addition, the antimetabolites uridine and fluorodeoxyuridine (10 μM) (Sigma-Aldrich) were added to reduce astrocyte proliferation.

Prion Infection

Infectious tissues were prepared from the brain of patients with sporadic (sCJD^{MM1}, sCJD^{VV2a}), variant (vCJD^{MM2b}), or iatrogenic (iCJD^{MM1}) Creutzfeldt-Jakob disease. Tissues were selected from the archival brain specimen of the French National Neuropathology Network for CJD on the basis of the availability of autopsy-retained frozen brain material and informed consent from patients' relatives for autopsy and research use, according to the French regulation (L.1232-1 to L.1232-3, Code Santé Publique). Patients were methionine (MM) or valine (VV) homozygous at codon 129 of *PRNP* and had brain PrP^{res} of type 1, 2a, or 2b. Control homogenate was prepared with the brain of an MM patient dead from a nonprion and nonneurodegenerative disease. Primary neuronal cultures were exposed to sonicated brain homogenates 48 hours after plating for 4 days [10]. Then, the medium was removed from the cultures, cells were carefully rinsed twice, and fresh medium was added. This ascertains that further increases in the PrP^{res} signal corresponded to newly synthesized PrP^{res} [10]. Our CGN cultures exposed to brain homogenates can be maintained for 5 weeks after plating.

PrP^{res} Detection

At different days postexposure (dpe), cells were lysed, protein concentration of each cell lysate was quantified, PK digestion and Western blotting were performed as described [10] using the anti-PrP monoclonal antibody 3F4 (IgG2a, epitope 109–112, Eurogentec, France) in CGN^{Hu} or 6D11 (IgG2a, epitope 93–109, Eurogentec) in CGN^{Mo} and revealed using an electrochemiluminescence kit. PrP^{res} levels were semiquantified with a GS-800 calibrated densitometer and dedicated Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, France). Values for the 3 PrP^{Sc} glycoforms were measured on blots with unsaturated signals and summed [11].

Immunofluorescence Experiments

Cultures were fixed, then treated with 3M guanidine thiocyanate (Sigma-Aldrich, France) to expose aggregated forms of prion protein (PrP). PrP was detected with the anti-PrP monoclonal antibody Sha31 (IgG1, epitope 148–159, SPI-Bio, France) [10]. Immunolabeling was observed using a Zeiss Axiovert 200 epifluorescence microscope. Images from 4 independent experiments performed in triplicates were acquired under

the same conditions, and threshold levels were maintained constant across all images to avoid artifacts. We quantified the number, the total signal intensity, and the size of PrP aggregates in 30 images for each condition using CellProfiler software as previously described [10, 12].

Cycline Treatment

From 14 to 28 dpe, infected cultures were treated every 4 days with various concentrations of tetracycline, minocycline, doxycycline (Sigma-Aldrich), or with vehicle only. Cells were lysed for PrP^{res} detection or fixed for PrP immunofluorescence on day 28. In some experiments, a 48-hours treatment was applied from 26 to 28 dpe (see Supplementary Figure 1).

Statistical Analysis

StatView software (version 5; SAS Institute Inc., Cary, NC) was used. We used a Mann-Whitney test to compare 2 groups and 1-way analysis of variance (Dunnett's test) to compare treatments to controls (immunofluorescence experiments).

RESULTS

CGN cultures derived from mice expressing human PrP (CGN^{Hu}) showed a progressive accumulation of PrP^{res} after exposition to human prion isolates (Figure 1A). This result is the first evidence of human prion propagation in a cellular model without a prior *in vivo* passage of the agent in transgenic mice. Human prion propagation was observed in late kinetics points compared to CGNs infected with experimental scrapie strains adapted to the mouse [10]. PrP^{res} accumulation was associated with the detection of PrP aggregates in infected cells as described in CGNs infected with various scrapie strains [9, 10].

Our study primarily focused on doxycycline that is of immediate clinical interest. First experiments showed that the effect of doxycycline against sCJD^{MM1} prion propagation increased from 0.5 μM to 1 μM and remained maximal until 10 μM (Figure 1B upper and middle panels), these concentrations being well tolerated. Higher concentrations of doxycycline, minocycline, and tetracycline reduced significantly cell viability in neuronal cultures infected or not by prion strains (data not shown). All further treatment experiments were thus performed at the final concentration of 10 μM. We observed reliable and significant variability of drug efficiency according to the cycline compound and to the prion isolate used for infection. Interestingly, doxycycline treatment showed an obvious and highly significant effect on PrP^{res} accumulation in CGN^{Hu-Met129} infected with sCJD^{MM1} and to a lesser extent in CGN^{Hu-Val129} infected with sCJD^{VV2a} (Figure 1B lower panel, 1C). Minocycline had a lesser but still significant effect, and tetracycline showed no significant effect. Unexpectedly, in vCJD-infected CGN^{Hu-Met129}, doxycycline was ineffective and we observed a paradoxical but not significant effect with a

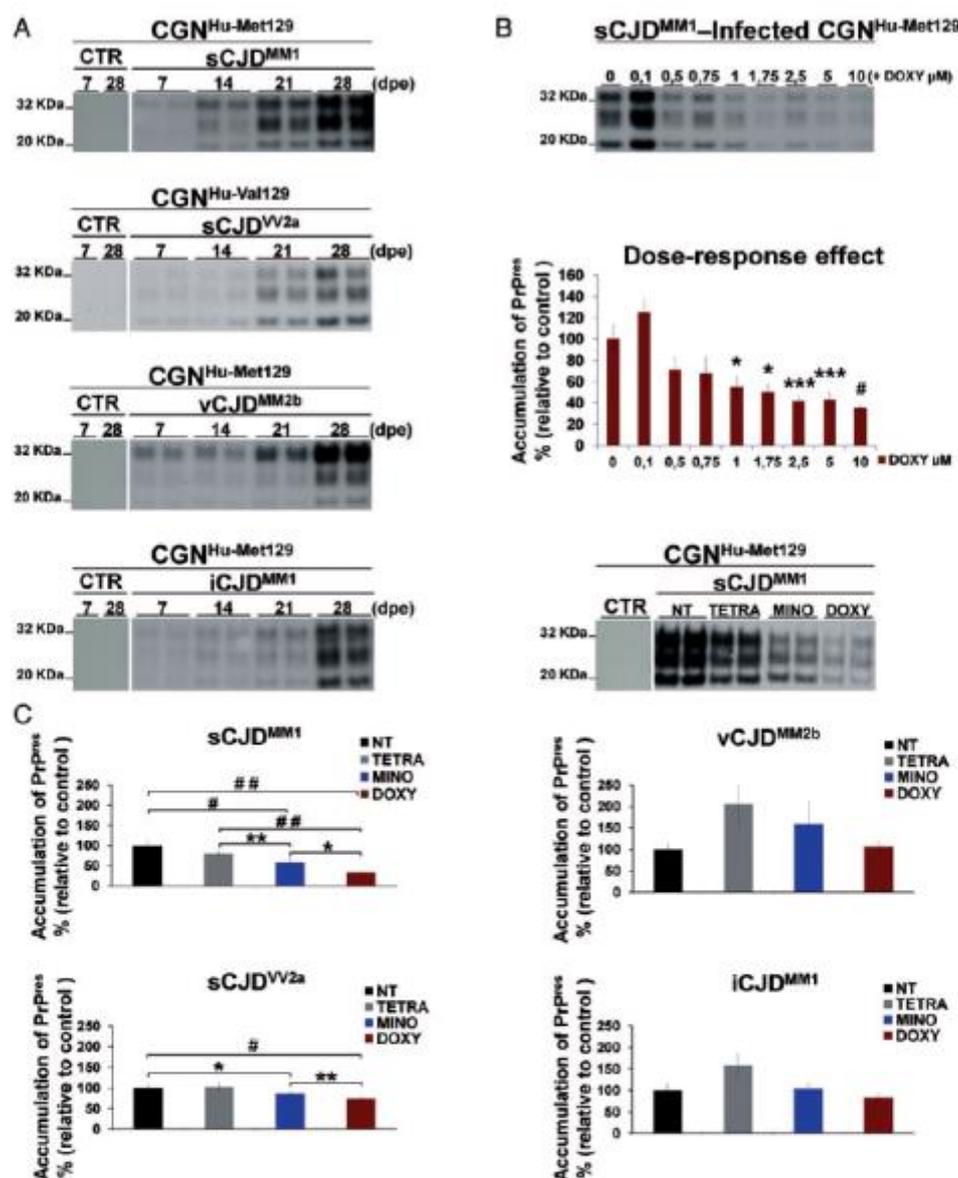


Figure 1. Kinetics of PrP^{Sc} accumulation in CGN^{Hu} cultures exposed to different CJD isolates and effect of cyclines on human prion propagation. *A*, PrP^{Sc} accumulation in CGN^{Hu} cultures exposed to different CJD isolates. Western blot results from duplicate culture wells of a representative experiment. Fifty micrograms of proteins from cell lysates were PK digested, and PrP^{Sc} was detected with the monoclonal antibody 3F4. PrP^{Sc} accumulation was observed from 14 to 28 dpe in CGN^{Hu-Met129} infected with the sCJD^{MM1} isolate and from 21 to 28 dpe in CGN^{Hu-Met129} infected with the vCJD^{MM2b} and the iCJD^{MM1} isolates and in CGN^{Hu-Val129} infected with the sCJD^{VV2a} isolate. *B*, Cycline treatment of CGN^{Hu-Met129} cultures infected with a sCJD^{MM1} isolate. Upper panel: Illustrative Western blot of PrP^{Sc} accumulation in infected CGN^{Hu-Met129} treated with doxycycline at various concentrations (from 0.1 μ M to 10 μ M). Middle panel: Quantification of PrP^{Sc} variation using densitometric analysis of immunoblots. PrP^{Sc} variations are expressed as a percentage of nontreated cultures (vehicle only). Each value represents the mean of 5 independent experiments \pm SEM. CGN^{Hu-Met129}-infected cultures, treated with doxycycline, showed a significant decrease in PrP^{Sc} accumulation from 1 μ M, and the effect of doxycycline reached its maximum to 10 μ M. Lower panel: PrP^{Sc} accumulation assessed at 28 dpe by Western blot, in sCJD^{MM1}-infected CGN^{Hu-Met129} cultures treated with tetracycline (TETRA), minocycline (MINO), or doxycycline (DOXY) at a concentration of 10 μ M. For nontreated infected cultures (NT), only vehicle solution was added. *C*, Cycline treatment in CGNs infected with various CJD isolates. Quantification by densitometric analysis of PrP^{Sc} accumulation assessed at 28 dpe, in CGN^{Hu} cultures exposed to brain homogenates from sCJD^{MM1}, vCJD^{MM2b}, iCJD^{MM1} and vCJD^{VV2a} patients, and treated with tetracycline (TETRA), minocycline (MINO) or doxycycline (DOXY) at a concentration of 10 μ M. The PrP^{Sc} accumulation in infected cultures was expressed as a percentage of nontreated cultures (vehicle only). Doxycycline was the most effective compound, especially in CGN^{Hu-Met129} cultures exposed to sCJD^{MM1}. Each value represents the mean of at least 3 independent experiments performed in duplicate \pm SEM. Differences were significant at * P < .05, ** P < .01, *** P < .005, # P < .001, ## P < .0001 determined by a Mann-Whitney U test. Abbreviations: CGN, cerebellar granule neuron; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; dpe, days postexposure; PK, proteinase K; PrP, prion protein; SEM, standard error of the mean.

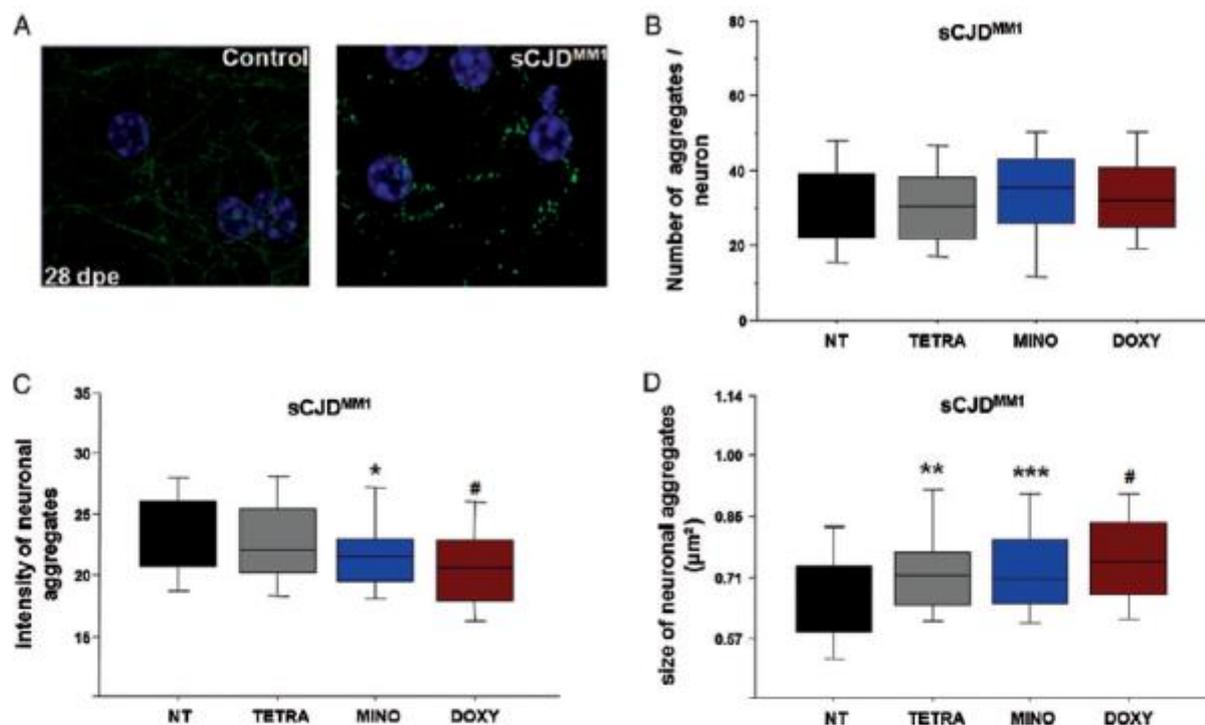


Figure 2. Effect of doxycycline treatment on neuronal PrP aggregates in $CGN^{Hu-Met129}$ cultures exposed to $sCJD^{MM1}$ isolate. **A**, Immunostaining of PrP (in green) after guanidine thiocyanate treatment was performed at 28 dpe by using monoclonal antibody Sha31. Staining with 4'-6-diamidino-2-phenylindole appears in blue. $CGN^{Hu-Met129}$ $sCJD^{MM1}$ -infected cells (right panel) are compared to control noninfected cells (left panel). In infected cultures, granule cells showed punctuate fluorescence signals; in contrast, control cultures showed diffuse, homogenous PrP labeling. Box plots show the distribution of the number (**B**), the intensity (**C**), and the size (**D**) of neuronal PrP immunopositive aggregates in $CGN^{Hu-Met129}$ $sCJD^{MM1}$ -infected cultures treated with different cyclines measured using CellProfiler software. Treatment with cyclines at a concentration of 10 μM induced a decrease in the intensity and an increase in the size of neuronal PrP aggregates. Doxycycline was the most effective compound. Differences with control values were significant at * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .005$ and # $P < .001$ determined by a 1-way analysis of variance (Dunnett's test). Abbreviations: CGN, cerebellar granule neuron; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; DOXY, doxycycline; dpe, days postexposure; MINO, minocycline; NT, nontreated infected cultures; PrP, prion protein; TETRA, tetracycline.

tendency for an increase of PrP^{res} level in tetracycline-treated cultures. In $iCJD^{MM1}$ -infected cultures, none of the cycline compounds showed any significant effect. Therefore, the efficacy of cyclines appeared to be highly strain-specific in CGN^{Hu} infected with human prions. In addition, we assessed the effect of cyclines in a well-characterized CGN^{Mo} model [10], infected with 3 distinct experimental scrapie strains (139A, ME7, and 22L), and we confirmed the strain-specificity of cycline effects on PrP^{res} accumulation (see Supplementary Figure 2).

Tagliavini et al reported that a 48-hours incubation of prion brain homogenate with tetracycline at high concentrations enhances the PK sensitivity of PrP^{res} types 1 and 2 [5]. To make sure that our results were not simply due to an alteration of PK resistance of PrP^{res} molecules that have already accumulated in infected cultures at the late point of the kinetics, we treated the $sCJD^{MM1}$ - and $vCJD^{MM2b}$ -infected $CGN^{Hu-Met129}$ from 26 dpe to 28 dpe with cyclines. A 48-hours cycline treatment at 10 μM did not reduce the level of detected PrP^{res} in infected cultures (see Supplementary Figure 1), confirming that the anti-prion

effect of cyclines that we detected at relatively low concentrations was not due to an increase in PK sensitivity. Moreover, the quantification of PrP signal after thiocyanate guanidine treatment showed that the intensity (Figure 2C) but not the number (Figure 2B) of PrP-immunopositive aggregates that accumulated in $sCJD^{MM1}$ -infected $CGN^{Hu-Met129}$ significantly decreased in treated cultures. Consistently with the results of Western blot after PK digestion, the higher effect was observed with doxycycline. Interestingly, the size of PrP aggregates was larger in cyclines-treated cultures (Figure 2D), suggesting that cyclines operate at the cell level by modulating the formation of PrP aggregates.

DISCUSSION

In this study, we report the permissiveness of CGN^{Hu} to different human prion isolates that were not previously stabilized on mice. Considering that the properties of human prion isolates may be altered during passages in mouse models, this first step

was required before evaluating accurately the effect of molecules with immediate clinical interest against the propagation of human isolates. In CGN^{Hu} cultures that expressed human PrP with a methionine or a valine at codon 129, we propagated 4 different CJD isolates (iCJD^{MM1}, vCJD^{MM2b}, and sCJD^{MM1} in CGN^{Hu-Met129}; sCJD^{VV2a} in CGN^{Hu-Val129}). It has been demonstrated that the agents involved in sCJD^{MM1}, sCJD^{VV2a}, and vCJD^{MM2b} are distinct prion strains [2, 13].

We observed a significant effect of cycline treatment in infected CGN cultures that varies with the CJD isolate and the studied compound. The effect was demonstrated by a decrease in PrP^{res} accumulation and an alteration of PrP abnormal aggregates in treated cultures. Interestingly, quantification of PrP aggregates showed a reduced PrP immunostaining in treated CJD-infected cultures compared to nontreated cultures, while the number of total aggregates was not different. Unexpectedly, cycline treatment significantly modified the size distribution of PrP aggregates in infected cultures. The increase in aggregate size that we observed is consistent with a mechanism proposed to explain the effect of cyclines on A- β peptides and of polythiophenes on PrP with the formation of amorphous aggregates that may sequester, in infected cultures, harmful PrP species and limit prion propagation [14, 15]. In contrast with early and prolonged treatment, short cycline treatment at a late point of the kinetics (26 to 28 dpi) did not show any significant effect on PrP^{res} accumulation, demonstrating that the antiprion effect of cyclines that we observed at 10 μ M was not due to an increase in the PK sensitivity of PrP^{res}. This result also underlines the importance of the timing of cycline treatment that may represent a critical issue in the clinical situation. When the patients fulfill the current criteria for CJD diagnosis, prion propagation has already reached the threshold level to trigger neurodegenerative processes and induce neuronal vacuolization and neuronal loss in various brain regions. Early treatment of CJD patients would require significant breakthrough toward the diagnosis of pre- or pauci-symptomatic stages of the disease. Nevertheless, the kinetics of cycline efficacy that we observed in vitro is consistent with a preventive use in asymptomatic carriers of *PRNP* pathogenic mutations. Cyclines efficacy varied substantially between CJD isolates. Our results thus clearly reinforced the need of a validation of antiprion efficacy using human isolates and support cerebellar granule cells derived from mice expressing human PrP as a unique and useful model. Importantly, we found that the cycline compound that showed the highest efficacy is the one that is currently under clinical investigation (ie, doxycycline). In addition, the sCJD^{MM1} isolate that corresponds to the most common form of human prion diseases was the most sensitive to doxycycline treatment.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of

data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank Drs H. Laude and V. Béringue for kindly providing us Tg650 mice, Dr M. Rosset and Pr. P. Aucouturier for providing us 139A and ME7 scrapie strains, Dr E. Comoy for the 22L scrapie strain, Emilie Morain for excellent technical help, Dr M. Valente for his help in image analysis with CellProfiler software, and all the members of the R. Escourolle Laboratory.

Financial support. This work was supported by the "Institut de Veille Sanitaire" and the "Pôle de Compétitivité Medecin - Paris Région."

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216:136–44.
- Haik S, Brandel JP. Biochemical and strain properties of CJD prions: complexity versus simplicity. *J Neurochem* 2011; 119:251–61.
- Trevitt CR, Collinge J. A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* 2006; 129:2241–65.
- Forloni G, Iussich S, Awan T, et al. Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10849–54.
- Tagliavini F, Forloni G, Colombo L, et al. Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol* 2000; 300:1309–22.
- De Luigi A, Colombo L, Diomede L, et al. The efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection. *PLOS One* 2008; 3:e1888.
- Béringue V, Le Dur A, Tixador P, et al. Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLOS One* 2008; 3:e1419.
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 1995; 83:79–90.
- Cronier S, Laude H, Peyrin JM. Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:12271–6.
- Hannaoui S, Maatouk L, Privat N, Levavasseur E, Faucheux BA, Haik S. Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type. *J Virol* 2013; 87:2535–48.
- Brandel JP, Heath CA, Head MW, et al. Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: evidence for the same agent strain. *Ann Neurol* 2009; 65:249–56.
- Gies E, Wilde I, Winget JM, et al. Niclosamide prevents the formation of large ubiquitin-containing aggregates caused by proteasome inhibition. *PLOS One* 2010; 5:e14410.
- Bishop MT, Will RG, Manson JC. Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:12005–10.
- Diomede L, Cassata G, Fiordaliso F, et al. Tetracycline and its analogues protect *Caenorhabditis elegans* from beta amyloid-induced toxicity by targeting oligomers. *Neurobiol Dis* 2010; 40:424–31.
- Margalith I, Suter C, Ballmer B, et al. Polythiophenes inhibit prion propagation by stabilizing prion protein (PrP) aggregates. *J Biol Chem* 2012; 287:18872–87.

Conclusion article 2 :

Cette étude démontre que notre modèle de cultures primaires semble être un outil pertinent pour évaluer rapidement les propriétés anti-prion de composés pharmacologiques pour une stratégie thérapeutique efficace chez l'Homme. Ce modèle nous a permis d'évaluer l'effet *in vitro* de la doxycycline vis-à-vis des souches humaines de prions. Les résultats obtenus montrent que la doxycycline est un bon candidat pour le traitement de ces maladies puisqu'elle est efficace dès la concentration de 1µM. L'essai clinique Doxyprions a permis la collecte de données concernant le dosage de la doxycycline dans les cerveaux des patients traités (Haïk et al. 2014). Il apparaît que la doxycycline passe bien la BHE et s'accumule dans le cerveau au cours du traitement. Il semblerait que la concentration efficace de 1µM puisse être atteinte dans le cerveau selon les données des patients recevant le traitement jusqu'à la veille de leur décès (doxycycline mesurée de 646 à 3051ng/g de cerveau). Cependant la concentration la plus efficace dans notre modèle n'est jamais atteinte. L'échec de cette thérapie en essai clinique pourrait également s'expliquer par le fait que le traitement soit mis en place trop tardivement dans l'évolution de la maladie.

Une approche intéressante serait de pouvoir combiner les effets de plusieurs traitements anti-prion afin d'obtenir une action synergique et pouvoir prétendre à au moins ralentir le processus pathologique en phase clinique de la maladie.

Evaluation de nouveaux composés anti-prion

Au vu des résultats encourageants obtenus avec notre modèle de cultures primaires dans cette première étude, nous avons cherché à évaluer de nouveaux composés montrant des effets anti prions, et ayant des mécanismes d'action différents.

Notre attention s'est tout d'abord portée sur l'astemizole, molécule pour laquelle un effet anti-prion a été décrit par l'équipe de Corinne Lasmézas (Karapetyan et al. 2013). En effet leur étude montre que l'astemizole est capable d'inhiber la réplication de souches de tremblantes dans des cultures de neuroblastomes à une concentration de 2 μ M. De plus son administration intra-péritonéale de 20 à 50 jours post-inoculation à des souris C57Bl/6 inoculées avec la souche RML permet d'allonger la survie de ces animaux (p=0,06). L'astemizole a pour mécanisme d'action d'activer l'autophagie, ce qui pourrait être intéressant puisque ce mécanisme semble être indépendant de la souche de prions. De plus l'astemizole étant une molécule figurant dans la « US Drug Collection » et ayant déjà été administrée chez l'Homme, ce traitement pourrait être rapidement disponible en clinique dans le cas d'une efficacité vis-à-vis des souches humaines.

