



HAL
open science

Rôle des cellules immunitaires et effet des cannabinoïdes dans la physiopathologie des maladies à prions

Sevda Cordier-Dirikoc

► **To cite this version:**

Sevda Cordier-Dirikoc. Rôle des cellules immunitaires et effet des cannabinoïdes dans la physiopathologie des maladies à prions. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Nice Sophia Antipolis, 2008. Français. NNT: . tel-00317568

HAL Id: tel-00317568

<https://theses.hal.science/tel-00317568>

Submitted on 3 Sep 2008

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

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

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS – UFR Sciences
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du titre de
Docteur en Sciences

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue par

Sevda CORDIER-DIRIKOC

RÔLE DES CELLULES IMMUNITAIRES ET EFFETS DES CANNABINOÏDES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MALADIES À PRIONS

Thèse dirigée par : Dr. Joëlle CHABRY

Soutenue le 8 avril 2008

JURY

Pr. Robert MARSAULT
Dr. Jean-Philippe DESLYS
Dr. Claude CARNAUD
Dr. Vincent BERINGUE
Dr. Joëlle CHABRY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS – UFR Sciences
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du titre de
Docteur en Sciences

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue par

Sevda CORDIER-DIRIKOC

RÔLE DES CELLULES IMMUNITAIRES ET EFFETS DES CANNABINOÏDES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MALADIES À PRIONS

Thèse dirigée par : Dr. Joëlle CHABRY

Soutenue le 8 avril 2008

JURY

Pr. Robert MARSAULT
Dr. Jean-Philippe DESLYS
Dr. Claude CARNAUD
Dr. Vincent BERINGUE
Dr. Joëlle CHABRY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse

*A mes grands-mères,
Irène et Meliha,*

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Pr. Robert Marsault pour avoir accepté de présider ce jury, ainsi qu'aux docteurs Jean-Philippe Deslys, Claude Carnaud et Vincent Beringue qui ont examiné ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le docteur Joëlle Chabry qui tout au long de ces quatre ans a su me conseiller et m'encourager dans les moments de doute. Au delà des techniques scientifiques, tu m'as surtout montré les qualités humaines que requiert le métier de chercheur et notamment la curiosité, l'enthousiasme, la rigueur et la ténacité. Merci pour ta disponibilité, ta confiance et pour la grande liberté que tu m'as accordée. Merci enfin pour ton écoute et nos discussions scientifiques et personnelles passionnantes (et passionnées...!). Une chose est sûre, travailler à tes côtés a été très enrichissant et jamais monotone. Merci pour tout...

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Jean-Pierre Vincent pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pour mon stage de DEA et pour sa disponibilité pendant ma thèse.

Un grand merci à l'ensemble des membres actuels ou anciens du labo 301 pour votre aide, votre écoute et votre soutien : à Mathieu qui m'a tant appris et tant supportée ; à Nicole (ou la militante du Mac et de Canvas) pour son sens aigüe du détail, capable d'embellir n'importe quelle présentation ; à Roxane, (ou la reine de l'initiation à la biologie moléculaire) pour nos moments riches en bonne humeur et en nicotine ; à Baptiste et à Agnès pour tous les bons moments partagés mais aussi pour leur disponibilité et leur soutien, en particulier au moment de la soutenance ; et enfin à Serena, pour sa gentillesse, sa subtilité et son humour décapant... Tous mes encouragements aux deux futurs thésards.

Je tiens aussi à remercier vivement Julie (ou la grande prêtresse du FACS), Fred (ou le grand maître de la microscopie), ainsi que Franck pour ses grands talents de graphiste.

Merci aussi à tous ceux que j'ai eu la chance de côtoyer de près ou de loin au cours de ces années : Natacha, Carole, Antoine, Jean, Thierry, Anny, Emilie, Laura et bien d'autres encore...

Je souhaite enfin remercier ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur amour et leur soutien inconditionnel. Et pour finir, un immense merci à toi, Sylvain, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue (et supportée !) depuis le début. Sans toi, je n'y serai peut-être pas arrivé ou du moins pas de cette façon. Il n'y a pas de mots assez forts pour exprimer l'immensité de mon affection...

SOMMAIRE

I/ Présentation générale des Encéphalopathies spongiformes Transmissibles (EST).....	1
A/ Historique et définition.....	1
1) Historique.....	1
2) Définition du prion	2
3) Neuropathologie.....	4
B/ Les formes humaines.....	6
1) Les formes sporadiques.....	6
2) Les formes familiales.....	7
3) Les formes infectieuses ou acquises.....	8
C/ Les formes animales.....	13
1) La tremblante du mouton.....	13
2) L'encéphalopathie spongiforme bovine.....	14
3) Le dépérissement chronique des cervidés.....	15
4) Autres EST.....	16
D/ Modèles animaux expérimentaux, notions de souche et de barrière d'espèces.....	16
II/Expression et fonctions physiologiques de la PrPc.....	19
A/ Génétique, structure et expression.....	19
1) La protéine Prion cellulaire (PrPc).....	19
a) Génétique.....	19
b) Structure primaire et tridimensionnelle.....	19
c) Expression tissulaire et ontogénèse.....	21
d) Localisation subcellulaire et trafic.....	25
2) Protéine homologue : Doppel.....	28
a) Génétique.....	28
b) Structure.....	29
c) Expression.....	30
3) Protéine homologue : Shadow.....	31
B/ Physiologie de la PrPc dans le système nerveux central.....	33
1) Modèles transgéniques pour l'étude de la fonction de la PrPc.....	33
a) Souris invalidées pour le gène <i>prnp</i>	33
b) Les mutants de délétion des régions amino-terminale et centrales de la PrP.....	34
2) Partenaires de la PrPc.....	37
a) Partenaires non protéiques.....	37
b) Partenaires protéiques.....	39
c) Fonctions potentielles de la PrPc.....	43

3) Fonctions potentielles de la PrPc dans le système nerveux central.....	42
a) PrPc, stress oxydant et cuivre.....	42
b) Neuroprotection et signalisation de survie.....	43
c) PrPc et phénomènes pro-apoptotiques.....	46
d) Rôle de la PrPc dans la synapse.....	47
e) Adhésion, croissance neuronale et neurogénèse.....	48
C/Physiologie de la PrPc dans le système immunitaire.....	50
1) Expression de la PrPc dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes.....	50
a) Expression de la PrPc au cours de l'ontogénèse.....	50
b) Expression de la PrPc dans les cellules immunes matures.....	51
c) Expression de la PrPc au cours de l'activation lymphocytaire.....	51
2) Expression de Doppel dans le système immunitaire.....	52
3) Fonctions potentielles de la PrPc dans le système immunitaire.....	52
a) Rôle de la PrPc dans la maturation des lymphocytes T.....	52
b) Trafic et maturation de la PrPc dans les lymphocytes T.....	53
c) Apport des expériences de cross-linking et des souris transgéniques <i>prnp</i> ^{0/0}	54
4) Expression des protéines PrP et Dpl et de leurs récepteurs dans les splénocytes murins (Article 1).....	57
III/La PrPsc.....	65
A/ Caractéristiques biochimiques.....	65
B/ Mécanismes de conversion.....	66
1) L'hypothèse du tout protéique.....	66
2) Les modèles de conversion proposés.....	69
C/Modèles transgéniques pour l'étude des EST.....	72
1) Relation entre temps d'incubation et expression de la PrPc.....	72
2) Modèles transgéniques des formes familiales des EST.....	74
3) Délimitation des séquences nécessaires à la réplication.....	75
4) Expression ectopique ou conditionnelle de la PrP.....	76
D/Mécanismes de la neurotoxicité.....	78
1) Toxicité directe de la PrPsc et des formes mutantes de la PrP.....	78
2) Toxicité indirecte de la PrPsc.....	81
E/ Modèles cellulaire de la propagation des prions.....	86
1) Les différents modèles de culture cellulaire permissifs aux prions.....	86
2) Intérêts et utilisation de ces modèles.....	90
F/Axes thérapeutiques.....	91
1) Stratégies thérapeutiques connues.....	91
a) Les composés poly-anioniques.....	92
b) Les composés poly-cationiques.....	97
c) Les composés tétrapyrroliques.....	98

d) Les antibiotiques polyèniques.....	99
e) Les composés tétracycliques.....	100
f) Les composés tricycliques.....	101
g) Les peptides “ β -sheet breaker”.....	102
h) L’immuno-thérapie.....	102
2) Les cannabinoïdes : molécules anti-prions ?.....	104
a) Introduction aux cannabinoïdes.....	104
b) Inhibition de l’accumulation de PrPsc par le cannabidiol (Article 2).....	109
c) Mécanismes d’action potentiels du CBD dans les neuroblastomes infectés.....	113
IV/ Implication du système immunitaire et du système nerveux périphérique dans la propagation de la PrPsc jusqu’au système nerveux central.....	116
A/ Les infections par voie périphérique.....	116
B/ Lympho-invasion et neuro-invasion.....	118
1) Lympho-invasion.....	118
a) Mise en évidence de l’importance des organes lymphoïdes secondaires.....	118
b) Implication des cellules du système immunitaire.....	118
c) Effet d’une déplétion temporaire des cellules dendritiques lors d’une infection par voie périphérique (Article 3).....	126
2) Neuro-invasion.....	129
V/Conclusions et perspectives.....	132
Références bibliographiques.....	135

I/ Présentation générale des Encéphalopathies Spongiformes

Transmissibles

A/ Historique et définition

1) Historique

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST), plus communément appelées maladies à prions, constituent un ensemble de maladies neuro-dégénératives rares dont l'issue est toujours fatale. Ces maladies, qui touchent aussi bien l'homme que l'animal, suscitent depuis bientôt deux siècles un vif intérêt, aussi bien dans l'esprit des scientifiques que du grand public. En effet, la première manifestation d'une forme d'EST remonte au 18^{ème} siècle avec la description d'une maladie touchant les ovins de façon endémique à travers toute l'Europe : la Scrapie ou la tremblante du mouton. Il est aisé de comprendre la préoccupation causée par cette affection étant donnée l'importance du commerce du textile pendant dans la révolution industrielle. En 1920 et 1921, les docteurs Creutzfeldt et Jakob décrivent chez l'Homme une maladie du système nerveux central qui provoque des lésions histopathologiques particulières (Creutzfeldt, 1920 ; Jakob, 1921). Mais ce n'est que dans les années 1930 qu'une des principales caractéristiques des EST allait être mise à jour : la transmissibilité. Si l'on suspecte dès le début du 20^{ème} que la propagation de la Scrapie au sein des troupeaux puisse être de nature contagieuse, ce n'est qu'en 1939 que la preuve expérimentale sera apportée par Cuillé et Chelle. Ces derniers démontrent le caractère infectieux de cette maladie en réussissant à transmettre la Scrapie entre moutons, ainsi que du mouton à la chèvre par des essais d'inoculation (Cuille and Chelle, 1939). Deux décennies plus tard, les docteurs Gajdusek et Zigas décrivent une maladie du nom de Kuru qui décimait les aborigènes de Papouasie-Nouvelle-Guinée (Gajdusek and Zigas, 1957). Sur une suggestion de William Hadlow qui souligna les similitudes histopathologiques existantes entre la Scrapie qu'il étudiait et le Kuru (Hadlow, 1959), Gajdusek et ses collaborateurs entreprirent de transmettre le Kuru à des chimpanzés, ce qu'ils réussirent en 1966 (Gajdusek et al., 1966; Gajdusek et al., 1967). La maladie de Creutzfeldt-Jakob, fut elle aussi transmise à des chimpanzés par la même équipe (Gibbs et al., 1968). A partir de ce moment ces pathologies humaines ou animales, entraînant des atteintes spécifiques du système nerveux central et au caractère transmissible, seront regroupées au sein d'un seul et même groupe de pathologies : les EST.

Plus récemment, ce fut l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), appelée « maladie de la vache folle » par le grand public, qui fit passer les EST du statut de maladies rares et anecdotiques à celui de catastrophe sanitaire potentielle. En effet, on estime à plus de 900.000 le nombre de bovins qui auraient été infectés entre 1984 et 1995. Parallèlement, l'émergence à partir

de 1995 d'une forme inhabituelle de la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez des personnes anormalement jeunes pour ce type de maladie posera rapidement la question de la possible transmission de l'ESB à l'homme par consommation de viandes et d'abats de bovins contaminés (Will et al., 1996). Les résultats expérimentaux apportés au cours de ces 10 dernières années ont confirmé cette hypothèse.

Dernièrement, la maladie du dépérissement chronique des cervidés, qui touchent les cerfs et les élans, s'est propagée en moins de dix ans à travers les Etats-Unis et le Canada et touchent maintenant les cervidés sauvages. Dans ces pays, cette maladie pourrait poser un véritable problème de santé publique équivalent à celui engendré par la crise de la « vache folle » en Europe dans les années 90. Par ailleurs, le plan d'éradication de la Scrapie entrepris par l'union européenne qui consiste à faire de l'élevage sélectif des génotypes résistants à la Scrapie, montre à quel point les EST demeurent un sujet de préoccupation actuel.

2) Définition du prion

La période d'incubation des EST étant exceptionnellement longue, l'agent infectieux a initialement été considéré comme un virus lent (Cho, 1976). Cependant, des travaux de recherche ultérieurs ont indiqué que l'agent infectieux différait significativement des virus et autres agents conventionnels connus. En 1967, Alper et ses collègues ont montré que l'agent responsable de la tremblante était extrêmement résistant aux traitements qui détruisent normalement les acides nucléiques, tels que les radiations ionisantes ou les UV (Alper et al., 1967). Les résultats des auteurs indiquaient que le poids moléculaire minimum de l'agent infectieux correspondait à 200 kDa (Alper et al., 1966). Il s'agissait là d'une taille *a priori* trop petite pour correspondre à un virus ou n'importe quel autre agent infectieux connu, d'où le qualificatif d'Agent Infectieux Non Conventionnel (ATNC) qui sera employé par la suite pour désigner l'agent infectieux des EST. Ces constats ont conduit à l'élaboration d'hypothèses alternatives. Selon l'une d'entre elles, l'agent infectieux pourrait être un virino, c'est-à-dire une petite molécule informationnelle (très probablement un acide nucléique) encapsulée à l'intérieur d'un manteau protéine (Kimberlin, 1982). La petite taille de l'acide nucléique et le solide manteau protéique d'un virino pourrait expliquer la résistance des acides nucléiques aux procédures qui les détruisent normalement. Bien que cette hypothèse explique plusieurs des observations expérimentales, aucun acide nucléique spécifique d'une particule infectieuse des EST n'a pu être identifié avec certitude (Prusiner, 1998). En 1967, dans un article visionnaire, J.S. Griffith évoque pour la première fois, la possibilité que le matériel infectieux puisse être une protéine qui aurait l'étonnante capacité de se répliquer dans l'organisme (Griffith, 1967). En 1982, Stanley Prusiner reprend cette hypothèse et formule

« la théorie de la protéine seule », il propose le terme de « **prion** » par analogie avec virion pour désigner les «small **proteinaceous infectious particles** » (Prusiner, 1982).

L'évènement moléculaire clé des EST est donc la conversion d'une protéine ubiquitaire de l'hôte, la protéine prion cellulaire, PrPc, en une isoforme anormale, la PrPsc (sc pour Scrapie). Ces deux protéines diffèrent dans leur conformation mais elles sont issues d'un seul et même gène, le gène *Prnp*. Contrairement à la PrPc, la PrPsc présente une structure secondaire riche en feuillet β et une résistance partielle à la dégradation par les protéases. Cette dernière s'accumule dans le système nerveux central sous forme de dépôts protéiques agrégés et constitue le composant principal des microfibrilles amyloïdes (Bolton et al., 1982). La détection de la PrPsc demeure la base des tests biochimiques permettant le diagnostic d'une EST. La PrPsc est partiellement résistante à l'action de la protéinase K (PK) alors que la PrPc est totalement dégradée par cette protéinase. Sur Western-blot, la PrPc présente un poids moléculaire apparent compris entre 30 et 36 kDa (**Fig.1**, puits 1). Le traitement de la PrPsc par la protéinase K génère un fragment de poids moléculaire apparent de 27 à 33 kDa, conséquence à la dégradation des 90 premiers acides aminés à l'extrémité amino-terminale (**Fig.1**, puits 4). Cette réaction enzymatique est couramment utilisée pour distinguer la PrPsc de son isoforme cellulaire. Cette variation caractéristique du profil de migration électrophorétique est constatée pour les 3 bandes de la PrP, qui correspondent aux différentes formes de glycosylation de cette protéine : non-, mono-, et di-glycosylée.

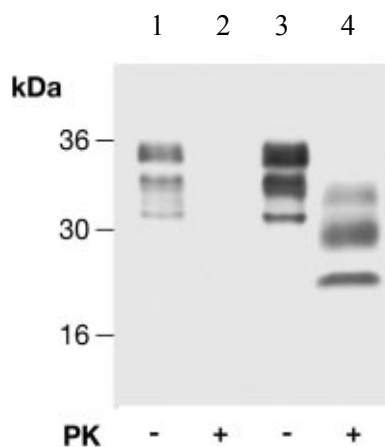


Figure 1 : Profil électrophorétique des PrP en gel dénaturant et réducteur

En l'absence de protéolyse, les PrP normales et pathologiques ne peuvent être distinguées et existent sous trois formes (non- mono- di-glycosylées) (puits 1 et 3). Après digestion à la protéinase K (notée ici PK), la PrPc est entièrement digérée (puits 2). Le traitement de la PrPsc à la PK génère des fragments d'un poids moléculaire compris entre 27 à 33 kDa (puits 4).

3) Neuropathologie

Les lésions anatomo-pathologiques provoquées par les EST se caractérisent par une atteinte exclusive du système nerveux central. La triade histopathologique classique des EST est définie par :

- la spongiose ou la vacuolisation des neurones
- la gliose, qui correspond à une prolifération importante des astrocytes
- la perte neuronale (**Fig.2**).

Ces changements s'accompagnent de façon systématique par l'accumulation de la PrP^{sc} dans le système nerveux central, même si la quantité et la distribution des dépôts de PrP^{sc} ne sont pas toujours corrélées avec la localisation et la sévérité des tissus endommagés (Prusiner, 1998 ; Lasmezas et al., 1997). L'accumulation de PrP^{sc} peut conduire dans certains cas à la formation de plaques amyloïdes qui peuvent être mises en évidence par une coloration au ronge congo, au bleu cyan ou à l'acide périodique de Schiff et également marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine prion. La présence de plaques amyloïdes n'est pas une constante et est plus particulièrement associée à certains types d'EST comme le Kuru ou le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

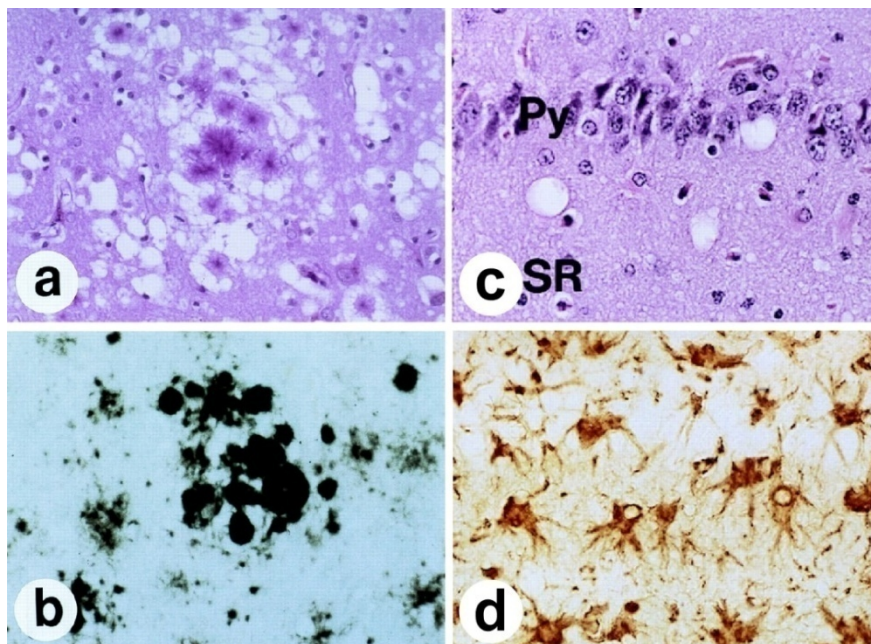


Figure 2 : Histopathologie des EST, illustration d'un cas de nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

a et b, (a) Coupe du cortex frontal après coloration à l'acide périodique de Schiff montrant des agrégats de plaques entourés par la dégénérescence spongiforme *(b)* Les multiples plaques et les dépôts sont immunopositifs pour la PrP. *c et d, Coupes adjacentes de cerveaux dans la zone de l'hippocampe (c)* Coloration à l'éosine hématoxyline illustrant la dégénérescence spongiforme du neuropile. *Py*, couche pyramidale ; *SR*, stratum radiatum. *(d)* L'immunoréactivité pour la GFAP (Glial fibrillary acidic protein) permet la mise en évidence des astrocytes et de leur prolifération. *D'après Prusiner, 1998.*

L'étude des signes histopathologiques permet non seulement l'établissement d'un diagnostic *post-mortem* sûr mais aussi l'identification du type ou du sous-type d'EST par l'étude du profil lésionnel dans sa localisation et son intensité.

La spongiose, selon le type d'EST considérée, peut être moindre, modérée ou sévère et se caractérise par des vacuoles intracellulaires qui peuvent être diffuses ou groupées, de formes rondes ou ovales. Les vacuoles se retrouvent essentiellement dans la zone du neuropile, à savoir dans les plages de substance grise situées entre les corps cellulaires neuronaux, les corps cellulaires gliaux et les capillaires sanguins. D'un point de vue ultrastructural, ce changement correspond à des prolongements cellulaires élargis (principalement des neurites) contenant des fragments de membrane recourbés ainsi que du matériel amorphe (Liberski et al., 1992). Les causes de la vacuolisation sont encore méconnues. Une coalescence de petites vacuoles ou d'une digestion enzymatique mal contrôlée dans le compartiment lysosomal pourrait rendre compte de l'existence de ces vacuoles intraneurales (Rezaie and Lantos, 2001). C'est notamment l'observation de la distribution des vacuoles dans le cerveau qui permet la définition d'un profil lésionnel caractéristique d'un type ou d'une souche d'EST.

Les EST ne s'accompagnent en apparence d'aucune réaction du système immunitaire. On constate cependant une activation des astrocytes, l'astrogliose (DeArmond et al., 1992), ainsi que de la microglie dans certains cas, la microgliose (Williams et al., 1994). Alors que dans la plupart des maladies neuro-dégénératives, la gliose est déclenchée en réponse à un dysfonctionnement neuronal, dans le cas des EST, elle précède la perte neuronale et se produit en même temps que l'apparition des dépôts de PrP^{sc} (Betmouni et al., 1996; Diedrich et al., 1991; Guioy et al., 1994; Jendroska et al., 1991). L'activation astrocytaire se manifeste par une prolifération, une hypertrophie et une augmentation de l'expression de la protéine GFAP. Les astrocytes activés réinvestissent les espaces vacuolaires. L'activation de la microglie est révélée quant à elle par l'expression de marqueurs de surface spécifiques tels que CD11b, CD45 ou CD68 (Van Everbroeck et al., 2002).

La mort neuronale apparaît tardivement dans les EST : elle se produit bien après les phénomènes d'accumulation de PrP^{sc}, de gliose et de spongiose. Néanmoins, elle précède l'apparition des symptômes neurologiques. Le lien de causalité entre d'une part l'accumulation de PrP^{sc}, la spongiose, la gliose et d'autre part la mort neuronale demeure vague et controversé, même si la chronologie de ces événements est relativement bien établie. De nombreuses études suggèrent un mécanisme apoptotique pour la perte neuronale. Des études histopathologiques menées sur des coupes de cerveaux ont révélé une morphologie typique des cellules apoptotiques ainsi qu'un marquage TUNEL positif, associé à la fragmentation de l'ADN (Giese et al., 1995).

Les phénomènes de mort neuronale et de gliose peuvent être également observées dans d'autres maladies neuro-dégénératives comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, c'est pourquoi le changement spongiforme est le signe histologique le plus spécifique des EST.