Un intérêt tout particulier a été porté à l'inhibition de l'Unfolded Protein Response (UPR) par l'équipe de Giovanna Mallucci (Moreno et al. 2013; Halliday and Mallucci 2014). L'inhibition de cette voie, via l'inhibition de la kinase PERK, chez des souris tg37 inoculées avec une souche de tremblante (RML) permet une diminution significative des lésions neuropathologiques, et retarde l'apparition des symptômes. L'inhibition de PERK permet donc d'agir sur les conséquences neurotoxiques de l'accumulation de la PrPsc. Il est intéressant de noter que ces effets bénéfiques ont aussi pu être constatés lorsque le traitement a été mis en place neuf semaines après l'inoculation, le temps de survie moyen sans traitement étant de treize semaines. Ce traitement efficace, même en phase relativement tardive, et sans effet sur l'accumulation de la PrPsc nous a semblé être un bon candidat pour notre étude. En revanche, la limite de ce traitement est l'action périphérique de l'inhibiteur de PERK, entraînant une perte de poids de plus de 20% ainsi qu'une hyperglycémie, conduisant au sacrifice des animaux avant l'apparition des signes cliniques caractéristiques des maladies à prions.

Une autre approche ayant retenu notre attention est celle étudiée par l'équipe de Benoit Schneider qui module la présence de la PrPc à la membrane cellulaire en inhibant la kinase PDK1 (Pietri et al. 2013). L'action double de cette inhibition (clivage de la PrPc à la

membrane, la rendant soluble, et clivage du récepteur TNFR1 du TNF α) semble être particulièrement bénéfique dans le traitement des maladies à prions. En effet, la mise en place du traitement seulement 10 jours avant l'apparition des signes cliniques chez des souris C57Bl/6 inoculées par la souche de tremblante 22L induit une nette augmentation du temps de survie ($p < 0,0001$). Au niveau cérébral, le traitement permet une diminution de l'accumulation de PrP^{sc} et de la mort neuronale.

Nous avons donc choisi d'étudier l'implication de ces trois mécanismes d'actions différents dans notre modèle d'étude de cultures primaires permissives aux souches humaines de prions. L'efficacité des traitements a été évaluée en fonction de l'accumulation de PrP^{sc} et de la survie neuronale. Nous avons également étudié s'il était possible d'obtenir un effet synergique à l'aide d'un traitement en association avec la doxycycline. Les candidats les plus efficaces sur les souches humaines ont ensuite été évalués *in vivo* chez des souris surexprimant la PrP^c humaine et inoculées par une souche sporadique humaine.

Matériel et méthodes

L'ensemble des matériels et méthodes concernant l'obtention des cultures primaires, leur infection et la détection de la PrP anormale est similaire à celui décrit dans l'article précédent (Hannaoui et al. 2014).

Toutefois, suite à un changement de lot de sérum de veau fœtal, nous sommes passés à l'utilisation de milieu conditionné pour le rinçage des cultures. Ainsi, à la fin de l'exposition de 4 jours aux homogénats de cerveaux, le milieu est retiré et remplacé par un milieu prélevé sur des cultures non infectées et au même stade de développement que les cultures exposées.

Expériences d'immunofluorescence

Pour les expériences d'immunofluorescence, la PrP a été détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal Sha31 (IgG1, épitope 148–159, SPI-Bio, France) et les astrocytes ont été marqué par un anticorps polyclonal anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Dako, France). La population neuronale a été quantifiée en comptant le nombre de cellules PrP-positives ayant une morphologie neuronale et négatives pour la GFAP, la population astrocytaire a été déterminée en comptant le nombre de cellules positives pour la GFAP et la présence de noyaux anormaux présentant des modifications morphologiques évocatrices d'apoptose a été quantifiée (nombre de noyaux pycnotiques ou fragmentés). Quarante-cinq images contenant au minimum 10 noyaux ont été analysées pour chaque condition.

Traitements

Pour le traitement des cultures, les molécules ont d'abord été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin d'obtenir des solutions stocks à 2mM. Les solutions étaient ensuite diluées dans du DMEM juste avant le traitement puis ajoutées au milieu de culture. La concentration finale maximale de DMSO présente dans les puits était de 0,2%.

Inoculation et traitement des souris

Vingt microlitres d'un homogénat à 10% de cerveau humain atteint de MCJ sporadique (sous-type MM1) a été inoculé intracérébralement sous anesthésie générale à des souris tg650, surexprimant la PrP humaine sauvage M129 et âgées de 7 à 8 semaines.

Chaque groupe de traitement était composé de 13 souris, la proportion de mâles et de femelles par groupe était équivalente dans tous les groupes. L'évolution de la maladie a été suivie deux fois par semaine puis quotidiennement dès les premiers signes cliniques. Une cotation (0: aucune; 1: discrète; 2: faible; 3: moyenne ; 4: forte), permettant une évaluation de l'état clinique a été effectuée sur les paramètres suivants : état général, ataxie cérébelleuse, paraparésie, cyphose, état de prostration. Le sacrifice a été réalisé au stade 4 = stade terminal de la maladie:

Le traitement a été mis en place à l'aide de pompes osmotiques Alzet (Charles River), placées en sous-cutané. Les traitements ont été préparés le jour de l'implantation des pompes. Les molécules ont tout d'abord été dissoutes dans du DMSO puis diluées dans de l'eau pour préparations injectables (ppi) (Lavoisier). Les pompes osmotiques ont été remplies avec les traitements puis implantées en sous-cutané sous anesthésie générale. Le débit de délivrance est de 0,25µL/h, correspondant à une dose de 10mg/kg/j pour la doxycycline et de 3mg/kg/j pour l'astemizole.

Résultats

1. Evaluation de la toxicité des composés vis-à-vis des cultures primaires

Afin de s'affranchir de tout effet cytotoxique direct des composés sur les cultures primaires neuronales, nous avons évalué la viabilité des cultures primaires de CGN issues de souris tg650 après exposition à une gamme de concentration de chaque molécule. Les traitements ont été ajoutés à 14 jours post exposition (dpe) et la viabilité cellulaire mesurée trois jours après (17dpe).

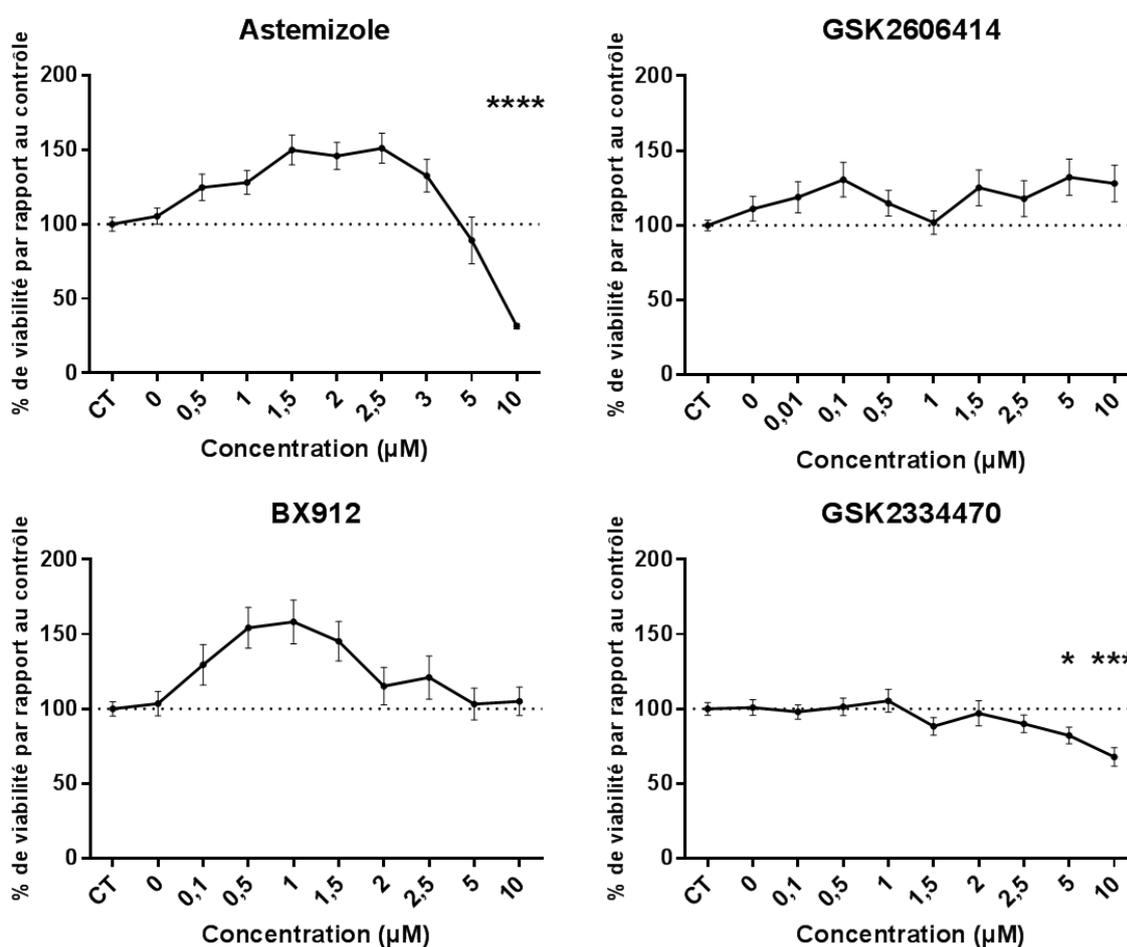


Figure 29 : Viabilité cellulaire après exposition aux différents composés.

Chaque courbe représente la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en sixtriplicats \pm SEM sur des cultures de CGN issues de tg650 et infectées par un homogénat de MCJ spo (MM1) ou un homogénat de cerveau sain pour les contrôles. Les différences significatives par rapport au contrôle ont été calculées à l'aide d'un test de Mann-

Whitney et sont représentées telles que : * pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,001$ et **** pour $p < 0,0001$.

Les résultats obtenus montrent que bien que les composés puissent avoir un effet toxique pour des doses élevées, ils ne sont pas toxiques aux doses efficaces décrites (**Figure 29**) (1 μ M pour BX912 ; 2 μ M pour l'astemizole et GSK2606414 et 3 μ M pour GSK2334470).

2. Effet des composés sur l'accumulation de PrPres en culture

Les effets des composés sur l'accumulation de PrPres dans des cultures primaires de CGN ont été évalués, seuls ou en association avec la doxycycline. Les traitements ont été initiés à 14 jours post exposition(dpe), à raison de deux fois par semaine pour la doxycycline qui est très bien tolérée par les cultures, et une fois par semaine pour les autres composés. Les puits contrôles ont reçu uniquement la solution véhicule. Les cultures sont lysées à 28dpe et la quantité de PrPres est évaluée par Western Blot.

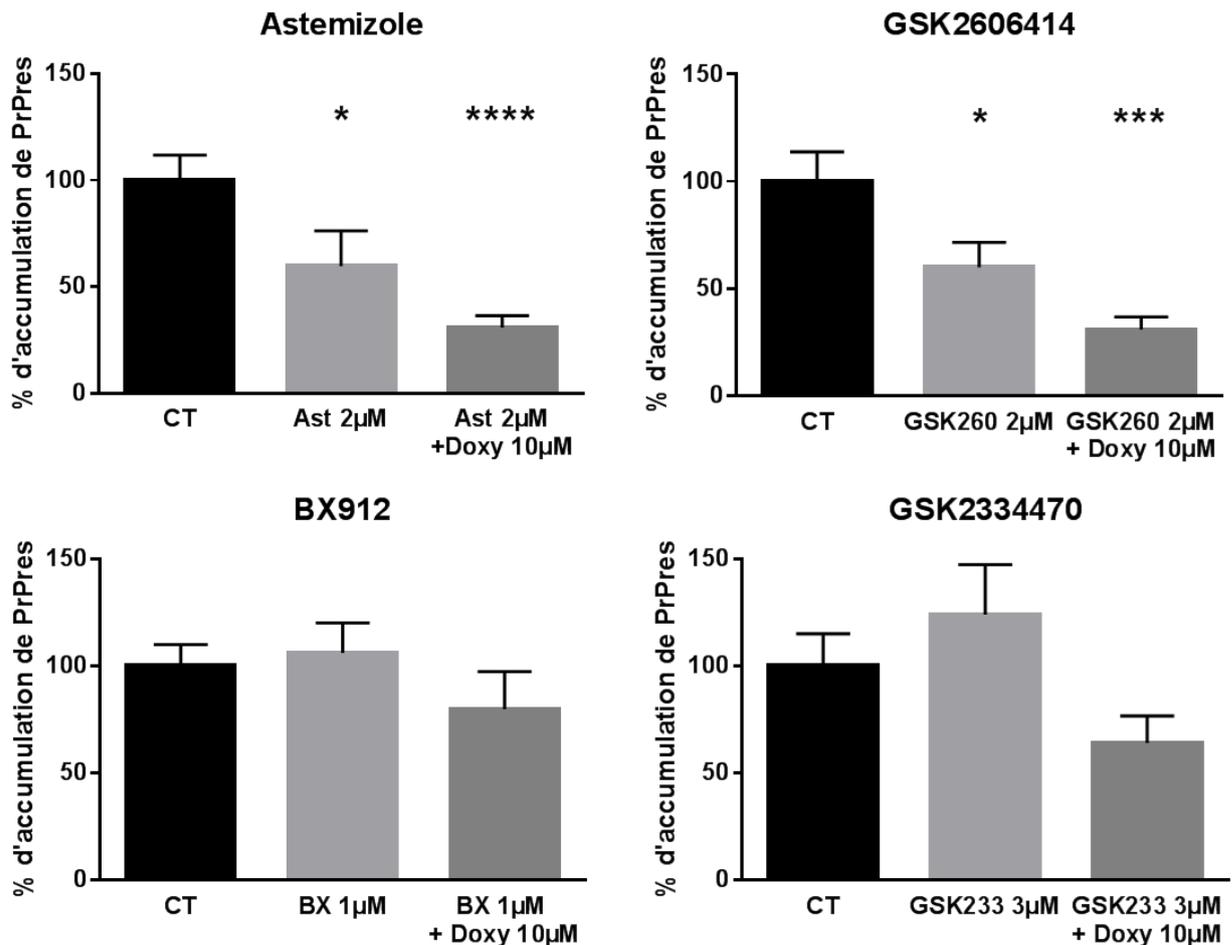


Figure 30 : Effets des traitements sur l'accumulation de PrPres dans des cultures de CGNtg650 infectées par un homogénat MM1 sporadique.

Quantification de l'accumulation de PrPres à 28 dpe dans des cultures de CGN issues de tg650 infectées par une souche de MM1 sporadique et traitées par différents composés, seuls ou en association avec la doxycycline. Evaluation de l'accumulation de PrPres par Western Blot (anticorps 3F4) et densitométrie. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en triplicats. Les différences significatives par rapport au contrôle ont été calculées à l'aide d'un test de Mann-Whitney et sont représentées telles que : * pour $p < 0,05$; *** pour $p < 0,001$ et **** pour $p < 0,0001$.

Les résultats montrent une efficacité de l'astemizole et de l'inhibiteur de PERK (GSK2606414) sur la réplication de la souche MM1 sporadique dans notre modèle cellulaire

(**Figure 30**). De façon très intéressante cet effet est synergique avec l'action de la doxycycline et permet une réduction accrue de l'accumulation de la PrPsc. Cet effet est visible mais moins marqué vis-à-vis de la souche VV2 sporadique (**Figure 31**).

En revanche les inhibiteurs de PDK1 ne montrent pas d'effet anti-prion dans ce modèle cellulaire. Le traitement par ces composés va jusqu'à contrecarrer l'effet bénéfique de la doxycycline précédemment observé.

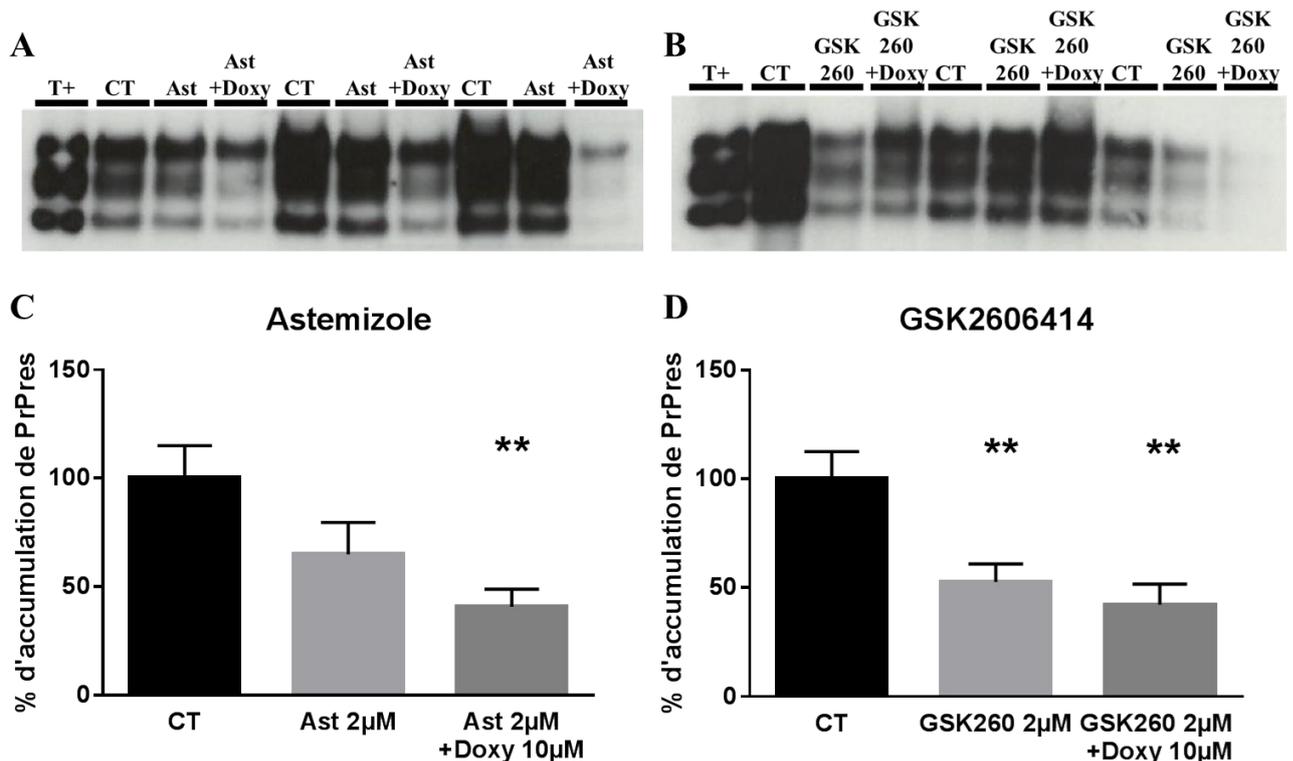


Figure 31 : Effets des traitements sur l'accumulation de PrPres dans des cultures de CGNtgVal infectées par un homogénat VV2 sporadique.

(A)et (B) : Blots représentatifs de l'accumulation de PrPres à 28dpe dans des cultures de CGN tgVal infectées par une souche de VV2 sporadique et traitées par l'astemizole (A) ou le GSK2606414 (B), seuls ou en association avec la doxycycline. Détection à l'aide de l'anticorps 3F4 ; T+= témoin positif ; CT= véhicule (DMSO) seul.

(C) et (D) : Quantification de l'accumulation de PrPres néo-synthétisée à 28 dpe dans des cultures de CGN issues de tgVal infectées par une souche de VV2 sporadique et traitées par différents composés, seuls ou en association avec la doxycycline. Evaluation de l'accumulation de PrPres par Western Blot (anticorps 3F4) et densitométrie. Les différences significatives par rapport au contrôle ont été calculées à l'aide d'un test de Mann-Whitney et sont représentées telles que : ** pour p<0,01.

3. Effets de l'astemizole et du GSK2606414 sur la mort neuronale.

L'astemizole et le GSK2606414 étant efficaces pour réduire l'accumulation de PrP^{sc} au sein des cultures, nous avons investigué leur effet sur la mort neuronale. Pour cela nous avons gardé le même schéma de traitement (un traitement par semaine de 14 à 28dpe) puis nous avons comptabilisé la proportion de neurones, d'astrocytes et de cellules présentant des altérations nucléaires.

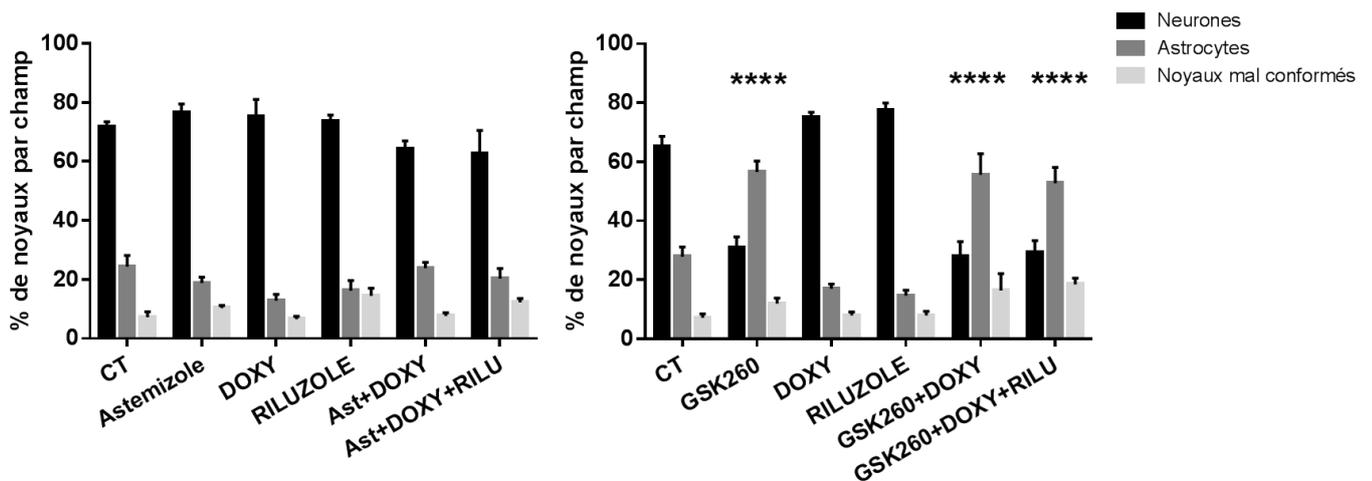


Figure 32 : Effets des traitements sur la survie neuronale.

Le dénombrement et le typage des cellules est effectué à l'aide d'un immunomarquage (DAPI pour les noyaux et GFAP pour les astrocytes). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triplicats sur des cultures de CGN issues de tg650 et infectées par une souche de MM1 sporadique. Les différences significatives des populations neuronales et astrocytaires par rapport au contrôle ont été calculées à l'aide d'un two way ANOVA et sont représentées telles que : **** pour $p < 0,0001$.

Les résultats montrent que le traitement par l'astemizole n'engendre pas d'effet délétère sur la survie neuronale. Au contraire, le traitement par inhibiteur de PERK semble induire une réaction astrocytaire au dépend de la survie neuronale.

Nous avons aussi choisi de comparer les effets de ces deux nouveaux traitements avec celui du riluzole. En effet le riluzole est un inhibiteur de la libération du glutamate et des canaux sodiques dépendants d'un potentiel d'action, ce qui lui confère un effet

neuroprotecteur (Doble 1996). Cette molécule est d'ailleurs administrée aux patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique. Les résultats montrent ici que le traitement par le riluzole ne montre pas d'effet bénéfique et ne permet pas de diminuer l'effet toxique induit par le GSK2606414.

4. Evaluation *in vivo* de l'efficacité de l'astemizole, de la doxycycline et de leur association vis-à-vis d'une souche humaine de prion.

Les données *in vitro* donnent l'astemizole comme meilleur candidat vis-à-vis des souches de prions humains. Nous avons évalué son effet *in vivo* chez des souris tg650 inoculées intracérébralement par un isolat de MCJ sporadique de type MM1. Dans ce modèle, nous avons montré avec l'équipe de Vincent Béringue que les isolats de MCJ MM1 étaient d'emblée adaptés dans ce modèle (taux d'attaque de 100% avec une période d'incubation stable dès le premier passage) (Jaumain et al. 2016). Le traitement a été initié le plus proche possible de la phase clinique, à savoir 148 jours post inoculation (dpi), soit deux semaines en moyenne avant l'apparition des premiers signes cliniques.

Tous les traitements utilisés montrent un allongement significatif de la survie. L'effet de la doxycycline seule est particulièrement marqué. Au contraire de ce que nous avons pu observer *in vitro*, l'association des molécules ne semble pas avoir un effet synergique sur la survie.

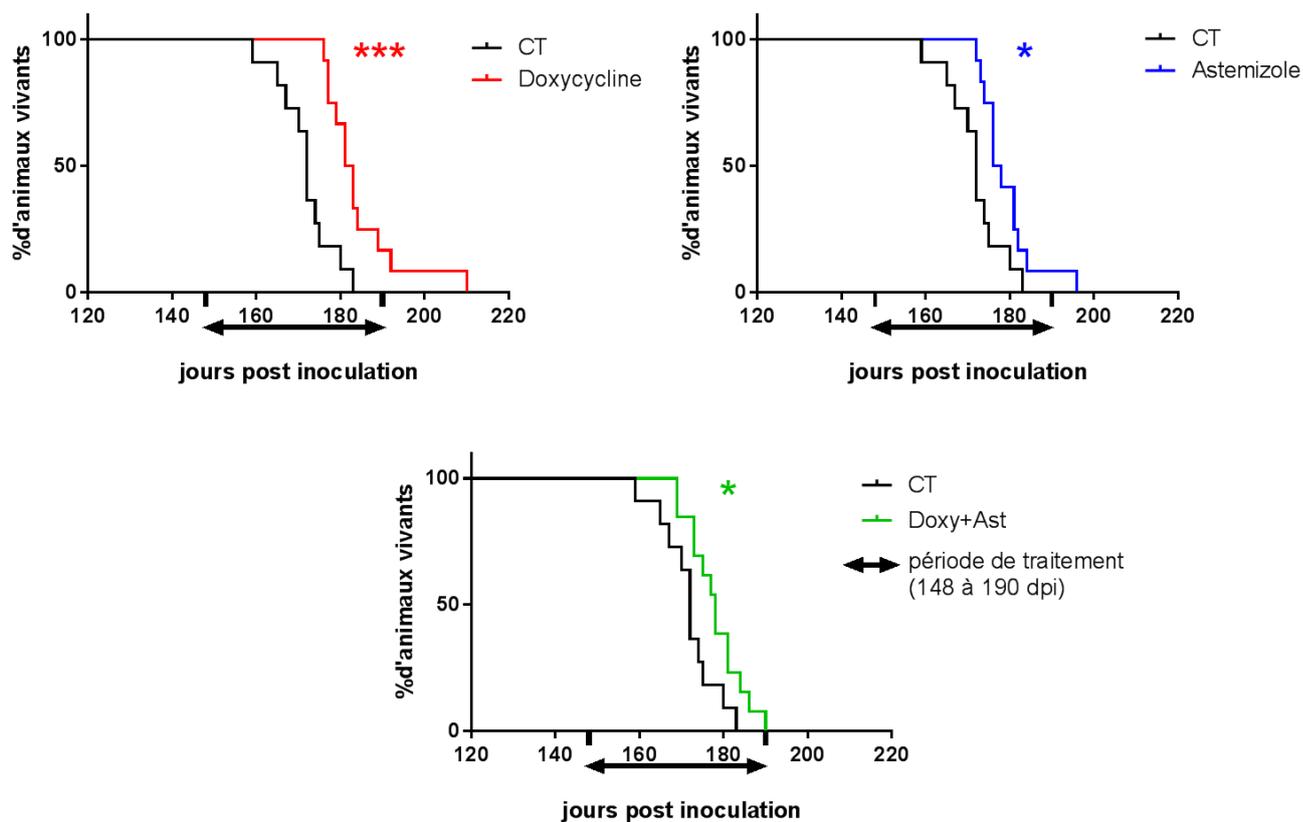


Figure 33 : Evaluation *in vivo* de l’astemizole, de la doxycycline ainsi que de leur association.

Traitement initié à 148 dpi chez des souris tg650 inoculées intracérébralement par une souche de MM1 sporadique. La délivrance continue des traitements en sous-cutanée est réalisée grâce à des mini pompes osmotiques Alzet, à raison de 3mg/kg/j pour l’astemizole et 10mg/kg/j pour la doxycycline. Le groupe contrôle est constitué de souris implantées par des pompes ne contenant que le véhicule (DMSO à 30% dans de l’eau p.p.i.). Les différences significatives par rapport au contrôle ont été calculées à l’aide d’un test de Mantel Cox et sont représentées telles que : * pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$.

Discussion

Malgré le grand nombre d'études portant sur la thérapeutique des maladies à prions, aucun traitement n'a démontré son efficacité en clinique à ce jour. L'un des problèmes majeurs dans le développement de thérapies efficaces vis-à-vis des souches humaines était le manque de modèles *in vitro* pertinents. Nous avons pallié à ce manque en mettant au point un modèle *in vitro* permettant la propagation de souches humaines (Hannaoui et al. 2014). La propagation de prions dans un modèle de cultures neuronales primaires a été décrite pour la première fois par Sabrina Cronier et ses collègues (Cronier, Laude, and Peyrin 2004). La propagation de souches de tremblante mais aussi d'un isolat d'origine humaine, préalablement adaptés aux rongeurs, est possible dans ce modèle. Dans notre étude, nous avons utilisé ce modèle de cultures primaires et nous avons pu démontrer que la propagation d'isolats humains, sans adaptation préalable, était possible. En effet, nous avons réussi à propager des isolats humains (MCJ sporadique MM1 et VV2, vMCJ, iMCJ) sur des cultures de CGN issues de souris transgéniques surexprimant la PrPc humaine, méthionine (tg650) ou valine (tgVal) au codon 129. De plus, l'évaluation de composés ayant des propriétés anti prion est possible dans ce modèle. Nous avons pu observer que l'efficacité des traitements était souche dépendant mais aussi dépendant de la cycline utilisée. Ainsi le traitement par la doxycycline a montré une efficacité sur les souches sporadiques de MCJ au contraire de la tétracycline et de la minocycline.

Dans la continuité de cette étude, nous avons sélectionné des molécules ayant des propriétés anti prion nous semblant pertinentes afin de les évaluer dans notre modèle. Nous avons privilégié des mécanismes d'actions différents de chacune de ces molécules dans l'optique de pouvoir associer les différents traitements et en obtenir un effet synergique.

Nous avons ainsi pu évaluer l'effet anti-prions de composés ayant montré un effet thérapeutique vis-à-vis de souches de tremblantes. Deux de ces composés, l'astemizole et l'inhibiteur de PERK, sont capables de réduire l'accumulation de PrPres néosynthétisée au sein de nos cultures après infection par deux souches sporadiques différentes (M1 et V2). Les inhibiteurs de PDK1, en revanche, ne semblent pas avoir d'effet vis-à-vis de ces deux souches dans notre modèle. Il est possible que ce traitement soit spécifique de souches, ou bien que les résultats de cette efficacité soient biaisés dans ce modèle de surexpression de PrPc. En effet

l'action thérapeutique de ces inhibiteurs passe par le clivage α de la PrPc membranaire par la protéine TACE (Pietri et al. 2013). Or dans notre modèle la PrPc est surexprimée, on peut alors imaginer que l'action de TACE soit minimisée par rapport au nombre de molécules de PrPc présentes à la membrane.

Nous avons observé que l'astemizole et le GSK2606414, en plus de permettre une diminution de l'accumulation de PrPres en traitement simple, montraient une action synergique lorsqu'ils étaient associés à la doxycycline. Ces résultats encourageants montrent qu'il est possible et avantageux de combiner deux approches avec des mécanismes d'action différents dans le traitement des maladies à prions.

Ces résultats étaient surprenants pour l'inhibiteur de PERK qui n'avait pas engendré de diminution de l'accumulation de PrPsc dans le cerveau des animaux traités (Moreno et al. 2013). Afin de nous assurer que cette diminution observée dans nos cultures ne soit pas due à une toxicité neuronale des traitements, nous avons évalué l'impact de l'astemizole et de l'inhibition de PERK sur la survie neuronale.

La quantification des cellules après traitement dans les cultures a mis en évidence une neurotoxicité du GSK2606414 après 14 jours de traitement. La diminution du nombre de neurones est accompagnée d'un fort développement du nombre d'astrocytes. Les astrocytes sont aussi sensibles à l'infection et sont capables de la propager, mais dans une moindre mesure que les neurones (Cronier, Laude, and Peyrin 2004). Il semblerait donc que la diminution globale de l'accumulation de PrPres observée dans nos cultures s'explique par une forte neurotoxicité de l'inhibiteur de PERK. En revanche, les proportions de population neuronale ou astrocytaire ne varient pas après un traitement à l'astemizole pendant 14 jours. L'ajout d'un neuroprotecteur (riluzole) dans le milieu de culture ne montrait pas de bénéfice sur la survie neuronale. De façon très intéressante on observe que l'association astemizole + doxycycline semble aussi bien tolérée par les cultures.

Ainsi cette association astemizole + doxycycline apparaît comme un excellent candidat pour le traitement d'une infection par les souches humaines de prions. Nous avons choisi de valider l'effet de cette association dans un modèle *in vivo* de souris transgéniques tg650 surexprimant la PrPc humaine méthionine au codon 129, inoculées à l'aide d'un homogénat de cerveau atteint de MCJ sporadique MM1. Afin de mimer au plus près la réalité de la clinique humaine, nous avons choisi d'initier le traitement à la fin de la phase d'incubation, au plus proche du début des signes cliniques. Les résultats montrent un

allongement significatif du temps de survie chez les animaux traités avec la doxycycline seule ($p < 0,001$) ou avec l'astemizole seul ($p < 0,05$). Ces résultats sont très encourageants et permettent de confirmer *in vivo* l'effet anti prion de la doxycycline vis-à-vis des souches humaines. Effectivement, bien que ce traitement ait été mis en place lors d'un essai clinique contrôlé en double aveugle, son efficacité *in vivo* avait été démontré uniquement sur des souches de tremblante (De Luigi et al. 2008). L'évaluation en phase tardive de la période d'incubation avait été réalisée à l'aide d'une délivrance particulière, la doxycycline étant contenue dans des liposomes afin de permettre sa diffusion dans l'espace intracérébroventriculaire des animaux infectés. Notre étude apporte donc la preuve manquante concernant l'efficacité *in vivo* de la doxycycline vis-à-vis des souches de prions humains.

De plus, nos résultats montrent que l'astemizole est efficace vis-à-vis des souches humaines *in vitro* et *in vivo*. Cette efficacité est observée alors même que le traitement est initié tardivement. Ces résultats soulignent l'intérêt des stratégies ciblant l'autophagie dans la recherche de molécules efficaces dans les maladies conformationnelles des protéines. Ce composé, du fait de son profil pharmacologique et de pharmacovigilance bien connu chez l'Homme, est donc un candidat potentiel pour une étude de repositionnement en clinique humaine. Bien que le traitement associant la doxycycline et l'astemizole montre un allongement significatif du temps de survie ($p < 0,05$), nous n'avons pas pu observer d'effet synergique de cette association *in vivo*. L'effet de l'association est d'ailleurs moins significatif que le traitement par la doxycycline seule. Ce résultat décevant est très probablement dû au mode de délivrance des composés. Effectivement les deux molécules étaient contenues dans la pompe osmotique, il est possible que des réactions chimiques se soient produites, entraînant par exemple l'inactivation de l'un ou des deux composés. Cette hypothèse est confortée par l'observation, au cours du traitement, de lésions cutanées en regard du dispositif de délivrance chez certains animaux. Aucune des souris recevant un traitement unique n'a montré ce genre de lésions. Ce problème semble uniquement expérimental, aucune interaction médicamenteuse n'a été reportée pour ces deux molécules ayant déjà été administrées à l'Homme. Nous avons engagé une collaboration avec le laboratoire BioCIS (Biomolécules, Conception, Isolement, Synthèse ; Châtenay-Malabry), dirigé par Bruno Figadère, afin d'avoir une analyse du mélange des composés au cours du temps à 37°C. Ces résultats nous seront d'une grande aide dans la compréhension de nos observations. Une des perspectives de ce travail sera d'initier un traitement associatif en utilisant deux voies d'administration distinctes : *per os* pour la doxycycline et sous cutanée pour l'astemizole par exemple.

Notre étude a donc permis la validation de deux candidats rapidement disponibles pour la thérapie des maladies à prions humains. Ces traitements pourraient être administrés en association afin d'envisager une attaque plus agressive sur la progression de la maladie. Les nouvelles techniques de détection de la PrPsc à l'aide de la RT-QuIC à partir de LCR ou de muqueuses olfactives de patients, devraient permettre la pose d'un diagnostic de la MCJ plus précoce, dès les premiers symptômes et d'ainsi raccourcir le délai entre début clinique et diagnostic probable, qui prend en général plusieurs mois (Orru et al. 2014; McGuire et al. 2016; Haïk et al. 2014). La combinaison d'un diagnostic plus précoce et de thérapies associatives efficaces vis-à-vis des souches humaines porte l'espoir d'un possible tournant dans la prise en charge des maladies à prions.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Les prions sont responsables chez l'Homme et l'animal d'une neurodégénérescence dont l'évolution est rapidement fatale. D'autres maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer partagent avec les maladies à prions des caractéristiques comme l'accumulation et l'agrégation de protéines ainsi que certaines lésions histopathologiques. La raison pour laquelle l'accumulation d'A β dans un cas, et de PrPsc dans d'autres, entraîne une pathologie tau reste mal comprise. Nous avons abordé cette question en étudiant l'impact de PrP recombinantes mutées sur la phosphorylation anormale de la protéine tau. Les maladies à prions sont aussi des pathologies pour lesquelles aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour. Nous avons donc mis au point un modèle d'étude permettant l'évaluation *in vitro* de composés anti prion vis-à-vis des souches humaines.

Dans un premier temps nous avons étudié la physiopathologie de la protéine tau en réponse à la présence de différents assemblages de protéine PrP. Pour cela nous nous sommes appuyés sur des mutations du gène *PRNP* récemment décrites par l'équipe (Peoc'h et al. 2012). Ces mutations se situent au niveau du même codon, et il est intéressant de noter qu'une modification fine de la séquence de la protéine par la substitution d'un acide aminé par un autre, sur la même position, induit deux pathologies distinctes présentant des tableaux cliniques et lésionnels différents. L'exposition de neurones corticaux primaires à des PrP recombinantes portant ces mutations ont permis de caractériser plusieurs points dans cette relation protéine amyloïde-physiopathologie de la protéine tau. Tout d'abord ces outils moléculaires nous ont permis de reproduire *in vitro* la disparité observée chez les patients entre ces deux mutations, puisque l'effet obtenu était mutation E211-dépendant. Nous avons observé que le déclenchement d'une phosphorylation anormale de tau est aussi dépendant du type d'assemblage de PrP utilisé. Nos résultats sont en accord avec l'ensemble des données montrant une toxicité liée aux oligomères solubles plutôt qu'aux monomères (Weissmann et al. 2002; Kazlauskaite et al. 2005; Masel, Genoud, and Aguzzi 2005; Novitskaya et al. 2006; Haass and Selkoe 2007; Simoneau et al. 2007).

Toutefois nous avons pu observer dans notre modèle une dissociation entre l'induction d'une toxicité et celle d'une phosphorylation anormale de tau. Une hypothèse expliquant un

tel résultat serait que la phosphorylation anormale de tau aux stades précoces de la maladie serait le reflet d'un mécanisme de protection, par exemple en déstabilisant les microtubules afin de prévenir la propagation, via le transport axonal, des espèces toxiques, ou en protégeant contre l'apoptose (Lee et al. 2005; Wang and Wang 2015). La phosphorylation sur la sérine 262 de la protéine tau observée ici est d'ailleurs associée aux stades précoces de la MA (Augustinack et al. 2002; Schraen-Maschke et al. 2008). De plus, il a été rapporté que bien la phosphorylation en S262 entraîne le détachement de la protéine tau des microtubules (Biernat et al. 1993; Fischer et al. 2009), elle inhibe également l'agrégation de tau et la formation de paires de filaments hélicoïdaux (Schneider et al. 1999). En effet, la phosphorylation de la protéine tau en S262 est retrouvée lors de processus physiologiques et est nécessaire à la réorganisation des microtubules, pour permettre la croissance des neurites notamment (Biernat and Mandelkow 1999; Biernat et al. 2002).

Afin d'étudier plus précisément l'implication de la phosphorylation anormale de tau dans la toxicité cellulaire en réponse à la présence d'oligomères de protéines spécifiques, nous pourrions évaluer l'exposition de cultures primaires neuronales issues de souris KO pour la protéine tau à des concentrations élevées d'oligomères de PrP E211D par exemple (Tucker, Meyer, and Barde 2001).

Il sera également intéressant d'évaluer l'impact sur la survie cellulaire et la phosphorylation anormale de tau de l'exposition de cultures corticales à des formes fibrillaires des PrP recombinantes.

Enfin, l'étude des différents assemblages sur la toxicité neuronale et la physiopathologie de la protéine tau pourrait être complétée *in vivo* par l'injection stéréotaxique de monomères, d'oligomères et de fibres de PrP recombinantes, chez des souris ayant des niveaux d'expression de PrPc différents.

De plus nous avons démontré que la phosphorylation anormale de tau suite à la présence d'oligomères amyloïdes était partiellement PrPc dépendante. Ces résultats sont très intéressants, la toxicité neuronale induite par le peptide amyloïde A β étant elle aussi médiée par la PrPc (Lauren et al. 2009; Bate and Williams 2011; Kudo et al. 2012). Ainsi d'une façon générale, la PrPc semble impliquée dans la physiopathologie de la protéine tau en réponse à la présence de protéines ou de peptides amyloïdes au niveau de l'espace extracellulaire. Nos résultats indiquent que l'interaction de la PrPc avec les oligomères de PrP mutées la phosphorylation anormale de tau sur l'épitope pS262 via une action de la kinase PDK1, probablement médiée par la kinase PKA.

L'implication de la kinase PDK1 dans la MA n'a été jusqu'ici que très peu décrite et les études sur son action dans la physiopathologie de la maladie sont contradictoires. Ainsi il a été montré que la surexpression de PDK1 dans une lignée de cellules du système nerveux de rat (lignée B12), permet une résistance à la toxicité engendrée par le peptide A β (25-35) (Newington et al. 2012). Une autre étude montre que la mort neuronale induite par la toxicité du peptide A β (1-42), dans une lignée cellulaire dopaminergique (SN4741) comme dans des cultures neuronales primaires de rat et des cultures organotypiques d'hippocampe et de cortex entorhinal de rats, passe par voie PI3K/PDK1/nPKC/Rac1 (Manterola et al. 2013). Enfin, l'inhibition de la kinase PDK1 dans un modèle murin de MA (pathologie β amyloïde uniquement) améliore les troubles cognitifs et diminue la formation de plaques amyloïdes (Pietri et al. 2013). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'implication de PDK1 dans plusieurs voies de signalisation pouvant avoir des effets opposés. De plus la diversité des modèles d'étude peut influencer les résultats. Ainsi l'étude, dans des lignées de cellules, de kinases impliquées dans des voies de signalisation de survie est assez délicate, les voies de signalisation pouvant être altérées dans des cultures de cellules immortalisées (Xu and Zhong 2013). Les résultats de nos travaux, combinés à ceux de l'équipe de Benoit Schneider sont toutefois en faveur d'une action bénéfique des inhibiteurs de PDK1 sur certains stigmates lésionnels associés aux maladies à prions et de la MA.

L'activation potentielle de la PKA par la PrPc est intéressante. En effet il a été démontré que cette voie est impliquée dans la neuroprotection et la plasticité synaptique (Chiarini et al. 2002; Caiati et al. 2013). L'activation de la PKA par la PrPc serait due à l'interaction de la protéine de stress inductible 1 (STI-1) avec la PrPc (Lopes et al. 2005; Caetano et al. 2008). Le rôle de cette protéine STI-1 semble important dans la physiopathologie des tauopathies, puisqu'elle peut entrer en compétition avec les oligomères A β dans la liaison à la PrPc et ainsi permettre d'inhiber leurs effets toxiques (Ostapchenko et al. 2013).

Le rôle de la protéine PKA semble aussi important puisqu'elle est impliquée dans les mécanismes moléculaires de la mémoire (Kandel 2012). Or une étude a démontré un lien entre PrPc, PKA et mémoire (Coitinho et al. 2006). Les auteurs ont non seulement montré que l'interaction PrPc-laminine était essentielle dans la plasticité neurale impliquée dans la consolidation de la mémoire, mais aussi que cette action passait par l'activation des kinases PKA et ERK 1/2 via la PrPc. De plus, une autre étude a étudié l'implication de la PrPc dans la physiopathologie de la MA à l'aide d'un modèle murin (pathologie β amyloïde seule) croisé avec des souris *Prnp*^{-/-} (Gimbel et al. 2010). Les résultats montrent que bien que les souris

Prnp^{-/-} présentent une accumulation d'Aβ et la présence de plaques amyloïdes, elles ne montrent pas de troubles cognitifs caractéristiques de la MA (troubles de l'apprentissage et de la mémoire). Il se pourrait donc que les troubles mnésiques de la MA soient notamment médiés par l'axe PrPc/PDK1/PKA.

De plus, il a été montré que les héparanes sulfates, ligands connus de la PrPc, étaient aussi impliquées dans la phosphorylation anormale de tau. En effet celles-ci sont co-localisées avec les DNF dans les neurones affectés lors de la MA (Snow et al. 1990; Goedert et al. 1996; Hernandez et al. 2002). L'expression de l'enzyme HS3ST, ou heparan sulphate (glucosamine) 3-O-sulphotransferase 2, qui génère des domaines héparane 3-O-sulfatés, est augmentée au niveau des hippocampes de patients atteints de la MA (Sepulveda-Diaz et al. 2015). Il a été montré que les produits héparane-3-O-sulfatés de cette enzyme sont capables d'être internalisés et d'interagir directement avec la protéine tau, favorisant sa phosphorylation anormale, notamment en position S262 (Sepulveda-Diaz et al. 2015). De façon très intéressante, l'inhibition de l'expression de l'enzyme HS3ST2 dans un modèle *in vivo* de poisson zèbre exprimant une protéine tau humaine mutée (P301L) permet réduire la phosphorylation anormale de tau et de conserver l'intégrité des axones moteurs. Il est intéressant de noter que certains HSPG transmembranaires comme le syndecan-1 sont capables de moduler l'activité de PDK1 (Hu et al. 2010).

Nous pourrions tirer avantage du modèle *C. elegans* afin d'étudier de plus près ces voies impliquées dans la physiopathologie de tau en réponse à la présence de protéines (WT, E211D, E211Q) ou de peptides amyloïdes. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'ARN interférents nous permettrons de mettre en avant les implications de chaque protéine dans les cascades de signalisation.