B/ Les formes humaines

Les EST humaines comprennent la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et son variant (vMCJ), le Kuru, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF). D'un point de vue étiologique, elles peuvent être divisées en trois groupes : les formes familiales, sporadiques et acquises. On parle de formes familiales ou génétiques lorsque celles-ci sont associées à des mutations du gène codant la protéine prion, de formes sporadiques lorsque la cause est inconnue et qu'il n'existe *a priori* aucune prédisposition génétique, et enfin de formes infectieuses lorsqu'elles surviennent suite à une exposition à l'agent infectieux. Il est important de remarquer que quelle que soit leur étiologie, toutes les EST sont infectieuses et donc transmissibles.

1) Les formes sporadiques

La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (sMCJ), dite classique, est de loin l'EST humaine la plus fréquente (85% des cas), bien qu'elle reste rare avec une prévalence de un cas par million par an dans le monde et une incidence similaire entre homme et femme (Brown et al., 1987). Elle affecte principalement des individus âgés de 45 à 75 ans, la moyenne étant de 60 ans. L'examen neurologique ne traduit aucune anomalie détectable à l'IRM, seul le tracé de l'EEG présente des anomalies dans environ 60% des cas (Kretzschmar et al., 1996). Les symptômes les plus fréquents sont une démence progressive accompagnée d'un myoclonus. Une fois la maladie déclarée, la mort de l'individu survient rapidement, dans un délai de 3 à 6 mois. La susceptibilité génétique constitue un facteur important dans les MCJ de formes sporadiques. Le gène *PRNP* présente un polymorphisme courant sur le codon 129 qui conduit à la traduction d'une méthionine ou d'une valine. Au sein de la population caucasienne 52% des individus sont homozygotes en « méthionine » (M129M), 12% sont homozygotes en « valine » (V129V) et 36% sont hétérozygotes (M129V) (Collinge et al., 1991). L'homozygotie sur ce locus prédispose au développement de la MCJ (Palmer et al., 1991). Plus de 80% des cas de MCJ sporadiques sont homozygotes M129M. Le phénotype associé à la MCJ est également affecté par ce polymorphisme.

2) Les formes familiales

Environ 15% des EST humaines sont familiales. Elles se caractérisent par une transmission autosomique dominante et sont toutes liées à des mutations dans le gène *PRNP*, situé sur le chromosome 20 et encodant la protéine prion (PrP) (**Fig.3**).

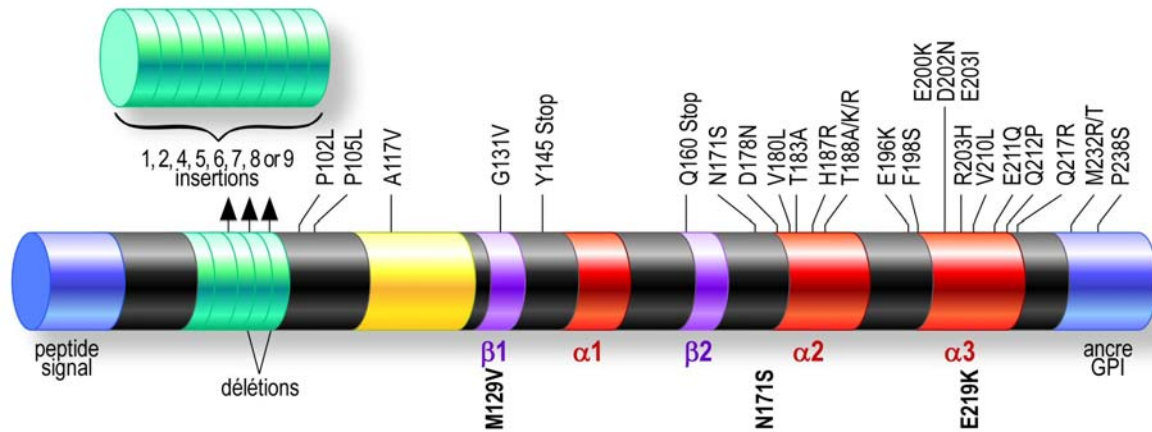


Figure 3 : Mutations et polymorphismes du gène *PRNP* humain. Les mutations associées aux formes familiales des EST sont indiquées au-dessus de la représentation de la structure protéique et les polymorphismes courants en dessous, en gras. Le peptide signal est clivé lors de la maturation de la protéine prion cellulaire. Les régions octapeptidiques sont représentées par les segments bleus foncés et les insertions octapeptidiques pathogéniques sont indiquées au-dessus. La partie jaune indique une région conservée, les domaines correspondant aux feuillets β sont tracés en violet et les hélices α en rouge. Le GPI indique l'ancre glycosylphosphatidylinositol. Seules les mutations les plus fréquentes ont été représentées sur ce schéma.

a) Les formes familiales de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (fMCJ)

En général, chez les individus atteints des formes familiales de MCJ, la maladie se déclare à un âge plus précoce en comparaison avec ceux atteints de la forme sporadique de MCJ, en moyenne entre 40 et 60 ans. La durée de la maladie est également plus longue et elle peut s'étendre sur plusieurs années. En revanche, les manifestations cliniques sont similaires et caractérisées par des troubles cognitifs, une irritabilité liée à la dépression accompagnée d'une ataxie. Plus de 50 mutations différentes ont été identifiées dans les cas de MCJ familiales (fMCJ). Néanmoins 4 mutations ponctuelles, situés sur les codons 102, 178, 200 et 210, ainsi que les mutations responsables des insertions de 5 à 6 répétitions d'octapeptides sont responsables à elles seules de 95% des cas de fMCJ observés (Capellari et al., 2005). La fMCJ la plus courante résulte sans conteste de la mutation sur le codon 200 (E200K). Les études histopathologiques démontrent une atteinte classique, même si la sévérité de ces atteintes et leur localisation fine sont spécifiques à chaque mutation. Dans la plupart des cas les dépôts de PrP^{Sc} apparaissent de manière ponctiforme. D'autres mutations entraînent un phénotype suffisamment distinct de celui de la MCJ sporadique pour justifier l'apparition de nouveaux noms de maladie.

b) Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker se caractérise par des troubles de la phonation, de la déglutition, une ataxie cérébelleuse progressive, accompagnée d'un déclin cognitif (Ghetti et al., 1995). L'âge moyen du début de la maladie se situe généralement entre 40 et 60 ans, même s'il existe des descriptions de cas dès l'âge de 20 ans. La durée de la maladie peut varier de 5 à 11 ans. Les changements neuropathologiques observés sont assez uniques au sein des EST familiales et se caractérisent par la présence de plaques amyloïdes essentiellement multicentriques à travers tout le cerveau (Masters et al., 1981). Bien que de nombreuses mutations ponctuelles aient été décrites pour le syndrome GSS, les mutations P102L, G131V et A117V figurent parmi les plus courantes.

c) L'Insomnie Fatale Familiale (IFF)

L'insomnie fatale familiale présente le phénotype le plus étrange des formes familiales des EST. Le tableau clinique est dominé par une perturbation majeure du cycle veille-sommeil, une insomnie progressive, une dysfonction autonome et la démence. Les études de polysomnographie indiquent la perte des fuseaux du sommeil et l'absence quasi-totale du sommeil paradoxal. Les changements neuropathologiques sont largement localisés dans le thalamus où l'on constate une perte neuronale mais peu de vacuolisations. L'IFF se caractérise par une mutation du codon 178 (D178N) (Medori et al., 1992; Montagna et al., 2003). Néanmoins cette mutation est également retrouvée dans certains cas de fMCJ (Goldfarb et al., 1992). Le phénotype est déterminé par le polymorphisme du codon 129. La mutation D178N associée à l'homozygotie M129M conduit à l'IFF, tandis qu'associée à l'homozygotie V129V ou à l'hétérozygotie M129V, elle conduit à la fMCJ.

3) Les formes infectieuses ou acquises

S'il est vrai que les EST humaines sont qualifiées de transmissibles, jusqu'à récemment, les formes acquises représentaient des situations assez rares et inhabituelles. Les deux types d'interventions médicales les plus fréquemment responsables de MCJ iatrogènes (iMCJ) sont les greffes de dure-mère et les traitements à base d'hormone de croissance extractive provenant de glandes pituitaires de cadavres (Brown et al., 1992). Cependant, les formes acquises les plus connues des EST humaines sont la conséquence d'habitudes alimentaires.

a) Le Kuru

Le Kuru constitue à ce jour la plus importante épidémie humaine d'EST (pour revue, (Collinge et al., 2006)). Le Kuru a atteint des proportions épidémiques au sein de l'ethnie des Fore vivant dans les régions reculées de l'est de la Papouasie Nouvelle Guinée. La maladie touchait principalement les femmes et les enfants des deux sexes, tandis que les adultes de sexe masculin ne représentaient que 2% des cas. Le Kuru devint la première cause de mortalité des femmes dans les villages touchés par la maladie. Selon l'histoire locale, recueillie par les docteurs Gajdusek et Zigas (Gajdusek and Zigas, 1957), les premiers cas seraient apparus dans les années 1920. Ces communautés, à l'occasion de rites funéraires cannibales, s'adonnaient à la consommation d'organes et de tissus de leurs proches décédés. Le partage était tel que les hommes mangeaient généralement les parties considérées nobles comme le cœur ou les muscles, tandis que les femmes et les enfants se contentaient du reste et notamment du cerveau et de la rate, organes hautement infectieux.

Le principal symptôme du Kuru est une ataxie cérébelleuse mais contrairement aux cas de MCJ, la cognition est relativement bien préservée. Les principaux signes histopathologiques se retrouvent dans le cervelet avec une atteinte massive des cellules de Purkinje et des cellules granulaires (Hainfellner et al., 1997). Des plaques amyloïdes unicentriques sont retrouvées également dans le cervelet.

Le Kuru a été extensivement étudié à partir de la fin des années 50 et son suivi a perduré grâce à l'Institut de recherche médicale de Papouasie Nouvelle Guinée. L'interdiction du cannibalisme par les autorités australiennes au milieu des années 50 a permis l'arrêt de la transmission du Kuru et a fourni une occasion unique d'étudier les variations de périodes d'incubation cliniquement silencieuses. En se basant sur l'âge des plus jeunes patients, la période d'incubation la plus courte a été estimée à 5 ans, tandis que la période d'incubation moyenne pour le Kuru se situe autour de 12 ans. Les travaux récents de Collinge et al. montrent que les périodes d'incubation maximales peuvent dépasser 50 ans (Collinge et al., 2006).

Le codon 129 du gène *PRNP* joue également un rôle important dans la période d'incubation du Kuru et la susceptibilité des individus à cette maladie. Les survivants les plus âgés de l'épidémie du Kuru sont hétérozygotes M129V (Lee et al., 2001). Le Kuru a imposé une forte sélection chez les Fores essentiellement en éliminant les individus homozygotes M129M et V129V. Cependant la diversité à l'échelle mondiale des haplotypes et la fréquence des allèles codants de *PRNP* montrent qu'il y a plus d'hétérogénéité que prévu sur cette position compte tenu de l'avantage de survie conféré par l'hétérozygotie en position 129. Mead et ses collaborateurs suggèrent que le cannibalisme aurait été responsable de plusieurs épidémies d'EST

au cours de la préhistoire humaine, imposant ainsi une forte sélection équilibrante du gène *PRNP* (Mead et al., 2003).

b) Le variant de la maladie de creutzfeldt-Jakob (vMCJ)

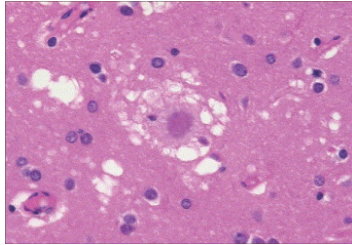
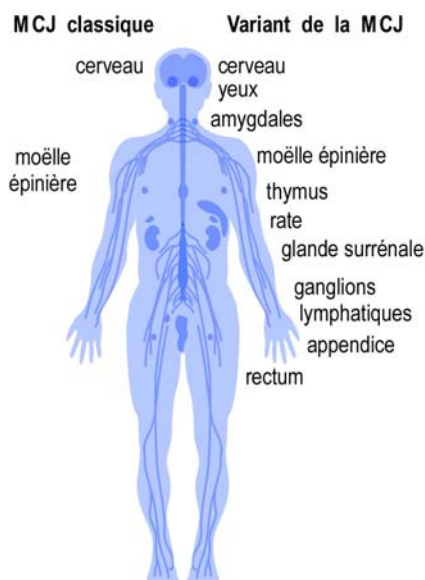


Figure 4: Histopathologie du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Coupe de cerveau colorée à l'éosine-hématoxyline illustrant les plaques florides caractéristiques du vMCJ : une large plaque amyloïde est entourée d'une couronne de vacuoles (grossissement X400).