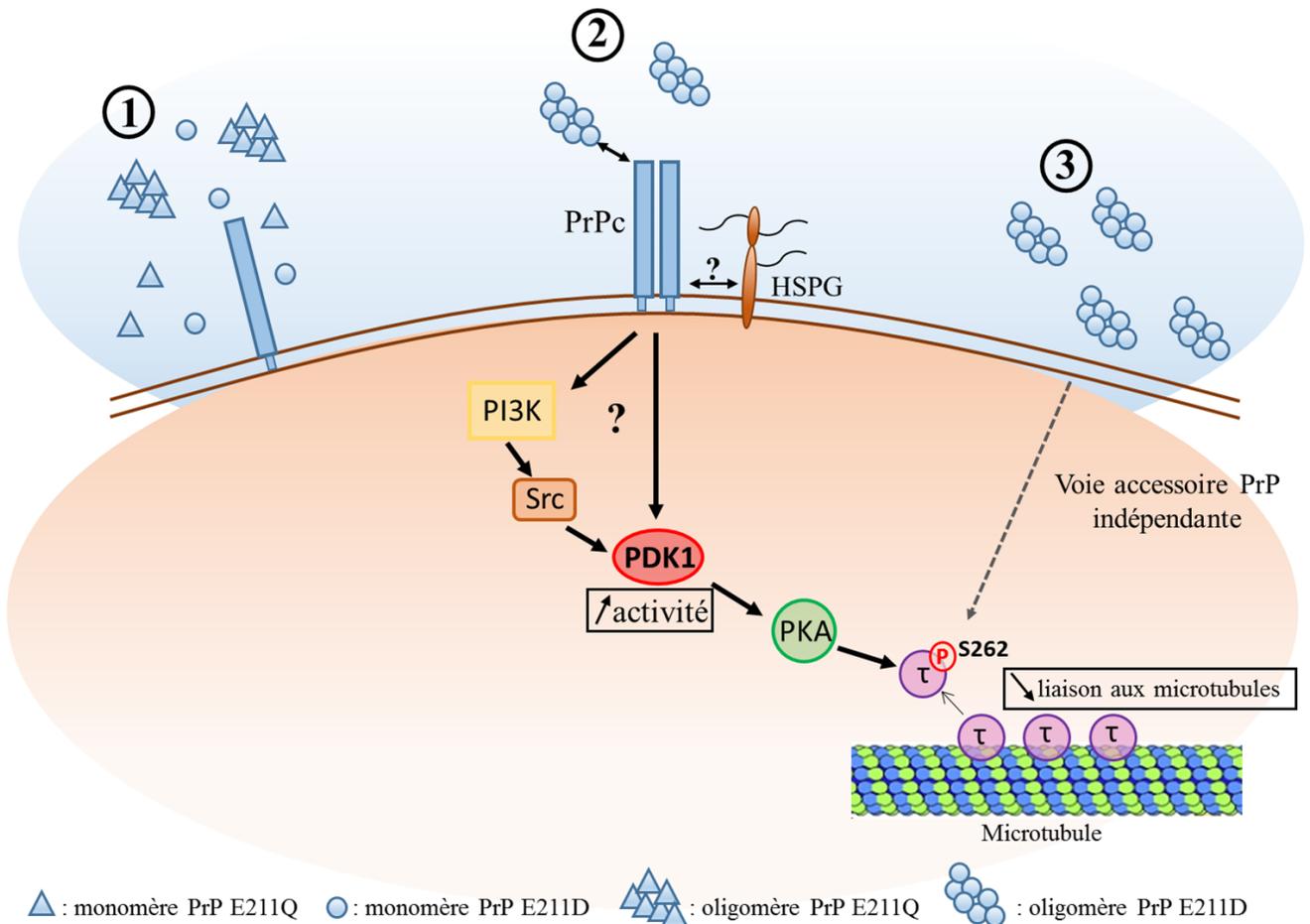


Figure 34 : Cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation anormale de tau.

- 1 : La présence de monomères de PrP mutés ou d'oligomères de PrP E211Q n'a pas d'effet sur la phosphorylation anormale de la protéine tau.
- 2 : Les oligomères de PrP E211D interagissent avec la PrPc, entraînant l'activation de PDK1, possiblement médiée par PI3K et Src (Checler 2013). L'activation de PDK1 aboutit à la phosphorylation de tau en sérine 262, diminuant fortement son affinité pour les microtubules. Cette phosphorylation est probablement due à l'activation de la PKA et serait favorisée par la présence de protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG).
- 3 : En l'absence de PrPc, les oligomères de PrP E211D semblent être capables d'induire la phosphorylation anormale de tau en S262. Nos travaux ne nous permettent pas de définir la voie accessoire qui est activée dans ces conditions.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à la thérapeutique des maladies à prions. En effet, il semblait urgent de pouvoir compter sur un modèle *in vitro* pertinent permettant d'évaluer l'efficacité de plusieurs composés anti-prions sur la réplication d'agents humains. Nous avons développé le premier modèle cellulaire d'infection par des isolats

humains non préalablement stabilisés chez la souris, à l'aide de souris transgéniques surexprimant la PrPc humaine. Ce modèle permet l'évaluation de molécules anti-prion et semble réellement prédictif puisque les composés efficaces en cultures démontrent aussi une efficacité *in vivo*, même à un stade tardif, chez des animaux infectés à l'aide de souches humaines. L'analyse des cerveaux des souris traitées visant à évaluer les bénéfices éventuels au niveau de l'accumulation de PrPsc et de la mort neuronale est en cours. Même s'ils doivent être confirmés *in vivo*, nos résultats concernant l'utilisation d'associations médicamenteuses sont encourageants et apportent l'espoir de pouvoir proposer rapidement une évaluation clinique de cette association, les molécules sélectionnées ayant déjà été administrées à l'Homme.

Nous pourrions tirer avantage de ce modèle de propagation des souches humaines pour propager des isolats de maladie à prions associée à une tauopathie (vCJD, GSS). L'évaluation de la perte neuronale associée à la réplication dans ce modèle et sa corrélation avec la survenue d'une tauopathie selon les souches propagées permettra d'évaluer l'impact de la phosphorylation de tau sur la survie. Ce modèle développé permettra aussi d'évaluer *in vitro* l'effet d'inhibiteurs de phosphorylation de tau sur la propagation axonale de souches humaines. Il nécessite de croiser les lignées surexprimant la PrP (humaine ou bovine) et la protéine tau humaine sur un fond PrP^{-/-} et tau murine^{-/-}.

Afin de mieux caractériser l'impact de la protéine tau dans la physiopathologie de ces maladies et dans le relais de la toxicité induite par la PrPsc, nous pourrions étudier la propagation de ces souches sur des cultures issues de souris KO pour la protéine tau.

L'équipe de Bruce Chesebro a très récemment étudié l'effet de l'expression de la protéine tau humaine sur le développement de maladies à prions induites par l'inoculation de souches de tremblante chez des souris (Race et al. 2016). Les premières observations montrent que l'expression de la protéine tau humaine n'accentue pas les symptômes et la sévérité de la maladie. Au contraire, les souris exprimant la protéine tau humaine montrent une légère amélioration du temps de survie ($p < 0,05$). L'étude de tau au niveau du cerveau montre une hyperphosphorylation majoritairement visible sur la protéine tau humaine et non sur la protéine tau murine, les auteurs n'observent pas d'augmentation de lésions neuropathologiques associées au marquage de tau. Ces résultats sont en accord avec le rôle neuroprotecteur possible des modifications de tau, bien que les auteurs n'en discutent pas. Le modèle d'étude proposé a ses propres limites. En effet les souris expriment à la fois une PrP

wild-type et une PrP mutée, sans ancre GPI, et expriment deux séquences de la protéine tau. La même étude pourrait être réalisée dans un modèle murin déplété en tau murine et exprimant la protéine tau humaine non mutée au niveau basal, mais les résultats seraient faussés puisqu'un tel modèle développe une tauopathie, avec hyperphosphorylation et agrégation de tau (Andorfer et al. 2003).

L'approche *in vitro* permettant la propagation de différentes souches de prions sur des cultures primaires issues de différentes lignées murines, exprimant une protéine tau humaine ou murine pourrait donc être une bonne approche afin d'évaluer rapidement les effets des interactions PrP-tau sur l'évolution de la pathologie.

Les modèles d'étude les plus proches de l'Homme sont les primates non-humains, il pourrait donc être intéressant d'étudier les cerveaux de macaques infectés par l'ESB. En effet, l'infection de singes écureuils par l'ESB a engendré une tauopathie caractérisée par de larges dépôts de protéine tau AT8 positive, sans plaque amyloïde associée (Piccardo et al. 2012). De plus une autre étude a mis en avant que la phosphorylation de tau par la kinase PKA était aussi retrouvée dans le cerveau de singes au cours du vieillissement (Carlyle et al. 2014). Ce modèle d'étude semble donc être particulièrement intéressant afin de mieux caractériser la cinétique d'apparition de la pathologie tau, son rapport avec l'apparition d'une PrP anormale détectable et son lien avec l'apparition de plaques amyloïdes de type floride.

Enfin, nous pourrions évaluer *in vivo* l'effet d'inhibiteurs de la phosphorylation de tau et de composés anti prions, seuls ou en association, dans les lignées de *C. elegans* portant des mutations responsables de GSS, et dans un modèle *in vivo* de souris transgéniques surexprimant la PrPc humaine et inoculées par des souches de prions induisant une tauopathie. Il sera donc intéressant d'évaluer l'efficacité de ces différents traitements sur la survenue d'une tauopathie, la propagation des prions, la survie et la fonction neuronale.

Nos travaux ont permis la mise en place d'un modèle d'étude *in vitro* à l'aide de cultures primaires de neurones permettant la propagation de souches de prions humains. Ce modèle est pertinent pour l'évaluation de composés anti-prion, en vue de la mise en place de traitements associatifs efficaces en clinique humaine.

Ce modèle d'étude nous a aussi permis d'étudier la relation entre des assemblages spécifiques de PrP et la survenue d'une pathologie tau. Nous avons ainsi caractérisé une nouvelle voie impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau en réponse à la présence d'oligomères spécifiques. Cette voie implique l'activation de la kinase PDK1 dont le rôle

dans l'accumulation et la toxicité du peptide A β et de la PrP a récemment été décrite, notamment à l'aide du modèle de cultures primaires infectées mis en place dans l'équipe (Pietri et al. 2013). Nos travaux ouvrent donc une perspective nouvelle de recherche physiopathologique et thérapeutique dans MA, l'implication de cette voie dans la relation entre pathologies β -amyloïde et tau restant à démontrer. Soulignons que l'extension des lésions tau neurofibrillaires corrèle le mieux avec le stade clinique des patients atteints de MA et que, suite aux échecs rencontrés dans les stratégies anti-A β , la phosphorylation et l'agrégation de tau sont actuellement considérées comme des cibles particulièrement pertinentes dans les recherches visant à modifier l'évolution de la pathologie (Iqbal, Liu, and Gong 2016).

De manière plus générale, les avancées et les perspectives de ce travail pourront amener à une meilleure compréhension de la survenue d'une pathologie tau suite à la présence d'assemblages pathologiques de protéines, et à la recherche de traitements efficaces dans d'autres maladies du SNC associées à l'agrégation anormale de protéines.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides, S.E. Scherer, P.W. Li, Hoskins RA, Galle RF, and et al. 2000. 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science*, 287: 2185-95.
- Adjou, K. T., R. Demaimay, C. Lasmezas, J. P. Deslys, M. Seman, and D. Dormont. 1995. 'MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie', *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 2810-12.
- Adjou, K. T., J. P. Deslys, R. Demaimay, and D. Dormont. 1997. 'Probing the dynamics of prion diseases with amphotericin B', *Trends Microbiol*, 5: 27-31.
- Adjou, K. T., N. Privat, S. Demart, J. P. Deslys, M. Seman, J. J. Hauw, and D. Dormont. 2000. 'MS-8209, an amphotericin B analogue, delays the appearance of spongiosis, astrogliosis and PrPres accumulation in the brain of scrapie-infected hamsters', *J Comp Pathol*, 122: 3-8.
- Adjou, K. T., S. Simoneau, N. Sales, F. Lamoury, D. Dormont, D. Papy-Garcia, D. Barritault, J. P. Deslys, and C. I. Lasmezas. 2003. 'A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases', *J Gen Virol*, 84: 2595-603.
- Aguib, Yasmine, Andreas Heiseke, Sabine Gilch, Constanze Riemer, Michael Baier, Alexa Ertmer, and Hermann M. Schätzl. 2009. 'Autophagy induction by trehalose counter-acts cellular prion-infection', *Autophagy*, 5: 361-69.
- Aguzzi, A., F. Baumann, and J. Bremer. 2008. 'The prion's elusive reason for being', *Annu Rev Neurosci*, 31: 439-77.
- Alzualde, A., B. Indakoetxea, I. Ferrer, F. Moreno, M. Barandiaran, A. Gorostidi, A. Estanga, I. Ruiz, M. Calero, F. W. van Leeuwen, B. Atares, R. Juste, A. B. Rodriguez-Martinez, and A. Lopez de Munain. 2010. 'A Novel PRNP Y218N Mutation in Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease With Neurofibrillary Degeneration', *J Neuropathol Exp Neurol*, 69: 789-800.
- Andorfer, Cathy, Yvonne Kress, Marisol Espinoza, Rohan De Silva, Kerry L. Tucker, Yves-Alain Barde, Karen Duff, and Peter Davies. 2003. 'Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms', *Journal of Neurochemistry*, 86: 582-90.
- Andre, R., and S. J. Tabrizi. 2012. 'Misfolded PrP and a novel mechanism of proteasome inhibition', *Prion*, 6: 32-6.
- Andreoletti, O., N. Morel, C. Lacroux, V. Rouillon, C. Barc, G. Tabouret, P. Sarradin, P. Berthon, P. Bernardet, J. Mathey, S. Lugan, P. Costes, F. Corbiere, J. C. Espinosa, J. M. Torres, J. Grassi, F. Schelcher, and F. Lantier. 2006. 'Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep', *J Gen Virol*, 87: 1043-6.
- Archer, F., C. Bachelin, O. Andreoletti, N. Besnard, G. Perrot, C. Langevin, A. Le Dur, D. Vilette, A. Baron-Van Evercooren, J. L. Vilotte, and H. Laude. 2003. 'Cultured Peripheral Neuroglial Cells Are Highly Permissive to Sheep Prion Infection', *Journal of Virology*, 78: 482-90.
- Arendt, T., J. Stierli, A. M. Strijkstra, R. A. Hut, J. Rüdiger, E. A. Van der Zee, T. Harkany, M. Holzer, and W. Härtig. 2003. 'Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals', *J Neurosci*, 23: 6972-81.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, and B. T. Hyman. 1992. 'Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease', *Neurology*, 42: 631-39.
- Asante, E. A., I. Gowland, A. Grimshaw, J. M. Linehan, M. Smidak, R. Houghton, O. Osiguwa, A. Tomlinson, S. Joiner, S. Brandner, J. D. Wadsworth, and J. Collinge. 2009. 'Absence of spontaneous disease and comparative prion susceptibility of transgenic mice expressing mutant human prion proteins', *J Gen Virol*, 90: 546-58.
- Asante, E. A., J. M. Linehan, M. Smidak, A. Tomlinson, A. Grimshaw, A. Jeelani, T. Jakubcova, S. Hamdan, C. Powell, S. Brandner, J. D. Wadsworth, and J. Collinge. 2013. 'Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein', *PLoS Pathog*, 9: e1003643.

- Atarashi, R., K. Satoh, K. Sano, T. Fuse, N. Yamaguchi, D. Ishibashi, T. Matsubara, T. Nakagaki, H. Yamanaka, S. Shirabe, M. Yamada, H. Mizusawa, T. Kitamoto, G. Klug, A. McGlade, S. J. Collins, and N. Nishida. 2011. 'Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion', *Nat Med*, 17: 175-8.
- Atarashi, R., J. M. Wilham, L. Christensen, A. G. Hughson, R. A. Moore, L. M. Johnson, H. A. Onwubiko, S. A. Priola, and B. Caughey. 2008. 'Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking', *Nat Med*, 5: 211-12.
- Atkin, J. D., M. A. Farg, A. K. Walker, C. McLean, D. Tomas, and M. K. Horne. 2008. 'Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiol Dis*, 30: 400-7.
- Augustinack, J. C., A. Schneider, E. M. Mandelkow, and B. T. Hyman. 2002. 'Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease.', *Acta Neuropathol*, 103: 26-35.
- Baron, G. S., A. C. Magalhaes, M. A. Prado, and B. Caughey. 2006. 'Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res', *J Virol*, 80: 2106-17.
- Barret, A., F. Tagliavini, G. Forloni, C. Bate, M. Salmona, L. Colombo, A. De Luigi, L. Limido, S. Suardi, G. Rossi, F. Auvre, K. T. Adjou, N. Sales, A. Williams, C. Lasmezas, and J. P. Deslys. 2003. 'Evaluation of Quinacrine Treatment for Prion Diseases', *Journal of Virology*, 77: 8462-69.
- Baskakov, I. V. 2004. 'Autocatalytic conversion of recombinant prion proteins displays a species barrier', *J Biol Chem*, 279: 7671-7.
- Baskakov, I. V., G. Legname, M. A. Baldwin, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 2002. 'Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid', *J Biol Chem*, 277: 21140-8.
- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Wälchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. 1986. 'Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene', *Cell*, 46: 417-28.
- Bate, C., S. Reid, and A. Williams. 2001. 'Killing of prion-damaged neurones by microglia', *Neuroreport*, 12: 2589-94.
- Bate, C., and A. Williams. 2011. 'Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins', *J Biol Chem*, 286: 37955-63.
- Bautista, M. J., J. Gutierrez, F. J. Salguero, M. M. Fernandez de Marco, J. L. Romero-Trevejo, and J. C. Gomez-Villamandos. 2006. 'BSE infection in bovine PrP transgenic mice leads to hyperphosphorylation of tau-protein', *Vet Microbiol*, 115: 293-301.
- Baxa, U., R. B. Wickner, A. C. Steven, D. E. Anderson, L. N. Marekov, W. M. Yau, and R. Tycko. 2007. 'Characterization of beta-sheet structure in Ure2p1-89 yeast prion fibrils by solid-state nuclear magnetic resonance', *Biochem*, 46: 13149-62.
- Baylis, M., and W. Goldmann. 2004. 'The genetics of scrapie in sheep and goats', *Curr Mol Med*, 4: 385-96.
- Bazan, J. F., R. J. Fletterick, M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. 1987. 'Predicted secondary structure and membrane topology of the scrapie prion protein', *Protein Eng*, 1: 125-35.
- Beach, T. G.
- Walker, R., and E. G. Mc Geer. 1989. 'Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum', *Glia*, 2: 420-36.
- Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schönheit, M. A. Tranulis, and B. Bratberg. 2003. 'Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98', *Vet Rec*, 153: 202-08.
- Benito-León, J. 2004. 'Combined quinacrine and chlorpromazine therapy in fatal familial insomnia', *Clin Neuropharmacol*, 27: 201-03.
- Béringue, V., L. Herzog, E. Jaumain, F. Reine, P. Sibille, A. Le Dur, J. L. Vilotte, and H. Laude. 2012. 'Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue', *Science*, 335: 472-75.
- Béringue, V., A. Le Dur, P. Tixador, F. Reine, L. Lepourry, A. Perret-Liaudet, S. Haïk, J. L. Vilotte, M. Fontes, and H. Laude. 2008. 'Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD', *PLoS One*, 3: e1419.

- Beringue, V., D. Vilette, G. Mallinson, F. Archer, M. Kaisar, M. Tayebi, G. S. Jackson, A. R. Clarke, H. Laude, J. Collinge, and S. Hawke. 2004. 'PrP^{Sc} binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines', *J Biol Chem*, 279: 39671-6.
- Berry, D. B., D. Lu, M. Geva, J. C. Watts, S. Bhardwaj, A. Oehler, A. R. Renslo, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and K. Giles. 2013. 'Drug resistance confounding prion therapeutics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: e4160-69.
- Bessen, R. A., and R. F. Marsh. 1992. 'Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters', *J Gen Virol*, 73: 329-34.
- . 1994. 'Distinct PrP Properties Suggest the Molecular Basis of Strain Variation in Transmissible Mink Encephalopathy', *J Virol*, 68: 7859-68.
- Bessen, R. A., H. Shearin, S. Martinka, R. Boharski, D. Lowe, J. M. Wilham, B. Caughey, and J. A. Wiley. 2010. 'Prion shedding from olfactory neurons into nasal secretions', *PLoS Pathog*, 6: e1000837.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1993. 'Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding', *Neuron*, 11: 153-63.
- Biernat, J., and E. M. Mandelkow. 1999. 'The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains', *Mol Biol Cell*, 10: 727-40.
- Biernat, J., Y. Z. Wu, T. Timm, Q. Zheng-Fischhofer, E. Mandelkow, L. Meijer, and E. M. Mandelkow. 2002. 'Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity', *Mol Biol Cell*, 13: 4013-28.
- Bishop, M. T., R. G. Will, and J. C. Manson. 2010. 'Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 12005-10.
- Bizat, N., J. M. Peyrin, S. Haïk, V. Cochois, P. Beaudry, J. L. Laplanche, and C. Neri. 2010. 'Neuron dysfunction is induced by prion protein with an insertional mutation via a Fyn kinase and reversed by sirtuin activation in *Caenorhabditis elegans*', *J Neurosci*, 30: 5394-403.
- Bocharova, O. V., L. Breydo, A. S. Parfenov, V. V. Salnikov, and I. V. Baskakov. 2005. 'In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc)', *J Mol Biol*, 346: 645-59.
- Bosque, P. J., and S. B. Prusiner. 2000. 'Cultured Cell Sublines Highly Susceptible to Prion Infection', *J Virol*, 74: 4377-86.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathol*, 82: 239-59.
- Brandel, J. P., C. A. Heath, M. W. Head, E. Levavasseur, R. Knight, J. L. Laplanche, J. P. Langeveld, J. W. Ironside, J. J. Hauw, J. Mackenzie, A. Alperovitch, R. G. Will, and S. Haïk. 2009. 'Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain', *Ann Neurol*, 65: 249-56.
- Brandel, J. P., L. Peckeu, and S. Haïk. 2013. 'The French surveillance network of Creutzfeldt-Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide', *Transfus Clin Biol*, 20: 395-7.
- Bremer, J., F. Baumann, C. Tiberi, C. Wessig, H. Fischer, P. Schwarz, A. D. Steele, K. V. Toyka, K. A. Nave, J. Weis, and A. Aguzzi. 2010. 'Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance', *Nat Neurosci*, 13: 310-8.
- Brenner, S. 1974. 'THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS', *Genetics*, 77: 71-94.
- Brown, D. R. 2001. 'Copper and prion disease.', *Brain Res Bull*, 55: 165-73.
- Brown, K. L., J. Brown, D. L. Ritchie, N. Sales, and J. R. Fraser. 2001. 'Fetal cell grafts provide long-term protection against scrapie induced neuronal loss', *Neuroreport*, 12: 77-82.
- Bruce, M. E., I. McConnell, H. Fraser, and A. G. Dickinson. 1991. 'The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis', *J Gen Virol*, 72: 595-603.
- Bruce, M.E., P. A. McBride, and C. F. Farquhar. 1989. 'Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie', *Neurosci Lett*, 102: 1-6.
- Bruce, M.E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCordle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C. J. Bostock. 1997. 'Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent', *Nature*, 389: 498-501.

- Buchholz, C. J., P. Bach, D. Nikles, and U. Kalinke. 2006. 'Prion protein-specific antibodies for therapeutic intervention of transmissible spongiform encephalopathies', *Expert Opin Biol Ther*, 6: 293-300.
- Buée, L., T. Bussièrre, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, and P.R. Hof. 2000. 'Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders', *Brain Res Brain Res Rev*, 33: 95-130.
- Büeler, H., A. Aguzzi, A. Saller, R.-A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann. 1993. 'Mice devoid of PrP are resistant to scrapie', *Cell*, 73: 1339-47.
- Büeler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. 1992. 'Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein', *Nature*, 356: 577-82.
- Buschmann, A., G. Luhken, J. Schultz, G. Erhardt, and M. H. Groschup. 2004. 'Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR)', *J Gen Virol*, 85: 2727-33.
- Buschmann, A., E. Pfaff, K. Reifenberg, H. M. Müller, and M. H. Groschup. 2000. 'Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP(C)', *Arch Virol Suppl*, 16: 75-86.
- Butler, D. A., M. R. D. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury, and S. B. Prusiner. 1988. 'Scrapie-Infected Murine Neuroblastoma Cells Produce Protease-Resistant Prion Proteins', *J Virol*, 62: 1558-64.
- Caetano, F. A., M. H. Lopes, G. N. Hajj, C. F. Machado, C. Pinto Arantes, A. C. Magalhaes, P. Vieira Mde, T. A. Americo, A. R. Massensini, S. A. Priola, I. Vorberg, M. V. Gomez, R. Linden, V. F. Prado, V. R. Martins, and M. A. Prado. 2008. 'Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1', *J Neurosci*, 28: 6691-702.
- Caiati, M. D., V. F. Safiulina, G. Fattorini, S. Sivakumaran, G. Legname, and E. Cherubini. 2013. 'PrPC controls via protein kinase A the direction of synaptic plasticity in the immature hippocampus', *J Neurosci*, 33: 2973-83.
- Caillet-Boudin, M. L., F. J. Fernandez-Gomez, H. Tran, C. M. Dhaenens, L. Buee, and N. Sergeant. 2014. 'Brain pathology in myotonic dystrophy: when tauopathy meets spliceopathy and RNAopathy', *Front Mol Neurosci*, 6: 57.
- Cameron, H. A., and R. D. McKay. 2001. 'Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus', *J Comp Neurol*, 435: 406-17.
- Caparros-Lefebvre, D., and A. J. Lees. 2005. 'Atypical unclassifiable parkinsonism on Guadeloupe: an environmental toxic hypothesis', *Mov Disord*, 20 Suppl 12: S114-8.
- Cardinale, A., and S. Biocca. 2013. 'Gene-based antibody strategies for prion diseases', *Int J Cell Biol*, 2013: 710406.
- Carlson, G. A., C. Ebeling, S. L. Yang, G. C. Telling, M. Torchia, D. Groth, D. Westaway, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1994. 'Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 5690-94.
- Carlyle, B. C., A. C. Nairn, M. Wang, Y. Yang, L. E. Jin, A. A. Simen, B. P. Ramos, K. A. Craft Bordner, G. E., P. Davies, M. Pletikos, N. Sestan, A. F. Arnsten, and C. D. Paspalas. 2014. 'cAMP-PKA phosphorylation of tau confers risk for degeneration in aging association cortex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 5036-41.
- Carrell, Robin W., and David A. Lomas. 1997. 'Conformational disease', *The Lancet*, 350: 134-38.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto. 2005. 'In vitro generation of infectious scrapie prions', *Cell*, 121: 195-206.
- Castilla, Joaquín, Paula Saá, Rodrigo Morales, Karim Abid, Kinsey Maundrell, and Claudio Soto. 2006. 'Protein Misfolding Cyclic Amplification for Diagnosis and Prion Propagation Studies', 412: 3-21.
- Caughey, B., and R. E. Race. 1992. 'Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red', *J Neurochem*, 59: 768-71.
- Caughey, B., and G. J. Raymond. 1993. 'Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells', *J Virol*, 67: 643-50.

- Caughey, B., G. J. Raymond, D. Ernst, and R. E. Race. 1991. 'N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state', *J Virol*, 65: 6597-603.
- Caughey, B., G. J. Raymond, D. A. Kocisko, and P. T. Lansbury. 1997. 'Scrapie Infectivity Correlates with Converting Activity, Protease Resistance, and Aggregation of Scrapie Associated Prion Protein in Guanidine Denaturation Studies', *J Virol*, 71: 4107-10.
- Caughey, B., L. D. Raymond, G. J. Raymond, L. Maxson, J. Silveira, and G. S. Baron. 2003. 'Inhibition of Protease-Resistant Prion Protein Accumulation In Vitro by Curcumin', *Journal of Virology*, 77: 5499-502.
- Chabry, J., B. Caughey, and B. Chesebro. 1998. 'Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides', *J Biol Chem*, 273: 13203-07.
- Chabry, J., C. Ratsimanohatra, I. Sponne, P. P. Elena, J. P. Vincent, and T. Pillot. 2003. 'In Vivo and In Vitro Neurotoxicity of the Human Prion Protein (PrP) Fragment P118 –135 Independently of PrP Expression', *J Neurosci*, 23: 462-69.
- Chalfie, M., and J. E. Sulston. 1981. 'Developmental Genetics of the Mechanosensory Neurons of *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 82: 358-70.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. 'Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression', *Science*, 263: 802-05.
- Chandler, R. L. 1961. 'Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material', *Lancet*, 1: 1378-79.
- Checler, F. 2013. 'Alzheimer's and prion diseases: PDK1 at the crossroads', *Nat Med*, 19: 1088-90.
- Chen, S. G., and P. Gambetti. 2002. 'A journey through the species barrier', *Neuron*, 34: 854-6.
- Cheng, X., Y. Ma, M. Moore, B. A. Hemmings, and S. S. Taylor. 1998. 'Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 9849-54.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, and J. M. Keith. 1985. 'Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain', *Nature*, 315: 331-33.
- Chiarini, L. B., A. R. O. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins, and R. Linden. 2002. 'Cellular prion protein transduces neuroprotective signals', *EMBO J*, 21: 3317-26.
- Choi, S. H., Y. H. Kim, M. Hebisch, C. Sliwinski, S. Lee, C. D'Avanzo, H. Chen, B. Hooli, C. Asselin, J. Muffat, J. B. Klee, C. Zhang, B. J. Wainger, M. Peitz, D. M. Kovacs, C. J. Woolf, S. L. Wagner, R. E. Tanzi, and D. Y. Kim. 2014. 'A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease', *Nature*, 515: 274-8.
- Clarke, M. C., and D. A. Haig. 1970. 'Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture', *Nature*, 225: 100-01.
- Cobb, N. J., F. D. Sonnichsen, H. McHaourab, and W. K. Surewicz. 2007. 'Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 18946-51.
- Cohen, O. S., J. Chapman, A. D. Korczyn, N. Warman-Alaluf, Z. Nitsan, S. Appel, E. Kahana, and H. Rosenmann. 2015. 'CSF tau correlates with CJD disease severity and cognitive decline', *Acta Neurol Scand*.
- Coitinho, A. S., A. R. Freitas, M. H. Lopes, G. N. Hajj, R. Roesler, R. Walz, J. I. Rossato, M. Cammarota, I. Izquierdo, V. R. Martins, and R. R. Brentani. 2006. 'The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation', *Eur J Neurosci*, 24: 3255-64.
- Colby, D. W., Q. Zhang, S. Wang, D. Groth, G. Legname, D. Riesner, and S. B. Prusiner. 2007. 'Prion detection by an amyloid seeding assay', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20914-9.
- Colling, S. B., J. Collinge, and J. G. Jefferys. 1996. 'Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca²⁺-activated K⁺ currents', *Neurosci Letters*, 209: 49-52.
- Collinge, J., and A. R. Clarke. 2007. 'A general model of prion strains and their pathogenicity', *Science*, 18: 930-36.
- Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. L. Sidle, I. Gowland, R. Medori, J. W. Ironside, and P. Lantos. 1995. 'Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals', *Lancet*, 346: 569-70.
- Collinge, J., K. C. L. Sidle, J. Meads, J. W. Ironside, and A. F. Hill. 1996. 'Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD', *Nature*, 383.

- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. L. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, and J. G. Jefferys. 1994. 'Prion protein is necessary for normal synaptic function', *Nature*, 370: 295-97.
- Collinge, John, Michele Gorham, Fleur Hudson, Angus Kennedy, Geraldine Keogh, Suvankar Pal, Martin Rossor, Peter Rudge, Durre Siddique, Moira Spyer, Dafydd Thomas, Sarah Walker, Tom Webb, Steve Wroe, and Janet Darbyshire. 2009. 'Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial', *The Lancet Neurology*, 8: 334-44.
- Collins, S. J., V. Lewis, M. Brazier, A. F. Hill, A. Fletcher, and C. L. Masters. 2002. 'Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model', *Ann Neurol*, 52: 503-6.
- Cortelli, P., P. Gambetti, P. Montagna, and E. Lugaresi. 1999. 'Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics', *J Sleep Res*, 8: 23-29.
- Cortes, C. J., K. Qin, J. Cook, A. Solanki, and J. A. Mastrianni. 2012. 'Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease', *J Neurosci*, 32: 12396-405.
- Courageot, M. P., N. Daude, R. Nonno, S. Paquet, M. A. Di Bari, A. Le Dur, J. Chapuis, A. F. Hill, U. Agrimi, H. Laude, and D. Vilette. 2008. 'A cell line infectible by prion strains from different species', *J Gen Virol*, 89: 341-7.
- Cramm, M., M. Schmitz, A. Karch, E. Mitrova, F. Kuhn, B. Schroeder, A. Raeber, D. Vargas, Y. S. Kim, K. Satoh, S. Collins, and I. Zerr. 2016. 'Stability and Reproducibility Underscore Utility of RT-QuIC for Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease', *Mol Neurobiol*, 53: 1896-904.
- Cramm, M., M. Schmitz, A. Karch, S. Zafar, D. Vargas, E. Mitrova, B. Schroeder, A. Raeber, F. Kuhn, and I. Zerr. 2015. 'Characteristic CSF prion seeding efficiency in humans with prion diseases', *Mol Neurobiol*, 51: 396-405.
- Cronier, S., V. Beringue, A. Bellon, J. M. Peyrin, and H. Laude. 2007. 'Prion strain- and species-dependent effects of anti-prion molecules in primary neuronal cultures', *J Virol*, 81: 13794-800.
- Cronier, S., H. Laude, and J. M. Peyrin. 2004. 'Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 12271-6.
- Crozet, C., Y. L. Lin, C. Metting, C. Mourton-Gilles, P. Corbeau, S. Lehmann, and V. Perrier. 2004. 'Inhibition of PrPSc formation by lentiviral gene transfer of PrP containing dominant negative mutations', *J Cell Sci*, 117: 5591-97.
- Cuillé, J., and P. L. Chelle. 1936. 'La tremblante du mouton est bien inoculable', *C. R. Acad. Sci. Paris*, 206: 78-79.
- D'Avanzo, C., J. Aronson, Y. H. Kim, S. H. Choi, R. E. Tanzi, and D. Y. Kim. 2015. 'Alzheimer's in 3D culture: challenges and perspectives', *Bioessays*, 37: 1139-48.
- David, A. S., R. Grant, and J. P. Ballantyne. 1984. 'Unsuccessful treatment of Creutzfeldt-Jakob disease with acyclovir', *Lancet*, 1: 512-13.
- De Luigi, A., L. Colombo, L. Diomede, R. Capobianco, M. Mangieri, C. Miccolo, L. Limido, G. Forloni, F. Tagliavini, and M. Salmona. 2008. 'The efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection', *PLoS One*, 3: e1888.
- De Mario, A., A. Castellani, C. Peggion, M. L. Massimino, D. Lim, A. F. Hill, M. C. Sorgato, and A. Bertoli. 2015. 'The prion protein constitutively controls neuronal store-operated Ca(2+) entry through Fyn kinase', *Front Cell Neurosci*, 9: 416.
- Debburman, S. K., G. J. Raymond, B. Caughey, and S. Lindquist. 1997. 'Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 13938-43.
- Demaimay, R., K. T. Adjou, V. Beringue, S. Demart, C. Lasmezas, J. P. Deslys, M. Seman, and D. Dormont. 1997. 'Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters', *J Virol*, 71: 9685-89.
- Demaimay, R., R. Race, and B. Chesebro. 1999. 'Effectiveness of polyene antibiotics in treatment of transmissible spongiform encephalopathy in transgenic mice expressing Syrian hamster PrP only in neurons', *J Virol*, 73: 3511-13.
- Deriziotis, P., R. Andre, D. M. Smith, R. Goold, K. J. Kinghorn, M. Kristiansen, J. A. Nathan, R. Rosenzweig, D. Krutauz, M. H. Glickman, J. Collinge, A. L. Goldberg, and S. J. Tabrizi. 2011. 'Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry', *EMBO J*, 30: 3065-77.

- Dickinson, A. 1975. 'Host-pathogen interactions in scrapie', *Genetics*, 79: 387-95.
- Diringer, H., and B. Ehlers. 1991. 'Chemoprophylaxis of scrapie in mice', *J Gen Virol*, 72: 457-60.
- Dlagic, W. M., E. Grigg, and R. A. Bessen. 2007. 'Prion infection of muscle cells in vitro', *J Virol*, 81: 4615-24.
- Doble, A. 1996. 'The pharmacology and mechanism of action of riluzole', *Neurology*, 47: S233-41.
- Doh-ura, K., K. Ishikawa, I. Murakami-Kubo, K. Sasaki, S. Mohri, R. Race, and T. Iwaki. 2004. 'Treatment of Transmissible Spongiform Encephalopathy by Intraventricular Drug Infusion in Animal Models', *Journal of Virology*, 78: 4999-5006.
- Doh-ura, K., T. Iwaki, and B. Caughey. 2000. 'Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation', *J Virol*, 74: 4894-97.
- Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, and H. J. Dyson. 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: 13452-57.
- Duyckaerts, C., B. Delatour, and M. C. Potier. 2009. 'Classification and basic pathology of Alzheimer disease', *Acta Neuropathol*, 118: 5-36.
- Edgeworth, Julie Ann, Michael Farmer, Anita Sicilia, Paul Tavares, Jonathan Beck, Tracy Campbell, Jessica Lowe, Simon Mead, Peter Rudge, John Collinge, and Graham S. Jackson. 2011. 'Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay', *The Lancet*, 377: 487-93.
- Ehlers, B., and H. Diringer. 1984. 'Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen', *J Gen Virol*, 65: 1325-30.
- Enari, M., E. Flechsig, and C. Weissmann. 2001. 'Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9295-9.
- Ertmer, A., S. Gilch, S. W. Yun, E. Flechsig, B. Klebl, M. Stein-Gerlach, M. A. Klein, and H. M. Schatzl. 2004. 'The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells', *J Biol Chem*, 279: 41918-27.
- Faucheux, B. A., E. Morain, V. Diuron, J. P. Brandel, D. Salomon, V. Sazdovitch, N. Privat, J. L. Laplanche, J. J. Hauw, and S. Haïk. 2011. 'Quantification of surviving cerebellar granule neurones and abnormal prion protein (PrPSc) deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease supports a pathogenic role for small PrPSc deposits common to the various molecular subtypes', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37: 500-12.
- Faucheux, B. A., N. Privat, J. P. Brandel, V. Sazdovitch, J. L. Laplanche, C. A. Maurage, J. J. Hauw, and S. Haïk. 2009. 'Loss of Cerebellar Granule Neurons Is Associated With Punctate but Not With Large Focal Deposits of Prion Protein in Creutzfeldt-Jakob Disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 68: 892-901.
- Fischer, D., M. D. Mukrasch, J. Biernat, S. Bibow, M. Blackledge, C. Griesinger, E. Mandelkow, and M. Zweckstetter. 2009. 'Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules', *Biochemistry*, 48: 10047-55.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, and F. Tagliavini. 1993. 'Neurotoxicity of a prion protein fragment', *Nature*, 362: 543-46.
- Forloni, G., S. Iussich, T. Awan, L. Colombo, N. Angeretti, L. Girola, I. Bertani, G. Poli, M. Caramelli, M. Grazia Bruzzone, L. Farina, L. Limido, G. Rossi, G. Giaccone, J. W. Ironside, O. Bugiani, M. Salmona, and F. Tagliavini. 2002. 'Tetracyclines affect prion infectivity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10849-54.
- Furlow, T. W. Jr., R. J. Whitley, and F. J. Wilmes. 1982. 'Repeated suppression of Creutzfeldt-Jakob disease with vidarabine', *Lancet*, 2: 564-65.
- Furukawa, H., M. Takahashi, M. Nakajima, and M. Yamada. 2002. 'Prospects of the therapeutic approaches to Creutzfeldt-Jakob disease: a clinical trial of [antimalarial, quinacrine]', *Nihon Rinsho*, 60: 1649-57.
- Gajdusek, D.C., and V. Zigas. 1957. 'Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: the endemic occurrence of "kuru" in the native population.', *N Engl J Med*, 257: 974-78.

- Gambetti, P., I. Cali, S. Notari, Q. Kong, W. Q. Zou, and W. K. Surewicz. 2011. 'Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases', *Acta Neuropathol*, 121: 79-90.
- Gauczynski, S., J. M. Peyrin, S. Haïk, C. Leucht, C. Hundt, R. Rieger, S. Krasemann, J. P. Deslys, D. Dormont, C. Lasmezas, and S. Weiss. 2001. 'The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein', *EMBO J*, 20: 5863-75.
- Gavin, B. A., M. J. Dolph, N. R. Deleault, J. C. Geoghegan, V. Khurana, M. B. Feany, P. J. Dolph, and S. Supattapone. 2006. 'Accelerated accumulation of misfolded prion protein and spongiform degeneration in a Drosophila model of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome', *J Neurosci*, 26: 12408-14.
- Geschwind, D. H., A. L. Kuo, K. S. Wong, A. Haman, G. Devereux, B. J. Raudabaugh, D. Y. Johnson, C. C. Torres-Chae, R. Finley, P. Garcia, J. N. Thai, H. Q. Cheng, J. M. Neuhaus, S. A. Forner, J. L. Duncan, K. L. Possin, S. J. Dearmond, S. B. Prusiner, and B. L. Miller. 2013. 'Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease', *Neurology*, 1: 2015-23.
- Ghaemmaghani, S., B. C. May, A. R. Renslo, and S. B. Prusiner. 2010. 'Discovery of 2-aminothiazoles as potent antiprion compounds', *J Virol*, 84: 3408-12.
- Ghetti, B., S. R. Dlouhy, G. Giaccone, O. Bugiani, B. Frangione, M. Farlow, and F. Tagliavini. 1995. 'Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the Indiana kindred', *Brain Pathol*, 5: 61-75.
- Ghetti, B., P. Piccardo, B. Frangione, O. Bugiani, G. Giaccone, K. Young, F. Prelli, M. Farlow, S. R. Dlouhy, and F. Tagliavini. 1996. 'Prion protein amyloidosis', *Brain Pathol*, 6: 127-45.
- Ghetti, B., F. Tagliavini, G. Giaccone, O. Bugiani, B. Frangione, M. Farlow, and S. R. Dlouhy. 1994. 'Familial Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles', *Mol Neurobiol*, 8: 41-48.
- Ghetti, B., F. Tagliavini, C. L. Masters, K. Beyreuther, G. Giaccone, L. Verga, M. R. Farlow, P. M. Conneally, S. R. Dlouhy, B. Azzarelli, and et al. 1989. 'Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family', *Neurology*, 39: 1453-61.
- Giaccone, G., M. Mangieri, R. Capobianco, L. Limido, J. J. Hauw, S. Haik, P. Fociani, O. Bugiani, and F. Tagliavini. 2008. 'Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease', *Neurobiol Aging*, 29: 1864-73.
- Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, T. Bussi re, C. Bouras, E. Kovari, D. P. Morrison Perl, J. H., C. Gold, and P.R. Hof. 2003. 'Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease', *Neurology*, 60: 1495-500.
- Gibbs, C. J. Jr., A. Joy, R. Heffner, M. Franko, M. Miyazaki, D. M. Asher, J. E. Parisi, P. W. Brown, and D. C. Gajdusek. 1985. 'Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone', *N Engl J Med*, 313: 734-38.
- Giese, A., M. H. Groschup, B. Hessel, and H. A. Kretzschmar. 1995. 'Neuronal Cell Death in Scrapie-Infected Mice Is Due to Apoptosis', *Brain Pathol*, 5: 231-21.
- Giles, K., D. B. Berry, C. Condello, B. N. Dugger, Z. Li, A. Oehler, S. Bhardwaj, M. Elepano, S. Guan, B. M. Silber, S. H. Olson, and S. B. Prusiner. 2016. 'Optimization of Aryl Amides that Extend Survival in Prion-Infected Mice', *J Pharmacol Exp Ther*, 358: 537-47.
- Giles, K., D. B. Berry, C. Condello, R. C. Hawley, A. Gallardo-Godoy, C. Bryant, A. Oehler, M. Elepano, S. Bhardwaj, S. Patel, B. M. Silber, S. Guan, S. J. DeArmond, A. R. Renslo, and S. B. Prusiner. 2015. 'Different 2-Aminothiazole Therapeutics Produce Distinct Patterns of Scrapie Prion Neuropathology in Mouse Brains', *J Pharmacol Exp Ther*, 355: 2-12.
- Gimbel, D. A., H. B. Nygaard, E. E. Coffey, E. C. Gunther, J. Lauren, Z. A. Gimbel, and S. M. Strittmatter. 2010. 'Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein', *J Neurosci*, 30: 6367-74.
- Giri, R. K., R. Young, R. Pitstick, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and G. A. Carlson. 2006. 'Prion infection of mouse neurospheres', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 3875-80.
- Goedert, M., R. Jakes, M. G. Spillantini, M. Hasegawa, M. J. Smith, and R. A. Crowther. 1996. 'Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans', *Nature*, 383: 550-3.

- Golding, M. C., C. R. Long, M. A. Carmell, G. J. Hannon, and M. E. Westhusin. 2006. 'Suppression of prion protein in livestock by RNA interference', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5285-90.
- Goldmann, W., N. Hunter, G. Benson, J.D. Foster, and J. Hope. 1991. 'Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene', *Journal of General Virology*, 72: 2411-17.
- Gómez-Isla, T., R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi, and B. T. Hyman. 1997. 'Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease', *Ann Neurol*, 41: 17-24.
- Gong, C. X., T. J. Singh, I. Gmndke-Iqbal, and K. Iqbal. 1993. 'Phosphoprotein Phosphatase Activities in Alzheimer Disease Brain', *J Neurochem*, 61: 921-27.
- Gorkovskiy, A., K. R. Thurber, R. Tycko, and R. B. Wickner. 2014. 'Locating folds of the in-register parallel beta-sheet of the Sup35p prion domain infectious amyloid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E4615-22.
- Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 2004. 'Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 8342-7.
- Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, O. V. Forlenza, A. L. B. Cabral, S. S. Veiga, M. A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V. R. Martins, and R. R. Brentani. 2000. 'Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis', *Mol Brain Res*, 76: 85-92.
- Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, V. R. Martins, D. G. Jay, and R. R. Brentani. 2000. 'Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein', *FEBS Letters*, 482: 257-60.
- Gray, F., F. Chrétien, H. Adle-Biassette, A. Dorandeu, T. Ereau, M. B. Delisle, N. Kopp, J. W. Ironside, and C. Vital. 1999. 'Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 58: 321-28.
- Greenwood, S. M., S. M. Mizielinska, B. G. Frenguelli, J. Harvey, and C. N. Connolly. 2007. 'Mitochondrial dysfunction and dendritic beading during neuronal toxicity', *J Biol Chem*, 282: 26235-44.
- Griffin, J. K., and N. R. Cashman. 2005. 'Progress in prion vaccines and immunotherapies', *Expert Opin Biol Ther*, 5: 97-110.
- Groveman, B. R., M. A. Dolan, L. M. Taubner, A. Kraus, R. B. Wickner, and B. Caughey. 2014. 'Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids', *J Biol Chem*, 289: 24129-42.
- Haass, C., and D. J. Selkoe. 2007. 'Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 101-12.
- Haïk, S., and J. P. Brandel. 2011. 'Biochemical and strain properties of CJD prions: complexity versus simplicity', *J Neurochem*, 119: 251-61.
- Haïk, S., J. P. Brandel, D. Salomon, V. Sazdovitch, N. Delasnerie-Laupretre, J. L. Laplanche, B. A. Faucheux, C. Soubrié, E. Boher, C. Belorgey, J. J. Hauw, and A. Alperovitch. 2004. 'Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects', *Neurology*, 63: 2413-15.
- Haïk, S., J. M. Peyrin, L. Lins, M. Y. Rosseneu, R. Brasseur, J. P. Langeveld, F. Tagliavini, J. P. Deslys, C. Lasmezas, and D. Dormont. 2000. 'Neurotoxicity of the putative transmembrane domain of the prion protein', *Neurobiol Dis*, 7: 644-56.
- Haïk, Stéphane, Gabriella Marcon, Alain Mallet, Mauro Tettamanti, Arlette Welaratne, Giorgio Giaccone, Shohreh Azimi, Vladimiro Pietrini, Jean-Roch Fabreguettes, Daniele Imperiale, Pierre Cesaro, Carlo Buffa, Christophe Aucan, Ugo Lucca, Laurène Peckeu, Silvia Suardi, Christine Tranchant, Inga Zerr, Caroline Houillier, Veronica Redaelli, Hervé Vespignani, Angela Campanella, François Sellal, Anna Krasnianski, Danielle Seilhean, Uta Heinemann, Frédéric Sedel, Mara Canovi, Marco Gobbi, Giuseppe Di Fede, Jean-Louis Laplanche, Maurizio Pocchiari, Mario Salmona, Gianluigi Forloni, Jean-Philippe Brandel, and Fabrizio Tagliavini. 2014. 'Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *The Lancet Neurology*, 13: 150-58.
- Hajj, G. N. M., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, S. S. Veiga, R. B. da Silveira, T. G. Santos, K. C. B. Ribeiro, M. A. Juliano, S. G. Jacchieri, S. M. Zanata, and V. R. Martins. 2007. 'Cellular prion

- protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins', *J Cell Sci*, 120: 1915-26.
- Halliday, M., and G. R. Mallucci. 2014. 'Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: A new approach to therapy', *Neuropharmacology*, 76 Pt A: 169-74.
- Hanger, D. P., B. H. Anderton, and W. Noble. 2009. 'Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease', *Trends Mol Med*, 15: 112-9.
- Hannaoui, S., A. Gougerot, N. Privat, E. Levavasseur, N. Bizat, J. J. Hauw, J. P. Brandel, and S. Haik. 2014. 'Cycline efficacy on the propagation of human prions in primary cultured neurons is strain-specific', *J Infect Dis*, 209: 1144-8.
- Hannaoui, S., L. Maatouk, N. Privat, E. Levavasseur, B. A. Faucheux, and S. Haik. 2013. 'Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type', *J Virol*, 87: 2535-48.
- Haraguchi, T., S. Fischer, S. Olofsson, T. Endo, D. Groth, A. Tarentino, D. R. Borchelt, D. B. Teplow, L. E. Hood, and A. L. Burlingame. 1989. 'Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins', *Arch Biochem Biophys*, 274: 1-13.
- Harding, H. P., H. Zeng, Y. Zhang, R. Jungries, P. Chung, H. Plesken, D. D. Sabatini, and D. Ron. 2001. 'Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival', *Mol Cell*, 7: 1153-63.
- Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron. 2000. 'Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response', *Mol Cell*, 5: 897-904.
- Hauw, J. J., V. Sazdovitch, J. L. Laplanche, K. Peoc'h, N. Kopp, J. L. Kemeny, N. Privat, N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, J. P. Deslys, D. Dormont, and A. Alperovitch. 2000. 'Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene', *Neurology*, 54: 1641-46.
- Hayward, P. A., J. E. Bell, and J. W. Ironside. 1994. 'Prion protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 20: 375-83.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa. 1998. 'A Transmembrane Form of the Prion Protein in Neurodegenerative Disease', *Science*, 279: 827-34.
- Heiseke, A., Y. Aguib, C. Riemer, M. Baier, and H. M. Schatzl. 2009. 'Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy', *J Neurochem*, 109: 25-34.
- Herbst, A., P. Banser, C. D. Velasquez, C. E. Mays, V. L. Sim, D. Westaway, J. M. Aiken, and D. McKenzie. 2013. 'Infectious prions accumulate to high levels in non proliferative C2C12 myotubes', *PLoS Pathog*, 9: e1003755.
- Herms, J. W., T. Tings, S. Dunker, and H. A. Kretzschmar. 2001. 'Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells', *Neurobiol Dis*, 8: 324-30.
- Herms, J. W., T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schürmann, O. Windl, N. Brose, and H. Kretzschmar. 1999. 'Evidence of presynaptic location and function of the prion protein', *J Neurosci*, 19: 8866-75.
- Hernandez, F., E. Gomez de Barreda, A. Fuster-Matanzo, J. J. Lucas, and J. Avila. 2010. 'GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein', *Exp Neurol*, 223: 322-5.
- Hernandez, F., M. Perez, J. J. Lucas, and J. Avila. 2002. 'Sulfo-glycosaminoglycan content affects PHF-tau solubility and allows the identification of different types of PHFs', *Brain Res*, 935: 65-72.
- Herva, M. E., A. Relano-Gines, A. Villa, and J. M. Torres. 2010. 'Prion infection of differentiated neurospheres', *J Neurosci Methods*, 188: 270-5.
- Hetz, C., M. Russelakis-Carneiro, K. Maundrell, J. Castilla, and C. Soto. 2003. 'Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein', *EMBO J*, 22: 5435-45.
- Hetz, Claudio, Kinsey Maundrell, and Claudio Soto. 2003. 'Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders?', *Trends in Molecular Medicine*, 9: 237-43.
- Hill, A. F., M. Antoniou, and J. Collinge. 1999. 'Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity', *J Gen Virol*, 80.