En 1994, une nouvelle forme d'EST humaine émerge au Royaume-Uni. De 1995 à 2007, l'unité de surveillance de la MCJ au Royaume-Uni a recensé 161 cas du nouveau variant de MCJ (<http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm>). Une vingtaine de cas ont été identifiés en France et quelques cas isolés ont été rapportés dans d'autres pays européens. Les patients présentent une évolution clinique et une pathologie bien distinctes des formes sporadiques de MCJ. La maladie se déclare chez des individus jeunes, en moyenne 29 ans, et se caractérise par des symptômes psychiatriques accompagnés de troubles

sensoriels. La phase clinique de la maladie est également plus longue, en moyenne de 14 mois. Les études neuropathologiques indiquent une vacuolisation étendue accompagnée de nombreux dépôts de PrPsc disposés en plaque florides (**Fig. 4**).



Contrairement aux formes traditionnelles de MCJ, les dépôts de PrPsc sont détectés au niveau périphérique dans la plupart des organes lymphoïdes (**Fig. 5**), permettant ainsi un diagnostic *ante mortem* par biopsie des amygdales (Markham, 2000).

Figure 5 : Distribution de la PrPsc dans les tissus humains des patients atteints de MCJ et de vMCJ.

Le schéma illustre les tissus dans lesquels la PrPsc a été détectée par « Western-blot ». Le vMCJ présente une pathogenèse périphérique distincte des formes classiques de MCJ avec une implication majeure des tissus lymphoréticulaires.

L'émergence de cette maladie dans un pays déjà frappé depuis une dizaine d'années par l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) mettra rapidement médecins et scientifiques sur la

piste de la transmission de l'ESB à l'homme. Cette hypothèse sera confirmée par un ensemble de résultats expérimentaux :

- Des macaques inoculés par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) avec du broyat de cerveau de bovin atteint d'ESB, présentent des lésions histopathologiques similaires à celle retrouvées dans les cas de vMCJ, notamment les plaques florides (Lasmezas et al., 1996)
- Sur Western-blot, les profils de migration électrophorétiques de PrP^{sc} issus de tissus infectés de vMCJ ou d'ESB sont tout à fait comparables (Collinge et al., 1996; Hill et al., 1997a)
- La transmission expérimentale de l'ESB et du vMCJ à des souris montrent que ces deux agents possèdent des propriétés biologiques indistinguables (Bruce et al., 1997).

Tous les individus atteints à ce jour étaient des individus homozygotes M129M (Will et al., 2000). Même si le nombre de cas recensés au Royaume-Uni semble diminuer depuis 2000 (Andrews et al., 2003), des inquiétudes persistent concernant l'implication du polymorphisme du codon 129. La question est de savoir si ce polymorphisme représente un facteur de susceptibilité à l'infection ou un facteur jouant sur la durée du temps d'incubation, auquel cas une seconde vague d'épidémie de vMCJ pourrait être redoutée, d'autant plus que des souris « humanisées » M129V, après infection par l'agent du vMCJ, développent la maladie (Asante et al., 2006). Le génotype M129V est le plus courant chez l'Homme et ce travail montre que même les hétérozygotes pourraient à terme développer une maladie.

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

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

- Les cas les moins fréquents : les cas liés aux interventions neurochirurgicales, greffes de cornée et implantation d'électrodes profondes

Dès 1960, Nevin et ses collaborateurs suggèrent la possibilité d'une transmission de la MCJ par l'utilisation d'instruments neurochirurgicaux souillés (Nevin et al., 1960). On recense à ce jour 4 cas de MCJ liés à une intervention chirurgicale (Will, 2003). Ces contaminations sont dues à la résistance hors normes des prions face aux procédés habituels de décontamination et stérilisation (Dickinson and Taylor, 1978). Sans les nouvelles mesures de précaution qui comprennent un traitement à la soude (1M) et un autoclavage à haute température, l'agent infectieux peut subsister pendant plusieurs années sur du matériel chirurgical (Weissmann et al., 2002). En 1974, fut rapporté le premiers cas de MCJ provoquée à la suite d'une greffe de cornée

(Duffy et al., 1974). Un deuxième cas fut décrit en 1997 (Heckmann et al., 1997), pour lequel un délai de 30 ans s'était écoulé entre la greffe cornéenne et le développement de la MCJ. En 1977 sont rapportés deux cas de MCJ contractés par des patients 2 ans après des enregistrements électroencéphalographiques utilisant l'implantation d'électrodes profondes (Bernoulli et al., 1977). Les électrodes avaient été utilisées chez un patient qui ne fut diagnostiqué de MCJ qu'après son décès. Bien que les électrodes avaient été désinfectées avec de la vapeur d'éthanol et de formaldéhyde, elles ont été suspectées d'avoir transmis la maladie. Cette hypothèse a été confirmée par la transmission de la MCJ à un chimpanzé 18 mois après implantation intradurale des électrodes suspectes (Brown et al., 1992).

- Les cas les plus fréquents : les cas liés aux greffes de dure-mère et aux injections d'hormones de croissance

Les premiers cas de MCJ liés à des greffes de dure-mère ont été rapportés en 1987. Au total au moins 136 cas ont été identifiés dans le monde dont 88 au Japon (Hoshi et al., 2000). Le temps de latence entre la greffe et le début des signes cliniques est en moyenne de 7 ans. La majorité de patients présentent des symptômes et des signes histologiques conformes à la MCJ sporadique.

Les traitements à base d'hormone de croissance extractive ont été initiés dans les années 1950. Plus de 30.000 enfants souffrant d'une insuffisance de synthèse de cette hormone ont fait l'objet de ce traitement jusqu'en 1985. Jusqu'à la découverte des premiers cas, l'hormone était purifiée à partir d'hypophysés prélevés sur des cadavres de patients décédés dans les hôpitaux. Plus de 160 cas ont été décrits à l'échelle mondiale, notamment aux Etats-Unis, au Royaume-Uni, en Nouvelle-Zélande, au Pays-Bas et en France. La proportion globale de cas de MCJ avérés suite au traitement à l'hormone de croissance est de 1%, même si cette proportion est relative entre les différents pays concernés avec l'incidence la plus élevée en France. La période d'incubation moyenne de ces cas est estimée à 12 ans, pouvant s'étendre de 4,5 à 25 ans. Dans la grande majorité de cas, on constate un syndrome cérébelleux progressif suivi de démence.

- Les cas les plus récents : les cas liés aux transfusions sanguines

Jusqu'à dans les années 2000, aucun cas de transmission par voie sanguine n'avait été décrit. Cependant, différentes publications ont montré depuis que l'agent infectieux de l'ESB pouvait être transmis à des moutons par transfusion sanguine (Houston et al., 2000; Hunter et al., 2002). Plus récemment, un article paru dans le journal *Lancet* rapporte le cas d'un patient ayant développé une vMCJ après avoir été transfusé avec le sang d'un donneur décédé quelques années

plus tard de vMCJ (Llewelyn et al., 2004). Deux autres cas similaires furent décrits par la suite (Peden et al., 2004; Wroe et al., 2006).

C/ Les formes animales

1) La tremblante du mouton (Scrapie)

Les premiers cas de Scrapie ont été décrits il y a plus de 250 ans dans divers pays d'Europe et du Moyen-Orient. Cette maladie affecte majoritairement les ovins même si quelques cas ont également été recensés chez les caprins. La Scrapie existe sous forme endémique dans toutes les régions du monde même si certains pays en sont complètement exempts, notamment l'Australie et la Nouvelle Zélande qui ont éradiqué la maladie au prix de mesures de quarantaines draconiennes et de sélection génétique. La durée de la phase clinique peut s'étaler de 2 semaines à 6 mois. Les premiers signes cliniques sont un comportement social inhabituel comme la perte de l'instinct grégaire et une nervosité extrême face aux stimuli environnementaux tel que le contact humain (Dickinson, 1976). L'état de santé général de l'animal se détériore. L'ataxie est courante et le caractère le plus marquant est l'apparition d'un prurit dorsolombaire qui pousse l'animal à se



gratter jusqu'à s'écorcher (**Fig. 6**). C'est ce phénomène qui est à l'origine du mot « Scrapie » pour désigner la tremblante en anglais (to scrape : gratter, se frotter contre). Dans la phase terminale, l'animal qui ne peut plus se nourrir à cause de la perte de la coordination motrice, et finit par dépérir.

Figure 6 : Aspect caractéristique d'un mouton atteint de tremblante

De nombreuses études ont mis en évidence une susceptibilité génétique à la tremblante associée au polymorphisme du gène PRNP. Dans ce gène, situé sur le chromosome 13 chez le mouton, 3 codons variables ont été identifiés comme étant particulièrement importants : ils sont situés en position 136 (alanine A ou valine V), 154 (arginine R ou histidine H) et 171 (R, H ou glutamine Q). A l'état homozygote, l'allèle $A_{136}R_{154}R_{171}$ (ARR) confère une résistance à la maladie et cette résistance diminue à l'état hétérozygote. Les allèles VRQ et ARQ sont considérés comme des allèles de susceptibilité à la tremblante (Hunter, 2007). Cette observation a conduit à la mise en place d'un programme d'éradication de la tremblante à l'échelle européenne par la sélection génétique de l'allèle de résistance ARR.

2) L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)

Les premiers cas d'encéphalopathie spongiforme bovine sont décrits au Royaume-Uni dans les années 1985–1986 (Wells et al., 1987). Dès 1988, l'appartenance de cette maladie au groupe des encéphalopathies spongiformes est montrée par la présence des lésions neurodégénératives caractéristiques des EST, ainsi que par la mise en évidence de l'accumulation de PrPsc dans le cerveau des bovins malades (Hope et al., 1988). Les principaux symptômes décrits sont des troubles comportementaux et moteurs. L'animal développe une certaine agressivité, et perd souvent son instinct grégaire au pâturage. Plus tardivement, il est touché par une ataxie au niveau du train postérieur. Les études épidémiologiques ont rapidement mis en cause l'utilisation des farines de viandes et d'os, distribuées comme complément protéique dans l'alimentation des bovins (Wilesmith et al., 1992). La distribution de ces farines de viandes et d'os n'était pas un fait nouveau, mais les procédés de fabrication avaient été modifiés dans la plupart des sites de fabrication, avec notamment une réduction des températures de chauffage. Compte tenu de l'extraordinaire résistance des agents infectieux impliqués dans ces maladies, ces modifications auraient permis une large dissémination d'un agent infectieux par voie alimentaire chez les bovins. L'origine de cet agent infectieux, éventuellement issu d'un agent responsable de la tremblante, reste encore aujourd'hui inconnue et discutée. Quoiqu'il en soit, le résultat de cette dissémination est illustré sur la **figure 7** qui montre l'évolution du nombre de cas au Royaume-Uni depuis l'identification de cette maladie, et son accroissement extrêmement rapide pendant les premières années jusqu'en 1992–1993 où plus de 30 000 cas cliniques ont été identifiés chaque année.