- Hong, L., H. C. Huang, and Z. F. Jiang. 2014. 'Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease', *Neurol Res*, 36: 276-82.
- Hong, M., V. Zhukareva, V. Vogelsberg-Ragaglia, Z. Wszolek, L. Reed, B. I. Miller, D. H. Geschwind, T. D. Bird, D. McKeel, A. Goate, J. C. Morris, K. C. Wilhelmsen, G. D. Schellenberg, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee. 1998. 'Mutation-Specific Functional Impairments in Distinct Tau Isoforms of Hereditary FTDP-17', *Science*, 282: 1914-17.
- Hoozemans, J. J., E. S. van Haastert, P. Eikelenboom, R. A. de Vos, J. M. Rozemuller, and W. Scheper. 2007. 'Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease', *Biochem Biophys Res Commun*, 354: 707-11.
- Hoozemans, J. J., E. S. van Haastert, D. A. Nijholt, A. J. Rozemuller, P. Eikelenboom, and W. Scheper. 2009. 'The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus', *Am J Pathol*, 174: 1241-51.
- Horiuchi, M., S. A. Priola, J. Chabry, and B. Caughey. 2000. 'Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5836-41.
- Hornemann, Simone, Carsten Korth, Bruno Oesch, Roland Riek, Gerhard Wider, Kurt Wüthrich, and Rudi Glockshuber. 1997. 'Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization', *FEBS Letters*, 413: 277-81.
- Houston, E. F., and M. B. Gravenor. 2003. 'Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE', *Vet Rec*, 152: 333-34.
- Hsiao, K., S. R. Dlouhy, M. Farlow, C. Cass, M. Da Costa, P. M. Conneally, M. E. Hodes, B. Ghetti, and S. B. Prusiner. 1992. 'Mutant prion proteins in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles', *Nat Genet*, 1: 68-71.
- Hsiao, K., D. Groth, M. Scott, S. L. Yang, H. Serban, D. Rapp, D. Foster, M. Torchia, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1994. 'Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 9126-30.
- Hsiao, K., M. Scott, D. Foster, D. Groth, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1990. 'Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein', *Science*, 250: 1587-90.
- Hu, Yunping, Haiguo Sun, Rick T. Owens, Zhennan Gu, Jansheng Wu, Yong Q. Chen, Joseph T. O'Flaherty, and Iris J. Edwards. 2010. 'Syndecan-1-Dependent Suppression of PDK1/Akt/Bad Signaling by Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in Prostate Cancer', *Neoplasia*, 12: 826-36.
- Huang, Ziwei, Stanley B. Prusiner, and Fred E. Cohen. 1996. 'Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment', *Folding and Design*, 1: 13-19.
- Hundt, C., J. M. Peyrin, S. Haïk, S. Gauczynski, C. Leucht, R. Rieger, M. L. Riley, J. P. Deslys, D. Dormont, C. Lasmezas, and S. Weiss. 2001. 'Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor', *EMBO J*, 20: 5876-86.
- Hyman, B. T., K. Marzloff, and P. V. Arriagada. 1993. 'The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution', *J Neuropathol Exp Neurol*, 52: 594-600.
- Ikegaya, Y., J. A. Kim, M. Baba, T. Iwatsubo, N. Nishiyama, and N. Matsuki. 2001. 'Rapid and reversible changes in dendrite morphology and synaptic efficacy following NMDA receptor activation: implication for a cellular defense against excitotoxicity', *J Cell Sci*, 114: 4083-93.
- Ingelsson, M., H. Fukumoto, K. L. Newell, J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, M. P. Frosch, M. S. Albert, B. T. Hyman, and M. C. Irizarry. 2004. 'Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain', *Neurology*, 62: 925-31.
- Ingrosso, L., A. Ladogana, and M. Pocchiari. 1995. 'Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters', *J Virol*, 69: 506-08.
- Iqbal, K., F. Liu, and C. X. Gong. 2016. 'Tau and neurodegenerative disease: the story so far', *Nat Rev Neurol*, 12: 15-27.
- Ironside, J. W., D. L. Ritchie, and M. W. Head. 2005. 'Phenotypic variability in human prion diseases', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 31: 565-79.
- Ishizawa, K., T. Komori, T. Shimazu, T. Yamamoto, T. Kitamoto, K. Shimazu, and T. Hirose. 2002. 'Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-

- Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia', *Acta Neuropathol*, 104: 342-50.
- Itagaki, S., E. G. Mc Geer, H. Akiyama, S. Zhu, and D. J. Selkoe. 1989. 'Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease', *J Neuroimmunol*, 24: 173-82.
- Iwamaru, Y., T. Takenouchi, K. Ogihara, M. Hoshino, M. Takata, M. Imamura, Y. Tagawa, H. Hayashi-Kato, Y. Ushiki-Kaku, Y. Shimizu, H. Okada, M. Shinagawa, H. Kitani, and T. Yokoyama. 2007. 'Microglial cell line established from prion protein-overexpressing mice is susceptible to various murine prion strains', *J Virol*, 81: 1524-7.
- Jackson, G. S., I. Murray, L. L. Hosszu, N. Gibbs, J. P. Waltho, A. R. Clarke, and J. Collinge. 2001. 'Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8531-5.
- Jackson, W. S., A. W. Borkowski, H. Faas, A. D. Steele, O. D. King, N. Watson, A. Jasanoff, and S. Lindquist. 2009. 'Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice', *Neuron*, 63: 438-50.
- Jackson, W. S., A. W. Borkowski, N. E. Watson, O. D. King, H. Faas, A. Jasanoff, and S. Lindquist. 2013. 'Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 14759-64.
- Jaumain, E., I. Quadrio, L. Herzog, F. Reine, H. Rezaei, O. Androletti, H. Laude, A. Perret-Liaudet, S. Haik, and V. Beringue. 2016. 'Absence of Evidence for a Causal Link between Bovine Spongiform Encephalopathy Strain Variant L-BSE and Known Forms of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in Human PrP Transgenic Mice', *J Virol*, 90: 10867-74.
- Jeffrey, M., I. A. Goodbrand, and C. M. Goodsir. 1995. 'Pathology of the Transmissible Spongiform Encephalopathies with Special Emphasis on Ultrastructure', *Micron*, 26: 277-98.
- Jeong, J. K., M. H. Moon, B. C. Bae, Y. J. Lee, J. W. Seol, H. S. Kang, J. S. Kim, S. J. Kang, and S. Y. Park. 2012. 'Autophagy induced by resveratrol prevents human prion protein-mediated neurotoxicity', *Neurosci Res*, 73: 99-105.
- Jesioneck-Kupnicka, D., J. Buczynski, R. Kordek, T. Sobow, I. Kloszewska, W. Papierz, and P. P. Liberski. 1997. 'Programmed cell death (apoptosis) in Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease', *Folia Neuropathol*, 35: 233-35.
- Jin, M., N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, and D. J. Selkoe. 2011. 'Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 5819-24.
- Jones, D. R., W. A. Taylor, C. Bate, M. David, and M. Tayebi. 2010. 'A camelid anti-PrP antibody abrogates PrP replication in prion-permissive neuroblastoma cell lines', *PLoS One*, 5: e9804.
- Jones, E. M., and W. K. Surewicz. 2005. 'Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids', *Cell*, 121: 63-72.
- Kamatari, Y. O., Y. Hayano, K. Yamaguchi, J. Hosokawa-Muto, and K. Kuwata. 2013. 'Characterizing antiprion compounds based on their binding properties to prion proteins: implications as medical chaperones', *Protein Sci*, 22: 22-34.
- Kampers, T., P. Friedhoff, J. Biernat, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1996. 'RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments', *FEBS Lett*, 399: 344-49.
- Kandel, E. R. 2012. 'The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB', *Mol Brain*, 5.
- Kaneko, K., H. Wille, I. Mehlhorn, H. Zhang, H. Ball, F. E. Cohen, M. A. Baldwin, and S. B. Prusiner. 1997. 'Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides', *J Mol Biol*, 270: 574-86.
- Kaneko, K., L. Zulianello, M. Scott, C. M. Cooper, A. C. Wallace, T. L. James, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1997. 'Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 10069-74.
- Karapetyan, Y. E., G. F. Sferazza, M. Zhou, G. Ottenberg, T. Spicer, P. Chase, M. Fallahi, P. Hodder, C. Weissmann, and C. Lasmezas. 2013. 'Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as antiprion agents', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 7044-49.

- Kazlauskaitė, J., A. Young, C. E. Gardner, J. V. Macpherson, C. Venien-Bryan, and T. J. Pinheiro. 2005. 'An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 292-305.
- Kazmirski, S. L., D. Alonso, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, and V. Daggett. 1995. 'Theoretical studies of sequence effects on the conformational properties of a fragment of the prion protein: implications for scrapie formation', *Chem Biol*, 2: 305-15.
- Khalili-Shirazi, A., L. Summers, J. Linehan, G. Mallinson, D. Anstee, S. Hawke, G. S. Jackson, and J. Collinge. 2005. 'PrP glycoforms are associated in a strain-specific ratio in native PrP^{Sc}', *J Gen Virol*, 86: 2635-44.
- Khlistunova, I., J. Biernat, Y. Wang, M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, E. Mandelkow, and E. M. Mandelkow. 2006. 'Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs', *J Biol Chem*, 281: 1205-14.
- Kimberlin, R. H., and C. Walker. 1977. 'Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster', *J Gen Virol*, 34: 295-304.
- Kishida, Hitaru, Yuji Sakasegawa, Kota Watanabe, Yoshio Yamakawa, Masahiro Nishijima, Yoshiyuki Kuroiwa, Naomi S. Hachiya, and Kiyotoshi Kaneko. 2004. 'Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication in vitro', *Amyloid*, 11: 14-20.
- Kitamoto, T., J. Tateishi, T. Tashima, I. Takeshita, R. A. Barry, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1986. 'Amyloid Plaques in Creutzfeldt-Jakob Disease Stain with Prion Protein Antibodies', *Ann Neurol*, 20: 204-08.
- Klingenstein, R., S. Lober, P. Kujala, S. Godsave, S. R. Leliveld, P. Gmeiner, P. J. Peters, and C. Korth. 2006. 'Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments', *J Neurochem*, 98: 748-59.
- Klionsky, D. J., and S. D. Emr. 2000. 'Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation', *Science*, 290: 1717-21.
- Klohn, P. C., L. Stoltze, E. Flechsig, M. Enari, and C. Weissmann. 2003. 'A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 11666-71.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, and B. Caughey. 1994. 'Cell-free formation of protease-resistant prion protein', *Nature*, 370: 471-74.
- Korolchuk, V. I., F. M. Menzies, and D. C. Rubinsztein. 2010. 'Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems', *FEBS Lett*, 584: 1393-8.
- Korth, C., B. C. May, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 2001. 'Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9836-41.
- Kourie, J. I. 2002. 'Prion channel proteins and their role in vacuolation and neurodegenerative diseases', *Eur Biophys J*, 31: 409-16.
- Kovacs, G. G., M. Puopolo, A. Ladogana, M. Pocchiari, H. Budka, C. van Duijn, S. J. Collins, A. Boyd, A. Giulivi, M. Coulthart, N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, I. Zerr, H. A. Kretzschmar, J. de Pedro-Cuesta, M. Calero-Lara, M. Glatzel, A. Aguzzi, M. Bishop, R. Knight, G. Belay, R. Will, E. Mitrova, and Eurocjd. 2005. 'Genetic prion disease: the EUROCD experience', *Hum Genet*, 118: 166-74.
- Kovacs, G. G., J. Rahimi, T. Strobel, M. I. Lutz, G. Regelsberger, N. Streichenberger, A. Perret-Liaudet, R. Höftberger, P. P. Liberski, H. Budka, and B. Sikorska. 2016. 'Tau Pathology in Creutzfeldt-Jakob Disease Revisited', *Brain Pathol*.
- Kovacs, G. G., J. Seguin, I. Quadrio, R. Höftberger, I. Kapas, N. Streichenberger, A. G. Biacabe, D. Meyronet, R. Sciot, R. Vandenberghe, K. Majtenyi, L. Laszlo, T. Ströbel, H. Budka, and A. Perret-Liaudet. 2011. 'Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy', *Acta Neuropathol*, 121: 39-57.
- Kovanen, J., M. Haltia, and K. Cantell. 1980. 'Failure of interferon to modify Creutzfeldt-Jakob disease', *Br Med J*, 280: 902.

- Kraemer, B. C., B. Zhang, J. B. Leverenz, J. H. Thomas, J. Q. Trojanowski, and G. D. Schellenberg. 2003. 'Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 9980-5.
- Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, L. E. Stowring, and S. J. DeArmond. 1986. 'Scrapie Prion Proteins Are Synthesized in Neurons', *Am J Pathol*, 122: 1-5.
- Kristiansen, M., P. Deriziotis, D. E. Dimcheff, G. S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A. R. Clarke, F. W. van Leeuwen, V. Menendez-Benito, N. P. Dantuma, J. L. Portis, J. Collinge, and S. J. Tabrizi. 2007. 'Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome', *Mol Cell*, 26: 175-88.
- Kudo, W., H. P. Lee, W. Q. Zou, X. Wang, G. Perry, X. Zhu, M. A. Smith, R. B. Petersen, and H. G. Lee. 2012. 'Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death', *Hum Mol Genet*, 21: 1138-44.
- Kunnumakkara, A. B., D. Bordoloi, G. Padmavathi, J. Monisha, N. K. Roy, S. Prasad, and B. B. Aggarwal. 2016. 'Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases', *Br J Pharmacol*.
- Kuwahara, C., A. M. Takeuchi, T. Nishimura, T. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itohara, and T. Onodera. 1999. 'Prions prevent neuronal cell-line death', *Nature*, 400: 225-26.
- Kuwahara, T., A. Koyama, K. Gengyo-Ando, M. Masuda, H. Kowa, M. Tsunoda, S. Mitani, and T. Iwatsubo. 2006. 'Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*', *J Biol Chem*, 281: 334-40.
- Ladogana, A., P. Casaccia, L. Ingrosso, M. Cibati, M. Salvatore, Y. G. Xi, C. Masullo, and M. Pocchiari. 1992. 'Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters', *J Gen Virol*, 73: 661-65.
- Lai, C.-H., C.-Y. Chou, L.-Y. Ch'ang, C.-S. Liu, and W.-C. Lin. 2000. 'Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in *Caenorhabditis elegans* by Comparative Proteomics', *Gen Res*, 10: 703-13.
- Laplanche, J. L., N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, J. Chatelain, P. Beaudry, A. Alperovitch, and J. M. Launay. 1994. 'Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies', *Neurology*, 44: 2347-51.
- Larramendy-Gozal, C., A. Barret, E. Daudigeos, E. Mathieu, L. Antonangeli, C. Riffet, E. Petit, D. Papy-Garcia, D. Barritault, P. Brown, and J. P. Deslys. 2007. 'Comparison of CR36, a new heparan mimetic, and pentosan polysulfate in the treatment of prion diseases', *J Gen Virol*, 88: 1062-7.
- Laskowska, E., E. Matuszewska, and D. Kuczyńska-Wiśnik. 2010. 'Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases', *Curr Pharm Biotechnol*, 11: 146-57.
- Lasmezas, C., J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. W. Ironside, and J. J. Hauw. 1996. 'BSE transmission to macaques', *Nature*, 381: 743-44.
- Lauren, J., D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert, and S. M. Strittmatter. 2009. 'Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers', *Nature*, 457: 1128-32.
- Lee, H. G., G. Perry, P. I. Moreira, M. R. Garrett, Q. Liu, X. Zhu, A. Takeda, A. Nunomura, and M. A. Smith. 2005. 'Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?', *Trends Mol Med*, 11: 164-9.
- Li, J., S. Browning, S. P. Mahal, A. M. Oelschlegel, and C. Weissmann. 2010. 'Darwinian evolution of prions in cell culture', *Science*, 327: 869-72.
- Li, S. C., N. K. Goto, K. A. Williams, and C. M. Deber. 1996. 'Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 6676-81.
- Liberski, P. P., D. C. Gajdusek, and P. Brown. 2002. 'How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): neuronal autophagy revisited', *Acta Neurobiol Exp*, 62: 141-47.
- Liberski, P. P., B. Sikorska, J. Bratosiewicz-Wasik, D. C. Gajdusek, and P. Brown. 2004. 'Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy', *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2473-90.

- Lin, D. T., J. Jodoin, M. Baril, C. G. Goodyer, and A. C. Leblanc. 2008. 'Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function', *Biochim Biophys Acta*, 1783: 2001-12.
- Link, C. D. 1995. 'Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 9368-72.
- Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden, and V. R. Martins. 2005. 'Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways', *J Neurosci*, 25: 11330-9.
- Lucassen, P. J., A. Williams, W. C. Chung, and H. Fraser. 1995. 'Detection of apoptosis in murine scrapie', *Neurosci Lett*, 198: 185-88.
- Madec, J. Y., S. Simon, S. Lezmi, A. Bencsik, J. Grassi, and T. Baron. 2004. 'Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock', *J Gen Virol*, 85: 3483-6.
- Magalhaes, A. C., G. S. Baron, K. S. Lee, O. Steele-Mortimer, D. Dorward, M. A. Prado, and B. Caughey. 2005. 'Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells', *J Neurosci*, 25: 5207-16.
- Magnani, E., J. Fan, L. Gasparini, M. Golding, M. Williams, G. Schiavo, M. Goedert, L. A. Amos, and M. G. Spillantini. 2007. 'Interaction of tau protein with the dynactin complex', *EMBO J*, 26: 4546-54.
- Mallucci, G. R., S. Ratté, E. A. Asante, J. Linehan, I. Gowland, J. G. Jefferys, and J. Collinge. 2002. 'Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration', *EMBO J*, 21: 202-10.
- Malnar, M., S. Hecimovic, N. Mattsson, and H. Zetterberg. 2014. 'Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease', *Neurobiol Dis*, 72.
- Mangé, A., O. Milhavet, H. E. McMahon, D. Casanova, and S. Lehmann. 2000. 'Effect of amphotericin B on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells: putative mechanism of action in transmissible spongiform encephalopathies', *J Neurochem*, 74: 754-62.
- Manson, J. , J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman, and J. Hope. 1992. 'The prior protein gene: a role in mouse embryogenesis?', *Development*, 115: 117-22.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnel, and J. Hope. 1994. '129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal', *Mol Neurobiol*, 8: 121-27.
- Manson, J. C., J. Hope, A. R. Clarke, A. Johnston, C. Black, and N. MacLeod. 1995. 'PrP gene dosage and long term potentiation', *Neurodegeneration*, 4: 113-14.
- Mansuy, Isabelle M. 2003. 'Calcineurin in memory and bidirectional plasticity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311: 1195-208.
- Manterola, L., M. Hernando-Rodriguez, A. Ruiz, A. Apraiz, O. Arrizabalaga, L. Vellon, E. Alberdi, F. Cavaliere, H. M. Lacerda, S. Jimenez, L. A. Parada, C. Matute, and J. L. Zugaza. 2013. '1-42 beta-amyloid peptide requires PDK1/nPKC/Rac 1 pathway to induce neuronal death', *Transl Psychiatry*, 3: e219.
- Marsh, R. F., and R. A. Bessen. 1993. 'Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy', *Dev Biol Stand*, 80: 111-18.
- Martin, L., X. Latypova, and F. Terro. 2011. 'Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease', *Neurochem Int*, 58: 458-71.
- Martinez-Lage, J. F., A. Rabano, J. Bermejo, M. Martinez Perez, M. C. Guerrero, M. A. Contreras, and A. Lunar. 2005. 'Creutzfeldt-Jakob disease acquired via a dural graft: failure of therapy with quinacrine and chlorpromazine', *Surg Neurol*, 64: 542-5, discussion 45.
- Martins, V. R., R. Linden, M. A. Prado, R. Walz, A. C. Sakamoto, I. Izquierdo, and R. R. Brentani. 2002. 'Cellular prion protein: on the road for functions', *FEBS Letters*, 512: 25-28.
- Masel, J., N. Genoud, and A. Aguzzi. 2005. 'Efficient inhibition of prion replication by PrP-Fc(2) suggests that the prion is a PrP(Sc) oligomer', *J Mol Biol*, 345: 1243-51.
- Masliah, E., M. Mallory, L. Hansen, M. Alford, T. Albright, R. Terry, P. Shapiro, M. Sundsmo, and T. Saitoh. 1991. 'Immunoreactivity of CD45, a Protein Phosphotyrosine Phosphatase, in Alzheimer's Disease', *Acta Neuropathol*, 83: 12-20.
- Mastrianni, J. A. 2010. 'The genetics of prion diseases', *Genet Med*, 12: 187-95.

- Masullo, C., G. Macchi, Y. G. Xi, and M. Pocchiari. 1992. 'Failure to ameliorate Creutzfeldt-Jakob disease with amphotericin B therapy', *J Infect Dis*, 165: 784-85.
- Mathiason, C. K., J. G. Powers, S. J. Dahmes, D. A. Osborn, K. V. Miller, R. J. Warren, G. L. Mason, S. A. Hays, J. Hayes-Klug, D. M. Seelig, M. A. Wild, L. A. Wolfe, T. R. Spraker, M. W. Miller, C. J. Sigurdson, G. C. Telling, and E. A. Hoover. 2006. 'Infectious Prions in the Saliva and Blood of Deer with Chronic Wasting Disease', *Science*, 314.
- Mattson, M. P. 2000. 'Apoptosis in neurodegenerative disorders', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 120-29.
- Mays, C. E., C. Kim, T. Haldiman, J. van der Merwe, A. Lau, J. Yang, J. Grams, M. A. Di Bari, R. Nonno, G. C. Telling, Q. Kong, J. Langeveld, D. McKenzie, D. Westaway, and J. G. Safar. 2014. 'Prion disease tempo determined by host-dependent substrate reduction', *J Clin Invest*, 124: 847-58.
- McGuire, L. I., A. H. Peden, C. D. Orru, J. M. Wilham, N. E. Appleford, G. Mallinson, M. Andrews, M. W. Head, B. Caughey, R. G. Will, R. S. Knight, and A. J. Green. 2012. 'Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease', *Ann Neurol*, 72: 278-85.
- McGuire, L. I., A. Poleggi, I. Poggliolini, S. Suardi, K. Grznarova, S. Shi, B. de Vil, S. Sarros, K. Satoh, K. Cheng, M. Cramm, G. Fairfoul, M. Schmitz, I. Zerr, P. Cras, M. Equestre, F. Tagliavini, R. Atarashi, D. Knox, S. Collins, S. Häik, P. Parchi, M. Pocchiari, and A. Green. 2016. 'Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study', *Ann Neurol*, 80: 160-65.
- McKinley, M. P., B. Hay, V. R. Lingappa, I. Lieberburg, and S. B. Prusiner. 1987. 'Developmental Expression of Prion Protein Gene in Brain', *Dev Biol*, 121: 105-10.
- McLennan, Neil F., Paul M. Brennan, Alisdair McNeill, Ioan Davies, Andrew Fotheringham, Kathleen A. Rennison, Diane Ritchie, Francis Brannan, Mark W. Head, James W. Ironside, Alun Williams, and Jeanne E. Bell. 2004. 'Prion Protein Accumulation and Neuroprotection in Hypoxic Brain Damage', *The American Journal of Pathology*, 165: 227-35.
- Medori, R., P. Montagna, H. J. Tritschler, A. LeBlanc, P. Cortelli, P. Tinuper, E. Lugaresi, and P. Gambetti. 1992. 'Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178', *Neurology*, 42: 669-70.
- Milhavet, O., D. Casanova, N. Chevallier, R. D. McKay, and S. Lehmann. 2006. 'Neural stem cell model for prion propagation', *Stem Cells*, 24: 2284-91.
- Miller-Vedam, L., and S. Ghaemmaghami. 2013. 'Strain specificity and drug resistance in anti-prion therapy', *Curr Top Med Chem*, 13: 2397-406.
- Millhauser, G. L. 2007. 'Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease', *Annu Rev Phys Chem*, 58: 299-320.
- Mitsios, N., M. Saka, J. Krupinski, R. Pennucci, C. Sanfeliu, M. Miguel Turu, J. Gaffney, P. Kumar, S. Kumar, M. Sullivan, and M. Slevin. 2007. 'Cellular prion protein is increased in the plasma and peri-infarcted brain tissue after acute stroke', *J Neurosci Res*, 85: 602-11.
- Mok, T., Z. Jaunmuktane, S. Joiner, T. Campbell, C. Morgan, B. Wakerley, F. Golestani, P. Rudge, S. Mead, H. R. Jäger, J. D. Wadsworth, S. Brandner, and J. Collinge. 2017. 'Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129', *N Engl J Med*, 376: 292-94.
- Montagna, Pasquale, Pierluigi Gambetti, Pietro Cortelli, and Elio Lugaresi. 2003. 'Familial and sporadic fatal insomnia', *The Lancet Neurology*, 2: 167-76.
- Moreno, J. A., M. Halliday, C. Molloy, H. Radford, N. Verity, J. M. Axten, C. A. Ortori, A. E. Willis, P. M. Fischer, D. A. Barrett, and G. R. Mallucci. 2013. 'Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice', *Sci Transl Med*, 5: 206ra138.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay, and O. Kellermann. 2000. 'Signal transduction through prion protein', *Science*, 289: 1925-38.
- Mouillet-Richard, S., N. Nishida, E. Pradines, H. Laude, B. Schneider, C. Feraudet, J. Grassi, J. M. Launay, S. Lehmann, and O. Kellermann. 2008. 'Prions impair bioaminergic functions through serotonin- or catecholamine-derived neurotoxins in neuronal cells', *J Biol Chem*, 283: 23782-90.

- Mouillet-Richard, S., B. Schneider, E. Pradines, M. Pietri, M. Ermonval, J. Grassi, J. G. Richards, V. Mutel, J. M. Launay, and O. Kellermann. 2007. 'Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells', *Ann N Y Acad Sci*, 1096: 106-19.
- Müller, W. E., H. Ushijima, H. C. Schröder, J. M. Forrest, W. F. Schatton, P. G. Rytik, and M. Heffner-Lauc. 1993. 'Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures', *Eur J Pharmacol*, 246: 261-67.
- Nakajima, M., M. Yamada, T. Kusuhara, H. Furukawa, M. Takahashi, A. Yamauchi, and Y. Kataoka. 2004. 'Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease', *Dement Geriatr Cogn Disord*, 17: 158-63.
- Naslavsky, N., R. Stein, . Yanai, G. Friedlander, and A. Taraboulos. 1997. 'Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform', *J Biol Chem*, 272.
- Nazor, K. E., F. Kuhn, T. Seward, M. Green, D. Zwald, M. Pürro, J. Schmid, K. Biffiger, A. M. Power, B. Oesch, A. Raeber, and G. C. Telling. 2005. 'Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice', *EMBO J*, 24: 2472-80.
- Neri, G., L. Figà-Talamanca, G. C. Di Battista, and F. Lo Russo. 1984. 'Amantadine in Creutzfeldt-Jakob disease. Review of the literature and case contribution', *Riv Neurobiol*, 30: 47-56.
- Newington, J. T., T. Rappon, S. Albers, D. Y. Wong, R. J. Rylett, and R. C. Cumming. 2012. 'Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid beta and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production', *J Biol Chem*, 287: 37245-58.
- Nguyen, J. T., H. Inouye, M. A. Baldwin, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, and D. A. Kirschner. 1995. 'X-ray Diffraction of Scrapie Prion Rods and PrP Peptides', *J Mol Biol*, 252: 412-22.
- Nishida, N., D. A. Harris, D. Vilette, H. Laude, Y. Frobert, J. Grassi, D. Casanova, O. Milhavel, and S. Lehmann. 2000. 'Successful Transmission of Three Mouse-Adapted Scrapie Strains to Murine Neuroblastoma Cell Lines Overexpressing Wild-Type Mouse Prion Protein', *J Virol*, 74: 320-25.
- Novitskaya, V., O. V. Bocharova, I. Bronstein, and I. V. Baskakov. 2006. 'Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons', *J Biol Chem*, 281: 13828-36.
- Nuvolone, M., M. Hermann, S. Sorce, G. Russo, C. Tiberi, P. Schwarz, E. Minikel, D. Sanoudou, P. Pelczar, and A. Aguzzi. 2016. 'Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science', *J Exp Med*, 213: 313-27.
- O'Donovan, C. N., D. Tobin, and T. G. Cotter. 2001. 'Prion protein fragment PrP-(106-126) induces apoptosis via mitochondrial disruption in human neuronal SH-SY5Y cells', *J Biol Chem*, 276: 43516-23.
- Oesch, B., D. Westaway, and S. B. Prusiner. 1991. 'Prion protein genes: evolutionary and functional aspects', *Curr Top Microbiol Immunol*, 172: 109-24.
- Oh, J. M., H. Y. Shin, S. J. Park, B. H. Kim, J. K. Choi, E. K. Choi, R. I. Carp, and Y. S. Kim. 2008. 'The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells', *Mol Cell Neurosci*, 39: 238-47.
- Orru, C. D., M. Bongianni, G. Tonoli, S. Ferrari, A. G. Hughson, B. R. Groveman, M. Fiorini, M. Pocchiari, S. Monaco, B. Caughey, and G. Zanusso. 2014. 'A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings', *N Engl J Med*, 371: 519-29.
- Orru, C. D., B. R. Groveman, A. G. Hughson, G. Zanusso, M. B. Coulthart, and B. Caughey. 2015. 'Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human Creutzfeldt-Jakob disease using cerebrospinal fluid', *MBio*, 6.
- Orru, C. D., J. M. Wilham, A. G. Hughson, L. D. Raymond, K. L. McNally, A. Bossers, C. Ligios, and B. Caughey. 2009. 'Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP(res) detection using seeded conversion of recombinant prion protein', *Protein Eng Des Sel*, 22: 515-21.
- Orru, C. D., J. M. Wilham, G. J. Raymond, F. Kuhn, B. Schroeder, A. Raeber, and B. Caughey. 2011. 'Prion Disease Blood Test Using Immunoprecipitation and Improved Quaking-Induced Conversion', *MBio*, 2: e00078-11.

- Ostapchenko, V. G., F. H. Beraldo, A. H. Mohammad, Y. F. Xie, P. H. Hirata, A. C. Magalhaes, G. Lamour, H. Li, A. Maciejewski, J. C. Belrose, B. L. Teixeira, M. Fahnestock, S. T. Ferreira, N. R. Cashman, G. N. Hajj, M. F. Jackson, W. Y. Choy, J. F. MacDonald, V. R. Martins, V. F. Prado, and M. A. Prado. 2013. 'The prion protein ligand, stress-inducible phosphoprotein 1, regulates amyloid-beta oligomer toxicity', *J Neurosci*, 33: 16552-64.
- Otto, M., L. Cepek, P. Ratzka, S. Doehlinger, I. Boekhoff, J. Wiltfang, E. Irle, G. Pergande, B. Ellers-Lenz, O. Windl, H. Kretzschmar, S. Poser, and H. Prange. 2004. 'Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study', *Neurology*, 62: 714-18.
- Padiolleau-Lefevre, S., C. Alexandrenne, F. Dkhissi, G. Clement, S. Essono, C. Blache, J. Y. Couraud, A. Wijkhuisen, and D. Boquet. 2007. 'Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in prion diseases', *Mol Immunol*, 44: 1888-96.
- Palmer, M. S., A. J. Dryden, J. T. Hughes, and J. Collinge. 1991. 'Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease', *Nature*, 352.
- Pantera, B., C. Bini, P. Cirri, P. Paoli, G. Camici, G. Manao, and A. Caselli. 2009. 'PrPc activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway', *J Neurochem*, 110: 194-207.
- Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickinson, A. A. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen, and P. Gambetti. 1996. 'Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease', *Ann Neurol*, 39: 767-78.
- Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti, and H. Kretzschmar. 1999. 'Classification of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Based on Molecular and Phenotypic Analysis of 300 Subjects', *Ann Neurol*, 46: 224-33.
- Parchi, P., W. Zou, Y. Wang, P. Brown, S. Capellari, B. Ghetti, N. Kopp, W. J. Schulz-Schaeffer, H. A. Kretzschmar, M. W. Head, J. W. Ironside, P. Gambetti, and S. G. Chen. 2000. 'Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 10168-72.
- Parry, A., I. Baker, R. Stacey, and S. Wimalaratna. 2007. 'Long term survival in a patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease treated with intraventricular pentosan polysulphate', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78: 733-4.
- Pattison, I. H. 1965. 'Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In', *Slow, Latent and Temperate Virus Infections, NINDB Monograph 2*: 249-57.
- Paudel, H. K., and W. Li. 1999. 'Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein Tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping.', *J Biol Chem*, 274: 8029-38.
- Peoc'h, K., E. Levavasseur, E. Delmont, A. De Simone, I. Laffont-Proust, N. Privat, Y. Chebaro, C. Chapuis, P. Bedoucha, J. P. Brandel, A. Laquerriere, J. L. Kemeny, J. J. Hauw, M. Borg, H. Rezaei, P. Derreumaux, J. L. Laplanche, and S. Haik. 2012. 'Substitutions at residue 211 in the prion protein drive a switch between CJD and GSS syndrome, a new mechanism governing inherited neurodegenerative disorders', *Hum Mol Genet*, 21: 5417-28.
- Peretz, D., M. R. Scott, D. Groth, R. A. Williamson, D. R. Burton, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 2001. 'Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein', *Protein Sci*, 10: 854-63.
- Peretz, D., R. A. Williamson, K. Kaneko, J. Vergara, E. Leclerc, G. Schmitt-Ulms, I. Mehlhorn, G. Legname, M. R. Wormald, P. M. Rudd, R. A. Dwerk, D. R. Burton, and S. B. Prusiner. 2001. 'Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity', *Nature*, 412: 739-43.
- Peretz, D., R. A. Williamson, Y. Matsunaga, H. Serban, C. Pinilla, R. B. Bastidas, R. Rozenshteyn, T. L. James, R. A. Houghten, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, and D. R. Burton. 1997. 'A Conformational Transition at the N Terminus of the Prion Protein Features in Formation of the Scrapie Isoform', *J Mol Biol*, 273: 614-22.

- Perovic, S., M. Böhm, E. Meesters, A. Meinhardt, G. Pergande, and W. E. Müller. 1998. 'Pharmacological intervention in age-associated brain disorders by Flupirtine: Alzheimer's and prion diseases', *Mech Ageing Dev*, 101: 1-19.
- Perovic, S., G. Pergande, H. Ushijima, M. Kelve, J. Forrest, and W. E. Müller. 1995. 'Flupirtine partially prevents neuronal injury induced by prion protein fragment and lead acetate', *Neurodegeneration*, 4: 369-74.
- Perovic, S., H. C. Schröder, G. Pergande, H. Ushijima, and H. M. Müller. 1997. 'Effect of flupirtine on Bcl-2 and glutathione level in neuronal cells treated in vitro with the prion protein fragment (PrP106-126)', *Exp Neurol*, 147: 518-24.
- Perrier, V., K. Kaneko, J. Safar, J. Vergara, P. Tremblay, S. J. DeArmond, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, and A. C. Wallace. 2002. 'Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13079-84.
- Perrier, V., A. C. Wallace, K. Kaneko, J. Safar, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 2000. 'Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6073-78.
- Pfeifer, A., S. Eigenbrod, S. Al-Khadra, A. Hofmann, G. Mitteregger, M. Moser, U. Bertsch, and H. Kretzschmar. 2006. 'Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice', *J Clin Invest*, 116: 3204-10.
- Piccardo, P., J. Cervenak, O. Yakovleva, L. Gregori, K. Pomeroy, A. Cook, F. S. Muhammad, T. Seuberlich, L. Cervenakova, and D. M. Asher. 2012. 'Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) infected with the agent of bovine spongiform encephalopathy develop tau pathology', *J Comp Pathol*, 147: 84-93.
- Piccardo, P., J. C. Manson, D. King, B. Ghetti, and R. M. Barron. 2007. 'Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 4712-7.
- Pietri, M., C. Dakowski, S. Hannaoui, A. Alleaume-Butaux, J. Hernandez-Rapp, A. Ragagnin, S. Mouillet-Richard, S. Haïk, Y. Bailly, J. M. Peyrin, J. M. Launay, O. Kellermann, and B. Schneider. 2013. 'PDK1 decreases TACE-mediated alpha-secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases', *Nat Med*, 19: 1124-31.
- Pillot, T., B. Drouet, M. Pinçon-Raymond, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, and J. Chambaz. 2000. 'A Nonfibrillar Form of the Fusogenic Prion Protein Fragment [118–135] Induces Apoptotic Cell Death in Rat Cortical Neurons', *J Neurochem*, 75: 2298-308.
- Planel, E., K. E. Richter, C. E. Nolan, J. E. Finley, L. Liu, Y. Wen, P. Krishnamurthy, M. Herman, L. Wang, J. B. Schachter, R. B. Nelson, L. F. Lau, and K. E. Duff. 2007. 'Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia', *J Neurosci*, 27: 3090-7.
- Pocchiari, M., S. Schmittinger, and C. Masullo. 1987. 'Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters', *J Gen Virol*, 68: 219-23.
- Poli, G., P. A. Martino, S. Villa, G. Carcassola, M. L. Giannino, P. Dall'Ara, C. Pollera, S. Iussich, V. M. Tranquillo, S. Bareggi, P. Mantegazza, and W. Ponti. 2004. 'Evaluation of anti-prion activity of congo red and its derivatives in experimentally infected hamsters', *Arzneimittelforschung*, 54: 406-15.
- Ponto, C., and I. Zerr. 2013. 'Prionerkrankungen—welche Rolle spielen sie heute?', *Info Neurologie & Psychiatrie*, 15: 2-8.
- Powell-Jackson, J., R. O. Weller, P. Kennedy, M. A. Preece, E. M. Whitcombe, and J. Newsom-Davis. 1985. 'CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE AFTER ADMINISTRATION OF HUMAN GROWTH HORMONE', *The Lancet*.
- Pradines, E., J. Hernandez-Rapp, A. Villa-Diaz, C. Dakowski, H. Ardila-Osorio, S. Haïk, B. Schneider, J. M. Launay, O. Kellermann, J. M. Torres, and S. Mouillet-Richard. 2013. 'Pathogenic prions deviate PrP(C) signaling in neuronal cells and impair A-beta clearance', *Cell Death Dis*, 4: e456.
- Pradines, E., D. Loubet, B. Schneider, J. M. Launay, O. Kellermann, and S. Mouillet-Richard. 2008. 'CREB-dependent gene regulation by prion protein: impact on MMP-9 and beta-dystroglycan', *Cell Signal*, 20: 2050-8.
- Prusiner, S. B. 1982. 'Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.', *Science*, 216.

- . 1998. 'Prions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 13363-83.
- . 2001. 'Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions', *N Engl J Med*, 344: 1516-26.
- Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Mirinda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson, and et al. 1990. 'Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication', *Cell*, 63: 673-86.
- Race, B. E., L. H. Fadness, and B. Chesebro. 1987. 'Characterization of Scrapie Infection in Mouse Neuroblastoma Cells ', *J Gen Virol*, 68: 1391-99.
- Race, B., K. Phillips, A. Kraus, and B. Chesebro. 2016. 'Phosphorylated human tau associates with mouse prion protein amyloid in scrapie-infected mice but does not increase progression of clinical disease', *Prion*, 10: 319-30.
- Radford, H., J. A. Moreno, N. Verity, M. Halliday, and G. R. Mallucci. 2015. 'PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia', *Acta Neuropathol*, 130: 633-42.
- Raeber, A. J., T. Muramoto, T. B. Kornberg, and S. B. Prusiner. 1995. 'Expression and targeting of Syrian hamster prion protein induced by heat shock in transgenic *Drosophila melanogaster*', *Mech Dev*, 51: 317-27.
- Raymond, G. J., E. A. Olsen, K. S. Lee, L. D. Raymond, P. K. Bryant, 3rd, G. S. Baron, W. S. Caughey, D. A. Kocisko, L. E. McHolland, C. Favara, J. P. Langeveld, F. G. van Zijderveld, R. T. Mayer, M. W. Miller, E. S. Williams, and B. Caughey. 2006. 'Inhibition of protease-resistant prion protein formation in a transformed deer cell line infected with chronic wasting disease', *J Virol*, 80: 596-604.
- Reiniger, L., A. Lukic, J. Linehan, P. Rudge, J. Collinge, S. Mead, and S. Brandner. 2011. 'Tau, prions and A β : the triad of neurodegeneration', *Acta Neuropathol*, 121: 5-20.
- Relano-Gines, A., S. Lehmann, A. Bencsik, M. E. Herva, J. M. Torres, and C. A. Crozet. 2011. 'Stem cell therapy extends incubation and survival time in prion-infected mice in a time window-dependant manner', *J Infect Dis*, 204: 1038-45.
- Reynolds, C. H., C. J. Garwood, S. Wray, C. Price, S. Kellie, T. Perera, M. Zvelebil, A. Yang, P. W. Sheppard, I. M. Varndell, D. P. Hanger, and B. H. Anderton. 2008. 'Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C γ 1, Grb2, and Src family kinases', *J Biol Chem*, 283: 18177-86.
- Rieger, R., F. Edenhofer, C. Lasmezas, and S. Weiss. 1997. 'The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells', *Nat Med*, 3: 1383-88.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wüthrich. 1996. 'NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)', *Nature*, 382: 180-82.
- Riemer, C., M. Burwinkel, A. Schwarz, S. Gultner, S. W. Mok, I. Heise, N. Holtkamp, and M. Baier. 2008. 'Evaluation of drugs for treatment of prion infections of the central nervous system', *J Gen Virol*, 89: 594-7.
- Roffe, M., F. H. Beraldo, R. Bester, M. Nunziante, C. Bach, G. Mancini, S. Gilch, I. Vorberg, B. A. Castilho, V. R. Martins, and G. N. Hajj. 2010. 'Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 13147-52.
- Rogers, J., J. Lubner-Narod, and S. D. Civin Styren, W. H. 1988. 'Expression of Immune System-Associated Antigens by Cells of the Human Central Nervous System: Relationship to the Pathology of Alzheimer's Disease', *Neurobiol Aging*, 9: 339-49.
- Rubenstein, R., H. Deng, R. E. Race, J. Weina, C. L. Scalli, M. C. Papini, R. J. Kascsak, and R. I. Carp. 1992. 'Demonstration of scrapie strain diversity in infected PC12 cells ', *J Gen Virol*, 73: 3027-31.
- Rubenstein, R., H. deng, C. L. Scalli, and M. C. Papini. 1991. 'Alterations in neurotransmitter-related enzyme activity in scrapie-infected PC12 cells ', *J Gen Virol*, 72: 1279-85.
- Saa, P., J. Castilla, and C. Soto. 2006. 'Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification', *J Biol Chem*, 281: 35245-52.
- Saborio, G. P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. 'Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding', *Nature*, 411: 810-13.

- Safar, J., F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 2000. 'Quantitative traits of prion strains are enciphered in the conformation of the prion protein', *Arch Virol Suppl*, 16: 227-35.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1998. 'Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations', *Nat Med*, 4: 1157-65.
- Sandberg, M. K., H. Al-Doujaily, B. Sharps, A. R. Clarke, and J. Collinge. 2011. 'Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases', *Nature*, 470: 540-2.
- Sandberg, M. K., H. Al-Doujaily, B. Sharps, M. W. De Oliveira, C. Schmidt, A. Richard-Londt, S. Lyall, J. M. Linehan, S. Brandner, J. D. Wadsworth, A. R. Clarke, and J. Collinge. 2014. 'Prion neuropathology follows the accumulation of alternate prion protein isoforms after infective titre has peaked', *Nat Commun*, 5: 4347.
- Sano, K., K. Satoh, R. Atarashi, H. Takashima, Y. Iwasaki, M. Yoshida, N. Sanjo, H. Murai, H. Mizusawa, M. Schmitz, I. Zerr, Y. S. Kim, and N. Nishida. 2013. 'Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay', *PLoS One*, 8: e54915.
- Santos, T. G., I. R. Silva, B. Costa-Silva, A. P. Lepique, V. R. Martins, and M. H. Lopes. 2011. 'Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein', *Stem Cells*, 29: 1126-36.
- Sarnataro, D., A. Pepe, G. Altamura, I. De Simone, A. Pesapane, L. Nitsch, N. Montuori, A. Lavecchia, and C. Zurzolo. 2016. 'The 37/67 kDa laminin receptor (LR) inhibitor, NSC47924, affects 37/67 kDa LR cell surface localization and interaction with the cellular prion protein', *Sci Rep*, 6: 24457.
- Schatzl, H. M., L. Laszlo, D. M. Holtzman, J. Tatzelt, S. J. DeArmond, R. I. Weiner, W. C. Mobley, and S. B. Prusiner. 1997. 'A Hypothalamic Neuronal Cell Line Persistently Infected with Scrapie Prions Exhibits Apoptosis', *J Virol*, 71: 8821-31.
- Schmidt, M. L., V. Zhukareva, K. L. Newell, V. M. Lee, and J. Q. Trojanowski. 2001. 'Tau isoform profile and phosphorylation state in dementia pugilistica recapitulate Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol*, 101: 518-24.
- Schneider, A., J. Biernat, M. Von Bergen, E. Mandelkow, and E. M. Mandelkow. 1999. 'Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments', *Biochemistry*, 38: 3549-58.
- Schneider, B., V. Mutel, M. Pietri, M. Ermonval, S. Mouillet-Richard, and O. Kellermann. 2003. 'NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 13326-31.
- Schraen-Maschke, S., N. Sergeant, C. M. Dhaenens, S. Bombois, V. Deramecourt, M. L. Caillet-Boudin, F. Pasquier, C. A. Maurage, B. Sablonniere, E. Vanmechelen, and L. Buee. 2008. 'Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases', *Biomark Med*, 2: 363-84.
- Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, D. Westaway, and S. B. Prusiner. 1989. 'Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques', *Cell*, 59: 847-57.
- Scott, M. R., J. Safar, G. C. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1997. 'Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 14279-84.
- Seilhean, D., C. Duyckaerts, and J. J. Hauw. 1995. 'Fatal familial insomnia and prion diseases', *Rev Neurol (Paris)*, 151: 225-30.
- Seo, J. S., M. H. Moon, J. K. Jeong, J. W. Seol, Y. J. Lee, B. H. Park, and S. Y. Park. 2012. 'SIRT1, a histone deacetylase, regulates prion protein-induced neuronal cell death', *Neurobiol Aging*, 33: 1110-20.
- Sepulveda-Diaz, J. E., S. M. Alavi Naini, M. B. Huynh, M. O. Ouidja, C. Yanicostas, S. Chantepie, J. Villares, F. Lamari, E. Jospin, T. H. van Kuppevelt, A. G. Mensah-Nyagan, R. Raisman-Vozari, N. Soussi-Yanicostas, and D. Papy-Garcia. 2015. 'HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology', *Brain*, 138: 1339-54.