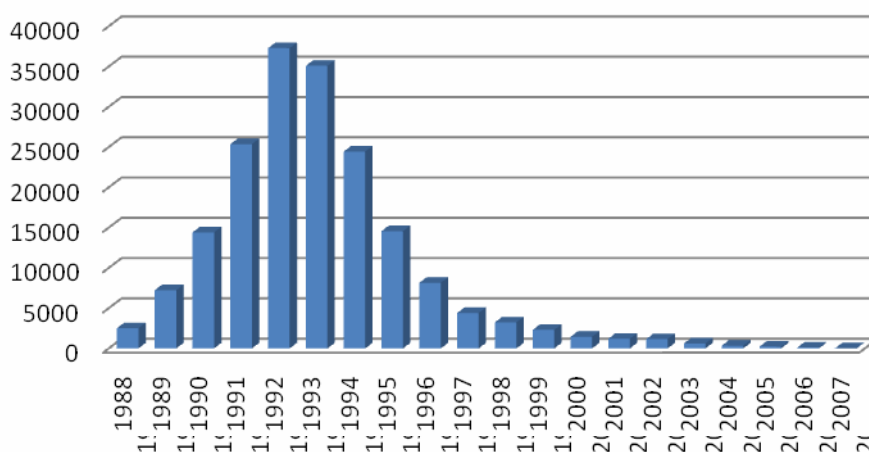


Figure 7 : Nombre de cas d'ESB au Royaume-Uni en fonction de l'année de déclaration de la maladie.
D'après http://oie.int/eng/info/en_esbru.htm

L'interdiction des farines de viandes et d'os dans l'alimentation des bovins, en juillet 1988 en Grande Bretagne, a constitué la première mesure essentielle ayant permis de rompre le cycle de contamination chez les bovins. D'autres mesures seront également mises en place à la fin des

années 1990 au Royaume-Uni dont l'interdiction d'incorporer dans la chaîne alimentaire certains tissus comme le cerveau et le rachis, et l'abattage systématique des troupeaux à la découverte d'un individu atteint. La forte décroissance de l'épidémie au Royaume-Uni après 1993 constitue certainement la meilleure démonstration du rôle d'une contamination par voie alimentaire. Le délai de cinq ans constaté entre l'application de cette mesure et la décroissance de l'épidémie correspond approximativement à la période d'incubation estimée de la maladie chez les bovins. D'autres pays, principalement européens, ont également été touchés mais dans une moindre mesure. L'apparition des cas d'ESB dans ces pays a été attribuée à l'importation de bétail ou de farines animales en provenance du Royaume-Uni. Grâce aux mesures mises en place par l'ensemble des pays concernés, l'épidémie devrait s'éteindre d'ici quelques années, mais la confirmation de la transmissibilité de l'ESB à l'Homme a définitivement modifié la perception du risque représenté par cette maladie bovine.

3) Le dépérissement chronique des cervidés (CWD)

Le dépérissement chronique des cervidés (CWD pour « Chronic wasting disease ») est une EST affectant les élans et les cerfs aux Etats-Unis et au Canada. Initialement décrite chez des cerfs d'élevage dans les années 1960 (Miller and Williams, 2004), il s'agit néanmoins de la seule EST qui touche également des animaux sauvages et en ce sens, elle diffère de la Scrapie et de l'ESB. Néanmoins, le CWD et la Scrapie présente des points communs comme l'accumulation précoce de la PrPsc dans les tissus lymphoïdes suivie d'une accumulation plus tardive dans le système nerveux central. La distribution de la PrPsc contribue à l'efficacité apparente de la transmission horizontale de la maladie probablement par voie orale. Les symptômes cliniques et les lésions neuropathologiques observés sont caractéristiques des EST. Les premiers signes cliniques sont une apathie, un amaigrissement et un comportement inhabituel comme la disparition de la peur de l'homme. Des lésions spongiformes sont mises en évidence dans le cerveau après une période d'incubation prolongée, et la PrPsc peut être détectée pendant la période d'incubation dans les tissus lymphoïdes. Cette maladie est présente aujourd'hui dans 12 états américains et les efforts de surveillance sanitaire se poursuivent. Si l'éradication du CWD chez les cervidés d'élevage demeure l'objectif principal des programmes industriels et fédéraux, l'éradication chez les cervidés sauvages semble peu probable compte tenu des mesures disponibles à l'heure actuelle (pour revue (Sigurdson and Aguzzi, 2007; Williams, 2005)).

4) Autres EST

Parallèlement à la propagation de l'épidémie d'ESB, un peu plus de quatre-vingt cas d'encéphalopathie féline ont été observés au Royaume-Uni depuis 1990. Les chats atteints avaient probablement été contaminés par des sous-produits bovins inclus dans leur nourriture. De la même manière, une quinzaine d'espèces animales vivant dans des zoos ont contracté une encéphalopathie spongiforme entre 1985 et 1998 (pour revue (Sigurdson and Miller, 2003)). Parmi les espèces concernées, on trouve des félins (guépards, pumas, ocelot), des primates, ou encore des bisons et des antilopes. On peut aussi citer le cas de trois autruches frappées d'encéphalopathie au zoo de Hanovre au début des années 90. Dès 1990, l'utilisation de tissus bovins extraits du système nerveux central ou du système lympho-réticulaire sera interdite lors des procédés de fabrication de nourriture pour animaux.

Il existe également une forme d'EST chez le vison. Apparue en 1947 dans un élevage de visons aux Etats-Unis, elle a été depuis signalée au Canada, en Europe, et en Russie (Marsh and Hadlow, 1992). Suite à l'épidémie la plus récente en 1985, où 60% des 5000 visons adultes ont été atteints dans un élevage américain, la contamination par voie alimentaire, à partir de carcasses de moutons atteints de tremblante ou de bovins atteints d'ESB, a été proposée (Marsh and Bessen, 1993 ; Baron et al., 2007).

D/ Modèles animaux expérimentaux, notions de souche et de barrière d'espèces

Suite à la démonstration de la transmissibilité de la tremblante en 1939, de nombreux aspects fondamentaux des EST ont été étudiés à travers des modèles animaux expérimentaux, principalement sur des petits rongeurs chez lesquels il n'existe pas d'EST naturelle. Ces modèles ont été mis en place par des essais d'inoculation sur des animaux de laboratoire, de broyats de cerveaux provenant d'animaux infectés. C'est ainsi qu'en 1961 Chandler parvient à transmettre la Scrapie du mouton à des souris (Chandler, 1961). Par la suite d'autres modèles seront établis par la transmission expérimentale des EST de différentes espèces (mouton, chèvre, vache, vison, homme) sur plusieurs modèles de laboratoire comme la souris, le rat, le hamster, ou le macaque. Ces modèles sont pertinents puisqu'ils reproduisent les symptômes observés chez l'hôte naturel et ont permis de mieux cerner certaines notions concernant les EST comme les notions de souche et de barrières d'espèces.

Lors de l'établissement du modèle expérimental de transmission de la Scrapie à la souris, il a été constaté, après plusieurs passages successifs, que des souches différentes de Scrapie

murines pouvaient émerger. L'apparition de souches multiples établies toutes à partir d'inoculum de cerveaux de moutons infectés constituait un fait assez surprenant.

L'identité d'une souche peut être définie par un ensemble de critères histopathologiques, c'est-à-dire les signes cliniques, le temps d'incubation, le profil lésionnel, la présence ou non de plaques amyloïdes, la localisation cérébrale de dépôts de PrP^{sc}, alternativement le profil de migration électrophorétique de la PrP^{sc}. Les caractéristiques des souches sont extrêmement stables chez une souris de fond génétique donné.

Sur le plan biochimique, les profils de migration électrophorétique de la PrP^{sc} après digestion à la protéinase K et le ratio entre les glycoformes de PrP servent également au typage moléculaire des souches. Combinée à la différence de ratio existant entre les formes de PrP non-, mono-, et di-glycosylées, cette approche a permis de définir quatre types de conformation (**Fig.8**). Si l'on se réfère à la classification proposée par Collinge, trois profils caractérisent les formes sporadiques (type 1 et 2) et iatrogènes (type 3) de MCJ et un quatrième type définit le variant de la MCJ (**Fig.8**). En effet, les différentes conformations stériques de la PrP exposeront différents sites de coupure à l'action de la PK ce qui aurait pour conséquence la formation de fragments de masses moléculaires différentes. Même si cette classification ne rend pas compte de la complexité et du grand nombre de souches de Scrapie, elle a été un argument important pour établir la filiation entre vMCJ et ESB (Collinge et al., 1996 ; Hill et al., 1997).

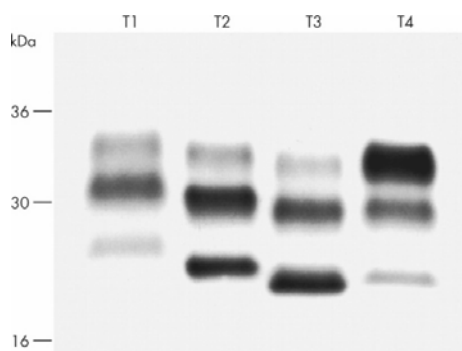


Figure 8 : Caractérisation des différents types de PrP de pathologies humaines. Les profils électrophorétiques des fragments de PrP^{sc} obtenus après digestion à la protéinase K diffèrent selon leur origine : Les profils de type 1 et 2 (T1, T2) caractérisent la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) sporadique, le profil de type 3 caractérise la MCJ iatrogène tandis que le profil de type 4 est typique du nouveau variant de la MCJ et de l'Encéphalopathie spongiforme bovine. *D'après Collinge et al., 1996.*

La notion de souches avait été initialement proposée dans les EST animales naturelles. En effet, la transmission de l'encéphalopathie du vison à des hamsters syriens provoque chez ces derniers l'apparition de deux syndromes bien distincts : l'un est caractérisé par des signes cliniques d'hyperactivité (Hyper), l'autre au contraire par une apathie de l'animal (Drowsy). Le profil de migration électrophorétique de la PrP^{sc} s'est aussi révélé différent pour les deux souches "Hyper et Drowsy" (Bessen and Marsh, 1992a; Bessen and Marsh, 1992b). Après digestion à la protéinase K, la souche "Drowsy" a une masse moléculaire de 2kDa inférieure à celle de la souche "Hyper"

(Bessen and Marsh, 1994). Les deux souches présentent donc des différences aux niveaux cliniques et symptomatologiques mais aussi au niveau moléculaire.

L'existence de plusieurs souches de Scrapie chez un animal exprimant une seule et même séquence de PrP demeure une énigme. Les bases moléculaires à l'origine des variations phénotypiques observées dans les différentes souches ne sont pas élucidées. Ces variations seraient compatibles avec l'existence de génomes viraux, cependant jamais aucun acide nucléique spécifique d'une souche donnée n'a été identifié. En revanche, de nombreuses études proposent que la spécificité d'une souche pourrait être portée par la conformation tridimensionnelle de la PrP^{sc} (Collinge et al., 1996; Legname et al., 2006; Safar et al., 1998; Telling et al., 1996b). Ce sont donc les différences structurales de la PrP^{sc} qui engendreraient la variabilité des souches. Cependant, on ignore toujours comment la spécificité des souches et la conformation tridimensionnelle de la PrP^{sc} peuvent être conservées lors du passage de la maladie dans une espèce dont la PrP présente de différences de séquence primaire.

La transmission d'une EST à une espèce différente de celle de départ est toujours caractérisée par un allongement de la période d'incubation et par une pénétrance incomplète au cours du premier passage. Après plusieurs passages successifs chez le même hôte, le temps d'incubation se raccourcit pour finalement se stabiliser au temps d'incubation caractéristique de la souche. La PrP^{sc} qui s'accumule *de novo* correspond toujours à la séquence de la PrP de l'hôte et pas à celle de l'inoculum (Bockman et al., 1987). Le franchissement de la barrière d'espèce est d'autant plus aisé que les espèces sont génétiquement proches. L'obtention de souris transgéniques exprimant des protéines prion hétérologues (Scott et al., 1989) a permis de montrer que la barrière d'espèce est d'autant plus franchissable que le degré d'homologie de séquence entre le donneur et le receveur est grand (Prusiner et al., 1990). Il existe également des exemples où la barrière d'espèce n'est pas franchie. En dépit de plus de deux siècles de cohabitation, la transmission naturelle de la Scrapie du mouton à l'Homme n'a jamais été formellement démontrée. Il est intéressant de noter que les tentatives d'établissement de modèles de Scrapie chez le lapin et le poulet se sont toujours soldées par un échec : ces espèces semblent résistantes à l'infection. Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la barrière d'espèce sont loin d'être totalement compris.