- Shewmaker, F., R. B. Wickner, and R. Tycko. 2006. 'Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19754-9.
- Shyu, W. C., S. Z. Lin, M. F. Chiang, D. C. Ding, K. W. Li, S. F. Chen, H. I. Yang, and H. Li. 2005. 'Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model', *J Neurosci*, 25: 8967-77.
- Sigurdson, C. J., and M. W. Miller. 2003. 'Other animal prion diseases', *Br Med Bull*, 66: 199-212.
- Simoneau, S., H. Rezaei, N. Sales, G. Kaiser-Schulz, M. Lefebvre-Roque, C. Vidal, J. G. Fournier, J. Comte, F. Wopfner, J. Grosclaude, H. Schatzl, and C. I. Lasmezas. 2007. 'In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers', *PLoS Pathog*, 3: e125.
- Skillback, T., C. Rosen, F. Asztely, N. Mattsson, K. Blennow, and H. Zetterberg. 2014. 'Diagnostic performance of cerebrospinal fluid total tau and phosphorylated tau in Creutzfeldt-Jakob disease: results from the Swedish Mortality Registry', *JAMA Neurol*, 71: 476-83.
- Snow, A. D., R. Kisilevsky, J. Willmer, S. B. Prusiner, and S. J. DeArmond. 1989. 'Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases', *Acta Neuropathol*, 77: 337-42.
- Snow, A. D., T. N. Wight, D. Nochlin, Y. Koike, K. Kimata, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1990. 'Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie', *Lab Invest*, 63: 601-11.
- Song, C. H., H. Furuoka, C. L. Kim, M. Ogino, A. Suzuki, R. Hasebe, and M. Horiuchi. 2008. 'Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice', *J Gen Virol*, 89: 1533-44.
- Soto, C. 1999. 'Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches', *J Mol Med*, 77: 412-18.
- Soto, C., and G. P. Saborio. 2001. 'Prions: disease propagation and disease therapy by conformational transmission', *Trends Mol Med*, 7: 109-14.
- Soto, C., and N. Satani. 2011. 'The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases', *Trends Mol Med*, 17: 14-24.
- Soto, Claudio, Richard J. Kascsak, Gabriela P. Saborío, Pierre Aucouturier, Thomas Wisniewski, Frances Prelli, Regina Kascsak, Enrique Mendez, David A. Harris, James Ironside, Fabrizio Tagliavini, Richard I. Carp, and Blas Frangione. 2000. 'Reversion of prion protein conformational changes by synthetic b-sheet breaker peptides', *The Lancet*, 355: 192-97.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, R. Hecker, K. M. Pan, A. L. Burlingame, and S. B. Prusiner. 1992. 'Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid', *Biochem*, 31: 5043-53.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thompson. 1983. 'The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 100: 64-119.
- Tagliavini, F. 2008. 'Prion therapy: Tetracyclic compounds in animal models and patients with Creutzfeldt-Jakob disease', *Alzheimer Dement*, 4: 149-50.
- Tagliavini, F., G. Forloni, L. Colombo, G. Rossi, L. Girola, B. Canciani, N. Angeretti, L. Giampaolo, E. Peressini, T. Awan, L. De Giola, E. Ragg, O. Bugiani, and M. Salmona. 2000. 'Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro', *J Mol Biol*, 300: 1309-22.
- Takenouchi, T., Y. Iwamaru, M. Sato, T. Yokoyama, and H. Kitani. 2009. 'Establishment of an SV40 large T antigen-immortalized bovine brain cell line and its neuronal differentiation by dibutyryl-cyclic AMP', *Cell Biol Int*, 33: 187-91.
- Takeuchi, H., T. Mizuno, G. Zhang, J. Wang, J. Kawanokuchi, R. Kuno, and A. Suzumura. 2005. 'Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport', *J Biol Chem*, 280: 10444-54.
- Tamguney, G., K. P. Francis, K. Giles, A. Lemus, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 2009. 'Measuring prions by bioluminescence imaging', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 15002-6.
- Taraboulos, A., A. Serban, and S. B. Prusiner. 1990. 'Scrapie Prion Proteins Accumulate in the Cytoplasm of Persistently Infected Cultured Cells', *J Cell Bio*, 110: 2117-32.

- Tateishi, J., P. Brown, T. Kitamoto, Z. M. Hoque, R. Roos, R. Wollman, L. Cervenakova, and D. C. Gajdusek. 1995. 'First experimental transmission of fatal familial insomnia', *Nature*, 376: 434-35.
- Tateishi, J., T. Kitamoto, M. Z. Hoque, and H. Furukawa. 1996. 'Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents', *Neurology*, 46: 532-37.
- Telling, G. C., T. Haga, M. Torchia, P. Tremblay, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1996. 'Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice', *Genes Dev*, 10: 1736-50.
- Telling, G. C., P. Parchi, S. J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugaresi, P. Gambetti, and Stanley B. Prusiner. 1996. 'Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity', *Science*, 274: 2079-82.
- Telling, G. C., M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, K. C. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1994. 'Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 9936-40.
- Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1995. 'Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein', *Cell*, 83: 79-90.
- Terada, T., Y. Tsuboi, T. Obi, K. Doh-ura, S. Murayama, T. Kitamoto, T. Yamada, and K. Mizoguchi. 2010. 'Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate', *Acta Neurol Scand*, 121: 127-30.
- Thackray, A. M., O. Andreoletti, and R. Bujdoso. 2016. 'Bioassay of prion-infected blood plasma in PrP transgenic *Drosophila*', *Biochem J*, 473: 4399-412.
- Thackray, A. M., Y. Di, C. Zhang, H. Wolf, L. Pradl, I. Vorberg, O. Andreoletti, and R. Bujdoso. 2014. 'Prion-induced and spontaneous formation of transmissible toxicity in PrP transgenic *Drosophila*', *Biochem J*, 463: 31-40.
- Thackray, A. M., F. Muhammad, C. Zhang, M. Denyer, J. Spiropoulos, D. C. Crowther, and R. Bujdoso. 2012. 'Prion-induced toxicity in PrP transgenic *Drosophila*', *Exp Mol Pathol*, 92: 194-201.
- Thackray, A. M., F. Muhammad, C. Zhang, Y. Di, T. R. Jahn, M. Landgraf, D. C. Crowther, J. F. Evers, and R. Bujdoso. 2012. 'Ovine PrP transgenic *Drosophila* show reduced locomotor activity and decreased survival', *Biochem J*, 444: 487-95.
- Tilly, G., J. Chapuis, D. Vilette, H. Laude, and J. L. Vilotte. 2003. 'Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305: 548-51.
- Tobler, I., T. Deboer, and M. Fischer. 1997. 'Sleep and Sleep Regulation in Normal and Prion Protein-Deficient Mice', *J Neurosci*, 17: 1869-79.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rüllicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, and J. C. Manson. 1996. 'Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein', *Nature*, 380: 639-42.
- Todd, N. V., J. Morrow, K. Doh-ura, S. Dealler, S. O'Hare, P. Farling, M. Duddy, and N. G. Rainov. 2005. 'Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease', *J Infect*, 50: 394-6.
- Togo, T., N. Sahara, S. H.
- Cookson Yen, N., T. Ishizawa, M. Hutton, R. de Silva, A; Lees, and D. W. Dickson. 2002. 'Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy', *J Neuropathol Exp Neurol*, 61: 547-56.
- Toni, M., E. Spisni, C. Griffoni, S. Santi, M. Riccio, P. Lenaz, and V. Tomasi. 2006. 'Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes Fyn/Erk 1/2 signal transduction', *J Biomed Biotechnol*, 2006: 69469.
- Torres, J. M., J. Castilla, B. Pintado, A. Gutierrez-Adan, O. Andreoletti, P. Aguilar-Calvo, A. I. Arroba, B. Parra-Arrondo, I. Ferrer, J. Manzanares, and J. C. Espinosa. 2013. 'Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice', *Emerg Infect Dis*, 19: 1938-47.

- Toupet, K., V. Compan, C. Crozet, C. Mourton-Gilles, N. Mestre-Frances, F. Ibos, P. Corbeau, J. M. Verdier, and V. Perrier. 2008. 'Effective gene therapy in a mouse model of prion diseases', *PLoS One*, 3: e2773.
- Tranchant, C., N. Sergeant, A. Wattez, Mohr. M., J. M. Warter, and A. Delacourte. 1997. 'Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63: 240-46.
- Tremblay, P., Z. Meiner, M. Galou, C. Heinrich, C. Petromilli, T. Lisse, J. Cayetano, M. Torchia, W. Mobley, H. Bujard, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1998. 'Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 12580-85.
- TSCS. 1998. 'Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology', *Science*, 282: 2012-18.
- Tsuboi, Y., K. Doh-Ura, and T. Yamada. 2009. 'Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases', *Neuropathology*, 29: 632-6.
- Tucker, K. L., M. Meyer, and Y. A. Barde. 2001. 'Neurotrophins are required for nerve growth during development', *Nat Neurosci*, 4: 29-37.
- Turk, E., D. B. Teplow, L. E. Hood, and S. B. Prusiner. 1988. 'Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins', *Eur J Biochem*, 176: 21-30.
- Tycko, R., R. Savtchenko, V. G. Ostapchenko, N. Makarava, and I. V. Baskakov. 2010. 'The alpha-helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel beta-sheet structure in PrP fibrils: evidence from solid state nuclear magnetic resonance', *Biochemistry*, 49: 9488-97.
- Tzaban, S., G. Friedlander, O. Schonberger, L. Horonchik, Y. Yedidia, G. Shaked, R. Gabizon, and A. Taraboulos. 2002. 'Protease-Sensitive Scrapie Prion Protein in Aggregates of Heterogeneous Sizes', *Biochem*, 41: 12868-75.
- Um, J. W., H. B. Nygaard, J. K. Heiss, M. A. Kostylev, M. Stagi, A. Vortmeyer, T. Wisniewski, E. C. Gunther, and S. M. Strittmatter. 2012. 'Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons', *Nat Neurosci*, 15: 1227-35.
- Uro-Coste, E., H. Cassard, S. Simon, S. Lugan, J. M. Bilheude, A. Perret-Liaudet, J. W. Ironside, S. Haïk, C. Basset-Leobon, C. Lacroux, K. Pech, N. Streichenberger, J. Langeveld, M. W. Head, J. Grassi, J. J. Hauw, F. Schelcher, M. B. Delisle, and O. Andreoletti. 2008. 'Beyond PrP^{res} type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease', *PLoS Pathog*, 4: e1000029.
- Vanik, D. L., K. A. Surewicz, and W. K. Surewicz. 2004. 'Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions', *Mol Cell*, 14: 139-45.
- Varges, D., H. Manthey, U. Heinemann, C. Ponto, M. Schmitz, W. J. Schulz-Schaeffer, A. Krasnianski, M. Breithaupt, F. Fincke, K. Kramer, T. Friede, and I. Zerr. 2016. 'Doxycycline in early CJD: a double-blinded randomised phase II and observational study', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Vidal, C., C. Herzog, A. M. Haeberle, C. Bombarde, M. C. Miquel, J. Carimalo, J. M. Launay, S. Mouillet-Richard, C. Lasmezas, D. Dormont, O. Kellermann, and Y. Bailly. 2009. 'Early dysfunction of central 5-HT system in a murine model of bovine spongiform encephalopathy', *Neuroscience*, 160: 731-43.
- Viles, J. H., M. Klewpatinond, and R. C. Nadal. 2008. 'Copper and the structural biology of the prion protein', *Biochem Soc Trans*, 36: 1288-92.
- Vilette, D. 2008. 'Cell models of prion infection', *Vet Res*, 39: 10.
- Vilette, D., O. Andreoletti, F. Archer, M. F. Madelaine, J. L. Vilotte, S. Lehmann, and H. Laude. 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: 4055-9.
- Vilotte, J. L., S. Soulier, R. Essalmani, M. G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J. C. Da Silva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M. F. Madelaine, S. Rakatobe, A. Le Dur, D. Vilette, and H. Laude. 2001. 'Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp', *J Virol*, 75: 5977-84.
- Vorberg, I., A. Raines, B. Story, and S. A. Priola. 2004. 'Susceptibility of Common Fibroblast Cell Lines to Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents', *J Infect Dis*, 189: 431-39.

- Wadsworth, J. D. F., E. A. Asante, M. Desbruslais, J. M. Linehan, S. Joiner, I. Gowland, J. Welch, L. Stone, S. E. Lloyd, A. F. Hill, S. Brandner, and J. Collinge. 2004. 'Human Prion Protein with Valine 129 Prevents Expression of Variant CJD Phenotype', *Science*, 306: 1793-96.
- Wagner, J., S. Ryazanov, A. Leonov, J. Levin, S. Shi, F. Schmidt, C. Prix, F. Pan-Montojo, U. Bertsch, and et al. 2013. 'Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease', *Acta Neuropathol*, 125: 795-813.
- Wang, J. Z., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. 'Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease', *Nat Med*, 2: 871-75.
- Wang, J. Z., and F. Liu. 2008. 'Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons', *Prog Neurobiol*, 85: 148-75.
- Wang, J. Z., and Z. H. Wang. 2015. 'Senescence may mediate conversion of tau phosphorylation-induced apoptotic escape to neurodegeneration', *Exp Gerontol*, 68: 82-6.
- Wang, J., B. Y. Zhang, J. Zhang, K. Xiao, L. N. Chen, H. Wang, J. Sun, Q. Shi, and X. P. Dong. 2016. 'Treatment of SMB-S15 Cells with Resveratrol Efficiently Removes the PrP(Sc) Accumulation In Vitro and Prion Infectivity In Vivo', *Mol Neurobiol*, 53: 5367-76.
- Wang, X. F., C. F. Dong, J. Zhang, Y. Z. Wan, F. Li, Y. X. Huang, L. Han, B. Shan, C. Gao, J. Han, and X. P. Dong. 2008. 'Human tau protein forms complex with PrP and some GSS- and fCJD-related PrP mutants possess stronger binding activities with tau in vitro', *Mol Cell Biochem*, 310: 49-55.
- Wang, Y., and E. Mandelkow. 2016. 'Tau in physiology and pathology', *Nat Rev Neurosci*, 17: 5-21.
- Ward, H. J., D. Everington, S. N. Cousens, B. Smith-Bathgate, M. Leitch, S. Cooper, C. Heath, R. S. Knight, P. G. Smith, and R. G. Will. 2006. 'Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study', *Ann Neurol*, 59: 111-20.
- Weber, P., A. Giese, N. Piening, G. Mitteregger, A. Thomzig, M. Beekes, and H. A. Kretzschmar. 2006. 'Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 15818-23.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S.-Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. 'A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 1858-62.
- Weise, J., O. Crome, R. Sandau, W. Schulz-Schaeffer, M. Bahr, and I. Zerr. 2004. 'Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity', *Neurosci Lett*, 372: 146-50.
- Weissmann, C., M. Enari, P. C. Klöhn, G. Rossi, and E. Flechsig. 2002. 'Molecular biology of prions', *Acta Neurobiol Exp*, 62: 153-66.
- White, A. R., P. Enever, M. Tayebi, R. Mushens, J. Linehan, S. Brandner, D. Anstee, J. Collinge, and S. Hawke. 2003. 'Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease', *Nature*, 422: 80-83.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson, and S. Brenner. 1986. 'The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314: 1-340.
- White, M. D., M. Farmer, I. Mirabile, S. Brandner, J. Collinge, and G. R. Mallucci. 2008. 'Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10238-43.
- Whittle, I. R., R. S. Knight, and R. G. Will. 2006. 'Unsuccessful intraventricular pentosan polysulphate treatment of variant Creutzfeldt-Jakob disease', *Acta Neurochir (Wien)*, 148: 677-9; discussion 79.
- Wickner, R. B., F. Dyda, and R. Tycko. 2008. 'Amyloid of Rnq1p, the basis of the [PIN+] prion, has a parallel in-register beta-sheet structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2403-8.
- Wilham, J. M., C. D. Orru, R. A. Bessen, R. Atarashi, K. Sano, B. Race, K. D. Meade-White, L. M. Taubner, A. Timmes, and B. Caughey. 2010. 'Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays', *PLoS Pathog*, 6: e1001217.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, and P. G. Smith. 1996. 'A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK', *The Lancet*, 347: 921-25.

- Wille, H., M. D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F. E. Cohen, D. A. Agard, and S. B. Prusiner. 2002. 'Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 3563-8.
- Williams, A., P. J. Lucassen, D. Ritchie, and M. Bruce. 1997. 'PrP Deposition, Microglial Activation, and Neuronal Apoptosis in Murine Scrapie', *Exp Neurol*, 144: 433-38.
- Xi, Y. G., L. Ingrosso, A. Ladogana, C. Masullo, and M. Pocchiari. 1992. 'Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation', *Nature*, 356: 598-601.
- Xu, X. H., and Z. Zhong. 2013. 'Disease modeling and drug screening for neurological diseases using human induced pluripotent stem cells', *Acta Pharmacol Sin*, 34: 755-64.
- Zahn, R., A. Liu, T. Lührs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wüthrich. 2000. 'NMR solution structure of the human prion protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 145-50.
- Zanata, S. M., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, G. N. M. Hajj, L. B. Chiarini, R. Nomizo, A. R. O. Freitas, A. L. B. Cabral, K. S. Lee, M. A. Juliano, E. de Oliveira, S. G. Jacchieri, A. Burlingmae, L. Huang, R. Linden, R. R. Brentani, and V. R. Martins. 2002. 'Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection', *EMBO J*, 21: 3307-16.
- Zanusso, G., M. Fiorini, S. Ferrari, A. Gajofatto, A. Cagnin, A. Galassi, S. Richelli, and S. Monaco. 2011. 'Cerebrospinal fluid markers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease', *Int J Mol Sci*, 12: 6281-92.
- Zanusso, G., S. Monaco, M. Pocchiari, and B. Caughey. 2016. 'Advanced tests for early and accurate diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease', *Nat Rev Neurol*, 12: 325-33.
- Zhang, H., K. Kaneko, J. T. Nguyen, T. L. Livshits, M. A. Baldwin, F. E. Cohen, T. L. James, and S. B. Prusiner. 1995. 'Conformational Transitions in Peptides Containing Two Putative alpha-Helices of the Prion Protein', *J Mol Biol*, 250: 514-26.
- Zhou, M., G. Ottenberg, G. F. Sferrazza, and C. I. Lasmezas. 2012. 'Highly neurotoxic monomeric alpha-helical prion protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 3113-8.
- Zhu, C., U. S. Herrmann, J. Falsig, I. Abakumova, M. Nuvolone, P. Schwarz, K. Frauenknecht, E. J. Rushing, and A. Aguzzi. 2016. 'A neuroprotective role for microglia in prion diseases', *J Exp Med*, 213: 1047-59.

Table des illustrations

Figure 1 : Polymorphismes et mutations du gène <i>PRNP</i>	13
Figure 2 : Tableau lésionnel caractéristique des ESST	18
Figure 3 : Plaques de type Kuru dans la MCJ sporadique	20
Figure 4 : Plaques multicentriques dans le cervelet d'un patient atteint d'un GSS	20
Figure 5 : Plaques florides	21
Figure 6 : Structure secondaire de la PrP humaine (23-230)	27
Figure 7 : Modèle structural de la PrPc liée à des molécules de cuivre	30
Figure 8 : Représentation des différents modèles de structures tertiaire et quaternaire pour la PrPsc	34
Figure 9 : Modèle autocatalytique de conversion de la PrPc en PrPsc	35
Figure 10 : Modèle autocatalytique de nucléation-polymérisation de la PrPc en PrPsc	36
Figure 11 : Exemple caractéristique de deux souches d'ESST	38
Figure 12 : Principe de la PMCA	44
Figure 13 : Principe de la RT-QuIC	46
Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation des neurones mécanosensitifs (cerclés de rouge) chez <i>C. elegans</i>	50
Figure 15 : Accumulation de PrPsc dans le cerveau de drosophiles	52
Figure 16 : Représentation schématique du gène humain de tau, du transcrit humain primaire et des 6 isoformes de tau dans le SNC	56
Figure 17 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la plus longue isoforme de tau. (D'après (Buée et al. 2000))	57
Figure 18 : Les dégénérescences neurofibrillaires	58
Figure 19 : Représentation schématique de la progression spatio-temporelle des DNF ..	62
Figure 20 : Plaque sénile et sa couronne de neurites dystrophiques	63
Figure 21 : Plaque amyloïde et marquage tau-positif dans le cerveau d'un patient vMCJ	66
Figure 22 : Implication de TACE et de PDK1 dans la physiopathologie des maladies à prions et de la MA. (Pietri et al. 2013)	75
Figure 23 : L'Unfolded Protein Response et ses cascades d'activation	77
Figure 24 : Croisement de lignées et obtention d'animaux exprimant la protéine tau humaine dans tous les neurones et la PrP dans les neurones mécanosensibles	115
Figure 25 : Quantification par qRT-PCR des différents gènes d'intérêt	116
Figure 26 : Profils de migration de la PrP des différentes lignées <i>C. elegans</i>	117
Figure 27 : Profils de migration après digestion à la protéinase K	118
Figure 28 : Immunomarquage des lignées <i>C. elegans</i> à l'aide de l'anticorps PHF-1	119
Figure 29 : Viabilité cellulaire après exposition aux différents composés	137
Figure 30 : Effets des traitements sur l'accumulation de PrPres dans des cultures de CGNtg650 infectées par un homogénat MM1 sporadique	139
Figure 31 : Effets des traitements sur l'accumulation de PrPres dans des cultures de CGNtgVal infectées par un homogénat VV2 sporadique	140
Figure 32 : Effets des traitements sur la survie neuronale	141
Figure 33 : Evaluation <i>in vivo</i> de l'astemizole, de la doxycycline ainsi que de leur association	143
Figure 34 : Cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation anormale de tau	153

Table des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la PrPc <i>versus</i> la PrPsc.	33
Tableau 2 : Classification des différents sous types moléculaires.	40
Tableau 3 : Sites de phosphorylation de tau et implication des kinases et des phosphatases. (Wang and Liu 2008).	60

Physiopathologie et thérapeutique des prions humains: une approche cellulaire

Résumé:

Les maladies à prions sont des pathologies neurodégénératives d'évolution fatale, transmissibles, pour lesquelles aucun traitement efficace n'existe, et qui associent sur le plan neuropathologique une spongiose, une gliose astrocytaire et microgliale, une perte neuronale, et une accumulation de la forme anormalement repliée (PrP^{Sc}) de la protéine prion cellulaire codée par l'hôte (PrP^C). Certaines formes de cette maladie sont associées à une tauopathie et présentent des lésions neuropathologiques similaires à celles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce travail de thèse nous avons utilisé un modèle de cultures primaires de neurones afin d'explorer d'une part la relation entre la protéine prion et la physiopathologie de la protéine tau, et d'étudier d'autre part la propagation de souches humaines et l'effet de composés anti-prions sur cette propagation. Nos résultats indiquent que l'hyperphosphorylation de tau en réponse à l'exposition de PrP recombinantes est mutation dépendante, conformation dépendante, partiellement dépendante de la PrP^C et est médiée par la kinase PDK1. Nous avons aussi démontré pour la première fois que la propagation d'isolats humains de maladie de Creutzfeldt-Jakob est possible dans un modèle *in vitro* et permet une évaluation rapide de l'efficacité de composés anti-prions, confirmée *in vivo*. Ces travaux ont donc permis de mieux caractériser la relation protéine amyloïde-physiopathologie de tau, d'ouvrir des perspectives de recherche dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la maladie d'Alzheimer, et d'apporter un modèle unique permettant d'évaluer rapidement les effets de molécules anti-prions vis-à-vis des souches les plus pertinentes, dans une stratégie de repositionnement thérapeutique.

Mots clés : [Prion, tau, thérapeutique, Maladie d'Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob]

Physiopathology and therapy of human prions diseases: a cellular approach

Abstract:

Prion diseases are fatal transmissible neurodegenerative disorders, with no effective treatment. Brain lesions include neuronal vacuolization, astrogliosis, neuronal loss and the accumulation of PrP^{Sc}, an abnormal isoform of the host-encoded cellular prion protein (PrP^C). Some forms of prion diseases are associated with tau fibrillar pathology similar to that observed in Alzheimer's disease except that Aβ peptides are replaced by PrP. Here we used a primary neuronal cultures to first explore the interplay between the formation of prion protein assemblies and the occurrence of tau pathology, and secondly to evaluate *in vitro* human strain propagation and the efficiency of some antiprion compounds towards human prions. We showed that tau hyperphosphorylation in response to recombinant PrPs exposition was mutation-dependent, conformation-dependent and varied with the PrP^C expression level of exposed neurons. This effect was mediated by PDK1 kinase. We also demonstrated for the first time that human prion isolates could propagate in an *in vitro* model. This model was also useful to evaluate the efficacy of antiprion compounds that was further validated *in vivo*. Our results help us to better understand the amyloid protein-tau physiopathology interplay and provide a useful and unique tool for fast evaluation of therapeutic compounds active against human prion strains in a repositioning strategy in such rare but devastating diseases.

Keywords: [Prion, tau, therapy, Alzheimer's disease, Creutzfeldt-Jakob disease]