II/Expression et fonctions physiologiques de la PrPc

A/ Génétique, structure et expression

1) La protéine Prion cellulaire (PrPc)

a) Génétique

La protéine prion est encodée par un gène appelé *PRNP* chez l'Homme et *prnp* chez la souris, situé respectivement sur le bras court du chromosome 20 (locus p12-ter) et sur le chromosome 2. Ce gène est constitué de deux introns et trois exons chez la souris, le mouton et les bovins alors qu'il n'est constitué que de deux exons chez l'Homme et le hamster. Sa séquence est hautement conservée au sein des mammifères, avec plus de 80% d'homologie entre les espèces (Oesch et al., 1991). La totalité de la phase ouverte de lecture est localisée sur le dernier exon (Basler et al., 1986; Kretzschmar et al., 1986), ce qui élimine la possibilité que la PrPc ainsi que sa conformation anormale PrPsc, soient le résultat d'épissages alternatifs (**Fig. 9**). Le promoteur de *prnp*, situé en amont du deuxième exon, ne contient pas de TATAbox et présente un enrichissement de la séquence en GC (Baybutt and Manson, 1997). Il présente ainsi les caractéristiques générales des gènes dits « de ménage » (« housekeeping genes ») exprimés de manière constitutive, même si la présence de sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription de type Sp1, AP1 et AP2 suggère des régulation possibles. Il est important de noter que les taux de messagers de la PrP ne varient pas au cours de l'infection (Chesebro *et al.*, 1985).

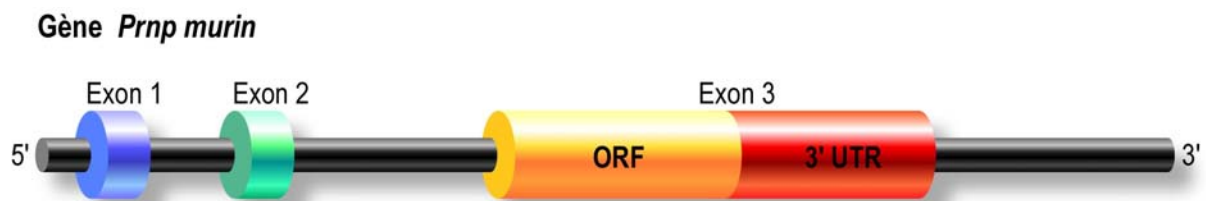


Figure 9 : Représentation schématique du gène *prnp*

b) Structures primaire et tridimensionnelle de la PrPc

Le produit du gène *Prnp* est une sialoglycoprotéine membranaire de 253 acides aminés chez l'homme (254 pour le hamster et la souris) (Stahl et al., 1987). La PrPc est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) rugueux puis transite dans le Golgi avant d'être adressée à la membrane. Dans le RE, elle subit des modifications post-traductionnelles qui consistent en quatre étapes principales¹ (**Fig. 10**) :

- le retrait du peptide signal amino-terminal de 22 résidus.
- la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines 179 et 214.

¹ La numérotation qui suit concerne la séquence PrPc de la souris

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

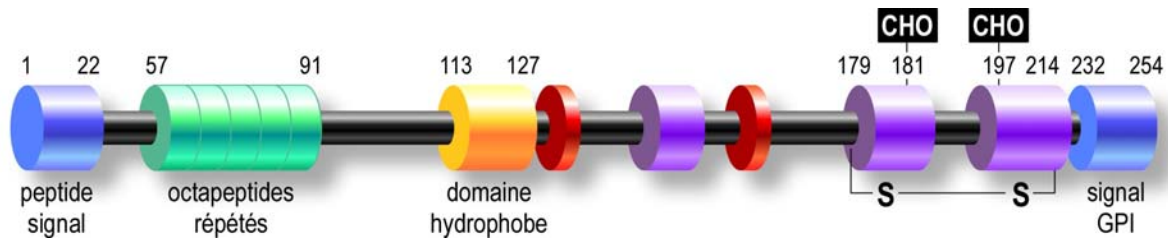


Figure 10 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine prion PrPc chez la souris. Les hélices α sont représentées en violet et les feuillets β en rouge.

La PrPc mature contient donc 209 acides aminés (du résidu 23 au résidu 231) chez l'homme. Deux régions sont particulièrement remarquables :

- La région comprise entre les résidus 51 à 91 correspond à une répétition de, selon les espèces, 4 à 8 séquences consensus d'octapeptides (PHGGGWGQ). Dans tous les cas, ces séquences consensus répétées présentent une capacité à lier les ions cuivre divalents, avec une affinité de l'ordre du micromolaire, ainsi que d'autres ions divalents tels que le zinc ou le manganèse bien qu'avec une affinité moindre (Brown et al., 1997a; Jackson et al., 2001).
- La région comprise entre les résidus 113 et 127 est constituée d'un enchaînement de 15 résidus hydrophobes (AGAAAAGAVVGGGLGG) et représente un domaine hydrophobe totalement conservé entre les espèces mammifères. Cette région peut être corrélée à une topologie transmembranaire aberrante de la PrPc (Hegde et al., 1998). La mutation ponctuelle d'un acide aminé dans ce domaine (A117V) suffit à provoquer un syndrome GSS sans dépôts amyloïdes de PrPsc. La maladie serait donc exclusivement liée à une topologie transmembranaire. Enfin, cette région apparaît de première importance dans la conversion de la PrPc en PrPsc (Chabry et al., 1998; Holscher et al., 1998) ainsi que dans les phénomènes de mort cellulaire (Brown, 2002).

La résolution de la structure tridimensionnelle a été obtenue à partir de PrP recombinantes purifiées. Les études biochimiques et structurales (spectroscopie infra-rouge, dichroïsme circulaire, résonance magnétique nucléaire) ont permis de montrer que la PrPc

comporte deux régions distinctes : une région carboxy-terminale structurée de manière globulaire et une région amino-terminale peu structurée (Riek et al., 1996; Wuthrich and Riek, 2001; Zahn et al., 2000). Le domaine carboxy-terminal est constitué de 3 hélices α (42% des acides aminés), notées H1, H2 et H3, et de 2 feuillets β anti-parallèles (3% des acides aminés) (**Fig.11**) (Pan et al., 1993). L'ensemble de la structure est stabilisée par le pont disulfure intra chaîne reliant les hélices 2 et 3.

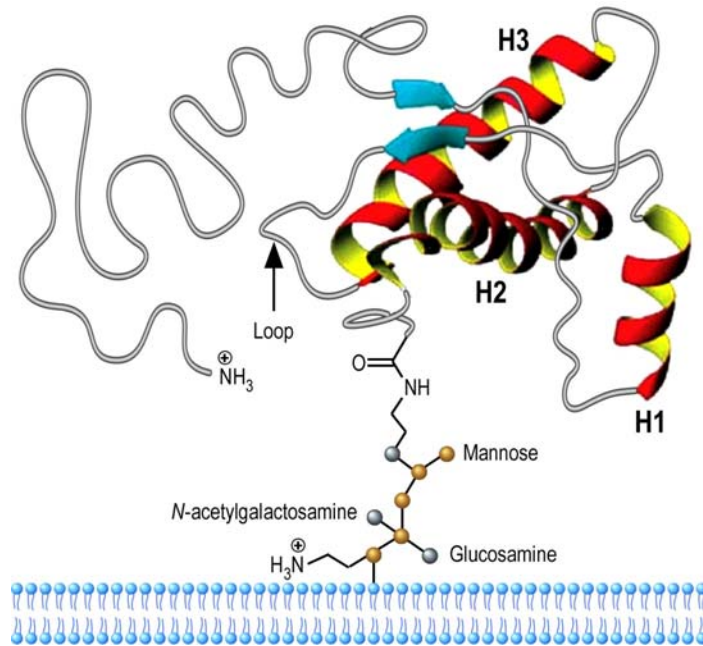


Figure 11 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine prion et de son ancrage à la membrane plasmique par le groupement GPI Les hélices α sont représentées en rouge et jaune, les feuillets β en cyan, et la portion N-terminale non structurée en gris.
D'après Aguzzi et al., 2006.

c) Expression tissulaire et ontogénèse

La PrPc est une protéine ubiquitaire exprimée dans la quasi-totalité des organes et majoritairement dans le cerveau (Bendheim et al., 1992; Chesebro et al., 1985; Robakis et al., 1986). Dans le SNC, la PrPc est présente dans toute la substance grise et paraît absente dans les zones de concentration de fibres myélinisées telles que le corps calleux ou la substance blanche du cervelet. Les quantités les plus élevées de PrPc sont détectées dans l'hippocampe, le cortex et le striatum, tandis que le thalamus et le bulbe olfactif présentent des taux intermédiaires. Les régions du cervelet et du tronc cérébral sont celles qui expriment le plus modérément la PrPc, à l'exception de la couche moléculaire où la PrPc est abondamment exprimée (Barmada et al., 2004). Parmi les différents types neuronaux, les neurones GABAergiques sont ceux qui expriment le plus fortement la PrPc. Les neurones cholinergiques ne sont que faiblement immuno-réactifs à la PrPc et les neurones dopaminergiques ne présentent pas de PrPc détectable par immunomarquage, malgré la présence de quantités importantes d'ARN messager (Ford et al., 2002). A l'échelon cellulaire, la PrPc est majoritairement retrouvée au niveau des boutons synaptiques des neurones (Fournier et al., 1995; Herms et al., 1999). La PrPc est également détectée dans d'autres types cellulaires du SNC, tels que les astrocytes, les cellules microgliales et

les cellules de Schwann, mais avec une intensité bien moindre (Brown et al., 1990; Follet et al., 2002; Ford et al., 2002; Laine et al., 2001; Moser et al., 1995). Ces données ont été principalement obtenues par des techniques basées sur la détection des ARN messagers et à l'aide d'anticorps anti-PrP. Dernièrement, l'apport des modèles de souris transgéniques, chez lesquelles l'expression d'une protéine fluorescente (GFP ou la β -galactosidase) est placée sous contrôle du promoteur du gène *prnp*, a permis de s'affranchir de certaines difficultés liées aux techniques traditionnelles (**Fig.12 et 13**) (Bailly et al., 2004; Barmada et al., 2004).

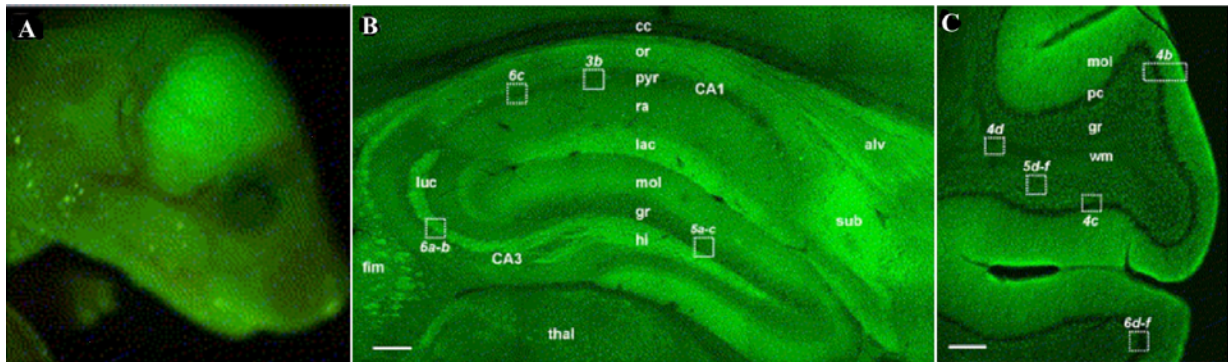


Figure 12 : Distribution de la PrPc chez la souris transgénique PrP-EGFP

(A) Tête d'une souris transgénique PrP-EGFP visualisée à 1 jour post-natal grâce à un microscope de dissection équipé d'une lampe fluorescente et de filtre FITC. (B) Formation hippocampique et du gyrus denté observé sous microscopie confocale. Les abréviations sont : **alv**, alveus ; **cc**, corps calleux ; **fim**, fimbria ; **gr**, couche granulaire ; **hi**, hilus ; **lac**, stratum lacunosum ; **luc**, stratum lucidum ; **or**, stratum oriens ; **pyr**, couche pyramidale ; **ra**, stratum radiatum ; **sub**, subiculum ; **thal**, thalamus. (C) Coupe de cervelet visualisée sous microscopie confocale. Les abréviations sont : **mol**, couche moléculaire ; **pc**, couche cellulaire de Purkinje ; **gr**, couche cellulaire granulaire ; **wm**, substance blanche. Les barres d'échelles correspondent à 200µm.

D'après Barmada et al., 2004.

Ainsi une étude récente a pu mettre en évidence chez la souris, l'expression de la PrPc dès le 7^{ème} jour embryonnaire dans les tissus du SNC en développement ainsi que dans d'autres tissus non-neuronaux (Tremblay et al., 2007). Ces observations sont en accord avec les conclusions des études antérieures réalisées par hybridation *in situ* (Manson et al., 1992) mais la localisation spatio-temporelle de l'expression du gène de la PrP est plus précise. L'expression de la PrPc est détectée en premier lieu dans des cellules neurales post-mitotiques ayant achevées leur processus de différenciation mais pas dans les cellules progénitrices de la zone ventriculaire, actives sur le plan mitotique (Tremblay et al., 2007). La PrPc est également exprimée dans les crêtes neurales qui contribuent au développement du système nerveux périphérique et de multiples organes (cœur, glandes surrénales, thyroïde, etc...) (**Fig.13**). Globalement, le taux d'expression de la protéine continue d'augmenter durant les 2 semaines post-natales puis atteint la stabilité. En effet, l'expression de la PrPc dans le SNC, ne varie pas à l'âge adulte, même au cours du développement d'une EST (Chesebro et al., 1985).

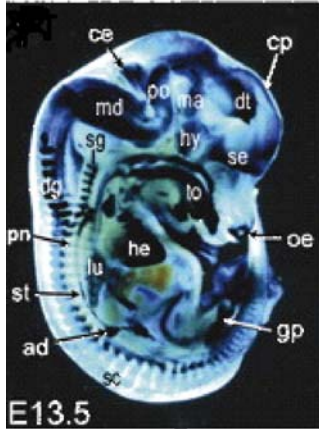


Figure 13 : Expression de la β -galactosidase sous contrôle du promoteur du gène *Prnp* dans le système nerveux, les membres et la peau chez l'embryon de souris au 13^{ème} jour embryonnaire

Vers le 13^{ème} jour embryonnaire, l'expression de la PrPc est détectée dans SNC, dans le système nerveux périphérique et dans de nombreux organes périphériques en développement. Abréviations : ad, surrénales ; ce, cervelet ; cp, plaque corticale ; dg, ganglion de la racine dorsale ; dt, thalamus dorsal ; gp, protubérance génitale ; he, coeur ; hy, hypothalamus ; lu, poumons ; ma, aire mamillaire ; md, medulla ; nt, notochorde ; oe, epithelium olfactif ; po, pons ; pn, nerfs périphériques ; sc, moëlle épinière ; se, septum ; sg, ganglion sympathique ; st, tronc sympathique ; to, langue. *D'après Tremblay et al., 2007.*

Au niveau périphérique, la PrPc est présente dans la plupart des tissus mais à des taux différents. Au sein de chaque tissu ou organe, des sous-populations cellulaires expriment des quantités importantes de PrPc. Globalement, elle est exprimée de façon intermédiaire dans le coeur, les poumons, et les testicules et la rate et de façon faible dans le foie et les muscles. Elle est également présente dans les cellules composant le réseau neuro-immunitaire : nerfs et ganglions périphériques, système nerveux parasymphatique, cellules présentatrices d'antigènes, lymphocytes et moelle osseuse². En résumé, à quelques exceptions près, la PrPc est présente dans tous les organes, seul le niveau d'expression est variable (**Tableau 1**).

² L'expression de la PrPc dans les différentes sous-populations cellulaires du système immunitaire sera détaillée dans le paragraphe II-C/1, p.50-52.

Tissus ou types cellulaires	Expression
Système nerveux central	
Corps cellulaires neuronaux (GRD)	Intensité variable, ~98% positifs
Axones (moteurs et sensoriels)	Intensité variable, > 60% positifs
Fibres de Myéline	Négatif
Système nerveux autonome	
Corps cellulaires neuronaux et axones	Intensité variable, >90% positifs
Système nerveux entérique	
Corps cellulaires neuronaux et axones proximaux	Intense, >95% positifs
Système gastro-intestinal	
Cellules entéroendocrine, lymphocytes intraépithéliaux, myofibroblastes	Positif, intense
Entérocytes	Négatif
Cellules M, cellules de Goblet	Négatif
Ilot de Langerhans	Positif
Pancréas exocrine	Négatif
Foie	Négatif
Système respiratoire	
Cellules neurales du système olfactif	Positif, intense
Cellules du parenchyme pulmonaire	Positif, intense
Système urogénital	
vessie	Positif
Cellules épithéliales rénales	Positif
Testicules et épидидyme	Positif
Cellules de Leydig	Négatif
Système lymphoïde	
Cellules hématopoïétiques progénitrices	Positif
Cellules dendritiques	Positif
Cellules folliculaires dendritiques	Positif, intense
Autres tissus	
Follicules pileux	Positif
kératinocytes	Faiblement positif
Muscle cardiaque	Positif, intensité variable
Péricytes des vaisseaux sanguins	Positif
Endothélium des vaisseaux sanguins	Négatif
Glandes surrénales	Positif, intense

Tableau 1 : Expression et distribution de la PrPc dans les tissus périphériques
D'après Ford et al., 2002

d) Localisation subcellulaire, trafic intracellulaire et modifications post-traductionnelles de la PrPc

- Localisation subcellulaire et trafic de la PrPc

La PrPc est ancrée à la surface externe de la membrane plasmique par l'intermédiaire de son groupement GPI. L'ancre GPI est constituée d'une partie lipidique et d'une partie glucidique. La chaîne glucidique présente des résidus d'acide sialique. La partie lipidique consiste en une chaîne saturée de 18 atomes de carbone : l'acide stéarique. C'est cette partie lipidique qui induit une localisation particulière dans la membrane plasmique au niveau des régions riches en cholestérol et en glycosphingolipides, appelées « rafts » ou radeaux lipidiques (Tiveron et al., 1994). Ces structures sont également connues sous le nom de DRM (detergent resistant microdomains) à cause de leur résistance à la solubilisation par des détergents non ioniques et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires allant du trafic des protéines ou des lipides à la signalisation cellulaire (Brown and London, 1998; Simons and Toomre, 2000). Pour être encore plus précis, il semblerait que la PrPc soit localisée dans une partie plus périphérique et moins structurée des rafts, qualifiée de domaine lipidique semi-ordonné (Madore et al., 1999) (**Fig.14**).

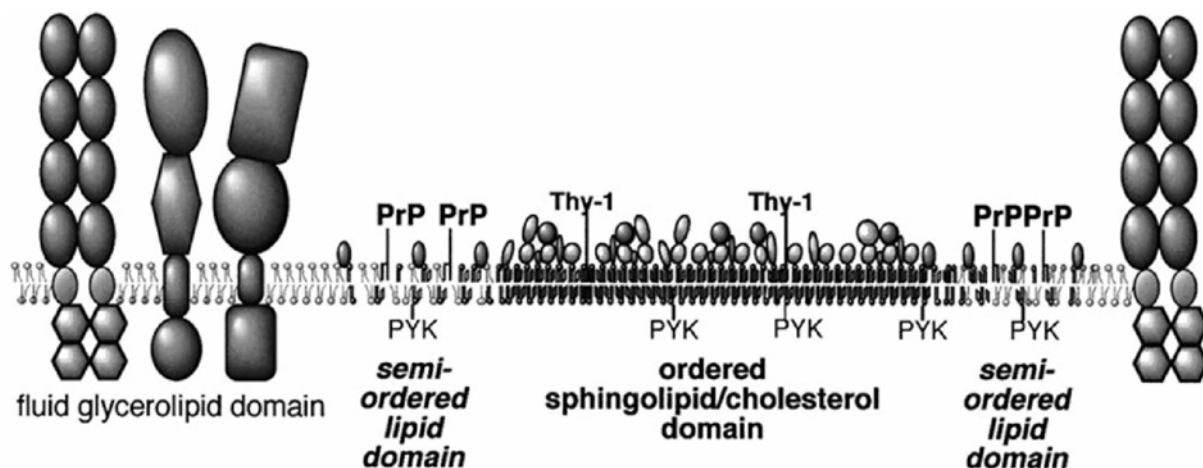


Figure 14 : Localisation de la PrPc au sein des rafts de la membrane plasmique

En gras sont représentés les sphingolipides (chaînes d'acides gras saturés, les ballons représentent les glycosylations) qui forment un domaine hautement ordonné dans lequel est localisée la protéine Thy-1. La PrP est située dans les domaines lipidiques semi-ordonnés qui touchent les domaines fluides glycérolipidiques (chaînes d'acides gras non saturés) dans lesquels sont enchâssées les protéines transmembranaires.

D'après Madore et al., 1999.

Des expériences de « pulse-chase » réalisées sur des neuroblastomes murins ont permis de montrer que le temps de demi-vie de la PrPc varie de 3 à 6 heures (Caughey et al., 1989). Dans des cultures primaires d'origine neuronale ou lymphoïde, le temps de demi-vie peut être encore plus court, de l'ordre d'une heure (Parizek et al., 2001). Après internalisation, la plupart des molécules de PrPc sont recyclées à la membrane plasmique (Shyng et al., 1993) et seulement 10%

d'entre elles sont dégradées à chaque cycle par la voie lysosomiale (Lehmann et al., 1999). Les voies d'endocytose empruntées par la PrPc font toujours l'objet de débats. Certains auteurs observent une voie exclusivement dépendante des cavéoles, tandis que d'autres démontrent une endocytose *via* les puits recouverts de clathrine (Shyng et al., 1994; Vey et al., 1996). Il est possible que l'une de 2 voies soit privilégiée selon le type cellulaire concerné, ou encore que ces 2 voies co-existent dans une même cellule (**Fig.15**) (Fivaz et al., 2002).

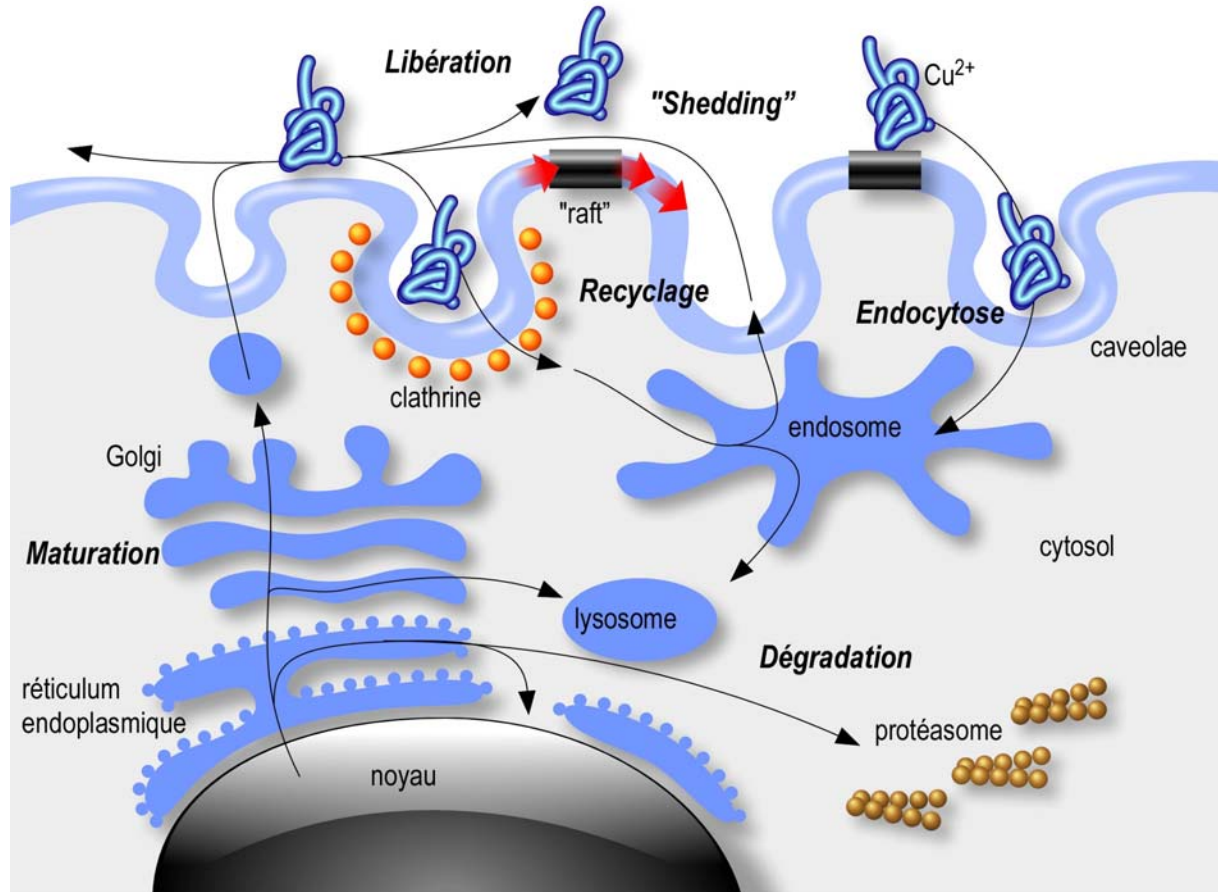


Figure 15 : Illustration du trafic de la PrPc et des différentes voies d'endocytose empruntées

D'une manière générale, les mécanismes d'endocytose des protéines GPI ancrées ne sont pas totalement élucidés (Sharma et al., 2002). Les cavéoles sont des organelles en relation avec les rafts notamment parce qu'elles contiennent des lipides et protéines résistantes aux détergents. Ce sont des invaginations de la membrane plasmique, dépourvues de clathrine et responsables de l'internalisation des protéines ancrées par un GPI (Anderson, 1998). Il a été montré que la PrPc qui fait partie de ces protéines, emprunte une voie d'endocytose utilisant la voie des cavéoles (Peters et al., 2003).

Les puits recouverts de clathrine constituent une voie d'internalisation qui impose une interaction entre les protéines transmembranaires et la clathrine sous-membranaires *via* le complexe adaptateur hétérotétramérique AP-2, moteur de l'invagination. L'internalisation de

certaines protéines à ancre GPI par cette voie a déjà été décrite, mais cela suppose des interactions spécifiques des protéines GPI ancrées avec des protéines transmembranaires servant de relais avec les puits de clathrine. Ainsi, cette voie d'endocytose a été décrite pour la PrPc dans les cellules épithéliales CHO (Shyng et al., 1994) ou les neuroblastomes N2a (Magalhaes et al., 2002). Des travaux basés sur l'observation en microscopie électronique de culture primaire de neurones suggèrent une relocalisation de la PrPc vers les puits recouverts de clathrine lors de l'endocytose (Sunyach et al., 2003).

En marge des mécanismes d'endocytose constitutive, l'exposition à des concentrations de 100 à 500 μM de cuivre provoque une endocytose massive de la PrPc (Pauly and Harris, 1998). Les mécanismes d'internalisation de la PrPc induits par le cuivre pourraient co-exister avec ceux responsables de la voie constitutive. Une étude réalisée sur des neuroblastomes N2a et des cellules microgliales humaines indique que l'endocytose régulée, dépendante du cuivre, emprunte la voie des cavéoles (Marella et al., 2002).

- Modifications post-traductionnelles de la PrPc

A la surface membranaire, la PrPc peut subir divers clivages. Le principal clivage a lieu entre les acides aminés 111 et 112 et conduit à la libération d'un fragment amino-terminal N1 et à la formation d'une PrPc tronquée, la moitié carboxy-terminale C1, qui reste liée à la membrane (Chen et al., 1995; Jimenez-Huete et al., 1998). Le temps de demi-vie du fragment C1 est nettement supérieur à celui de la forme native, probablement en raison de la perte du domaine amino-terminal contenant les sites de liaison au cuivre. Deux métalloprotéases transmembranaires ADAM 10 et ADAM 17 (A Disintegrin And Metalloprotease) seraient impliquées dans ce clivage. ADAM10, dont l'activité est modulée par ADAM 9, est responsable d'un clivage constitutif (Cisse et al., 2005; Vincent et al., 2001). L'activité d'ADAM 17 serait régulée par les récepteurs muscariniques M1 et M3 (Alfa Cisse et al., 2007). Un second clivage peut se produire aux alentours des résidus 90-96, générant ainsi les fragments C2 et N2 (Mange et al., 2004). Ce clivage proche de la région des octapeptides répétés, serait dépendant des espèces réactives à l'oxygène (ROS), du cuivre bivalent et de la calpaïne (Yadavalli et al., 2004). Ces formes tronquées de la PrP ainsi que les fragments N1, N2 sont détectés *in vivo* dans le cerveau, aussi bien chez des sujets sains que chez des sujets atteints d'EST. La proportion des différentes formes de PrP varie selon les régions neuro-anatomiques du cerveau (Beringue et al., 2003). La signification fonctionnelle de ces clivages n'est pas déterminée et le rôle respectif des fragments issus de ces protéolyses n'est pas établi.

La libération d'une forme soluble de la PrPc dans le milieu extracellulaire a été démontrée en premier dans les milieux de culture cellulaire. Ce phénomène est appelé « shedding » en anglais. La libération de la PrPc dans le milieu peut se faire après clivage dans la région du groupement GPI (Harris et al., 1993) ou après la perte de l'ancre GPI (Borchelt et al., 1993). *In vivo*, des formes solubles de la PrPc ont été retrouvées dans le liquide céphalorachidien (Tagliavini et al., 1992), dans le sang (MacGregor et al., 1999), ainsi que dans le sérum humain et murin (Parizek et al., 2001). De plus, la PrPc peut être libérée par les plaquettes activées (Perini et al., 1996). Le pourcentage de molécules de PrPc ainsi clivées a été estimé dans les études *in vitro* par des expériences de chasse et il varie selon le type cellulaire concerné. Dans les neuroblastomes, on observe un taux de 10 à 30%, alors que dans les cultures primaires de splénocytes, ce taux peut atteindre 60 à 70% (Parizek et al., 2001). La présence de sérum dans le milieu semble augmenter le « shedding » ce qui suggère l'implication d'enzymes telles que les phospholipases C ou D. Parallèlement à l'activité phospholipasique, une activité protéasique de type métalloprotéase a également été mise en cause dans ce phénomène de « shedding » (Parkin et al., 2004). Enfin, il a été récemment montré chez l'Homme que la PrPc pouvait être libérée par les plaquettes activées par un mécanisme différent du shedding, à savoir par la sécrétion dans des exosomes (Robertson et al., 2006). Les exosomes, dont le diamètre est compris entre 30 et 100nm, sont des vésicules issues de l'endocytose, enrichies en protéines. Leur fonction n'est pas encore clairement définie, mais leur rôle initial est probablement l'élimination des protéines non dégradées par le lysosome et des protéines endosomales.

2) Protéine homologue à la PrP: Doppel

a) Génétique

La protéine Doppel (i.e. double en allemand) a été identifiée en 1999 par Westaway et ses collaborateurs (Moore et al., 1999). Chez l'Homme, le gène de Doppel (Dpl), *PRND*, se situe 27kb en aval du gène *PRNP*, et chez la souris, *prnd* se situe 16 kb en aval de *prnp*. Ces deux gènes constituent donc une famille de gène nommée *Pm*, mais possèdent chacun leur propre promoteur. Le gène *prnd* est retrouvé chez les bovins, les ovins, les caprins, la souris et chez l'homme (Moore et al., 1999; Peoc'h et al., 2000; Tranulis et al., 2001; Uboldi et al., 2005). Même si les gènes *prnp* et *prnd* ne présentent pas une forte homologie de séquence (24% d'identité sur la séquence protéique), il semblerait que ces 2 gènes soient issus de la duplication d'un gène ancestral commun (Mastrangelo and Westaway, 2001; Mo et al., 2001).

Le gène *prnd* possède 3 exons et la totalité de la phase ouverte de lecture se situe sur le second exon. L'expression du gène *prnd* peut être régulée au niveau transcriptionnel. Des délétions sérielles sur la séquence de *prnd* ont permis de caractériser la région du promoteur (-185/+27) qui contient deux éléments de régulation en *cis*, une boîte CCAAT et une boîte E (Nagyova et al., 2004). Le facteur de transcription USF-1 (upstream stimulatory factor-1) se lierait sur les motifs de boîte E et serait le principal facteur de transcription impliqué dans la régulation du gène *prnd* (Sepelakova et al., 2005).

b) Structure de Doppel

Doppel, comme la PrPc, est une protéine de 179 résidus (chez la souris) ancrée à la membrane par un GPI. D'un point de vue structurel, Dpl s'apparente à une PrPc dépourvue de la région amino-terminale comprenant la séquence des octapeptides répétés. Les études de dichroïsme circulaire révèlent que Dpl possède essentiellement une structure en hélice α (40%) (Lu et al., 2000). Les expériences de digestion trypsique et de spectrométrie de masse indiquent l'existence de deux ponts disulfure : un premier, entre les résidus cystéines 109 et 143, qui est analogue au pont disulfure de la PrPc, et un second, entre les cystéines 95 et 148, qui pourrait intervenir dans la stabilisation conformationnelle de la protéine (Silverman et al., 2000; Whyte et al., 2003) (**Fig.16**). Comme la PrP, Dpl possède également deux sites de glycosylations sur les résidus asparagine 99 et 111. Par ailleurs, il a été suggéré que Dpl possède aussi un site de liaison au cuivre (Qin et al., 2003).

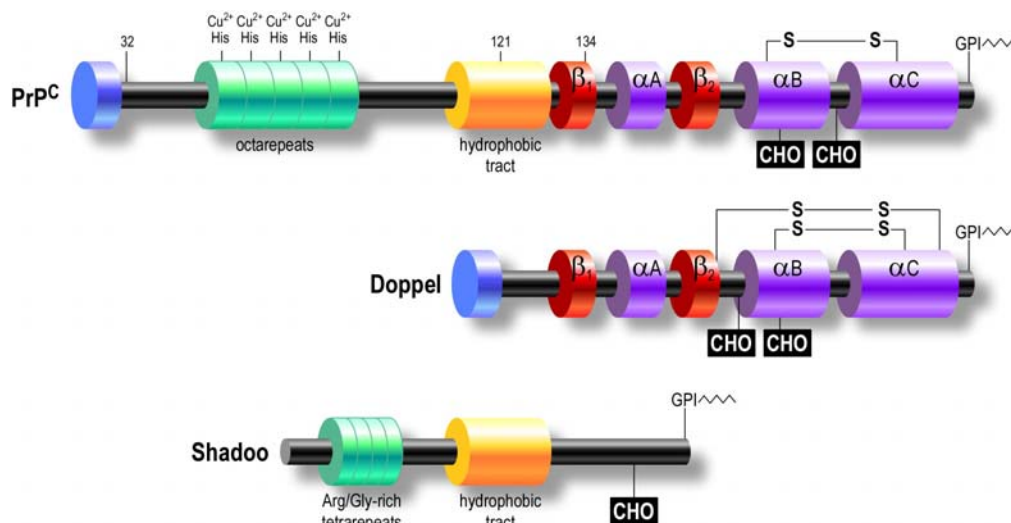


Figure 16 : Représentation de la structure des membres de la famille des protéines prion

Doppel et PrPc présentent toutes deux un domaine C-terminal structuré, constitué de 3 hélices α et de 2 courts feuillets β , et des régions amino-terminales chargées en résidus basiques (en bleu). Les ponts disulfure sont indiqués au dessus (-S-S-) et les sites de N-glycosylation (CHO) au dessous de la représentation des structures protéiques. Des séquences répétées sont présentes dans les protéines PrPc et Shadoo (en vert) : les octapeptides de la PrPc sont capables de lier le cuivre et les tétrapeptides de Shadoo sont riches en résidus arginine et glycine. Le domaine central hydrophobe hautement conservé est représenté sur la PrPc et sur Shadoo.

D'après Watts and Westaway, 2007.,

Les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) indiquent que Dpl présente une structure tridimensionnelle extrêmement similaire avec la partie carboxy-terminale de la PrPc (résidus 121-231) (**Fig.17**). On retrouve une structure caractérisée par 3 hélices α et deux courts feuillettes anti-parallèles (Mo et al., 2001).

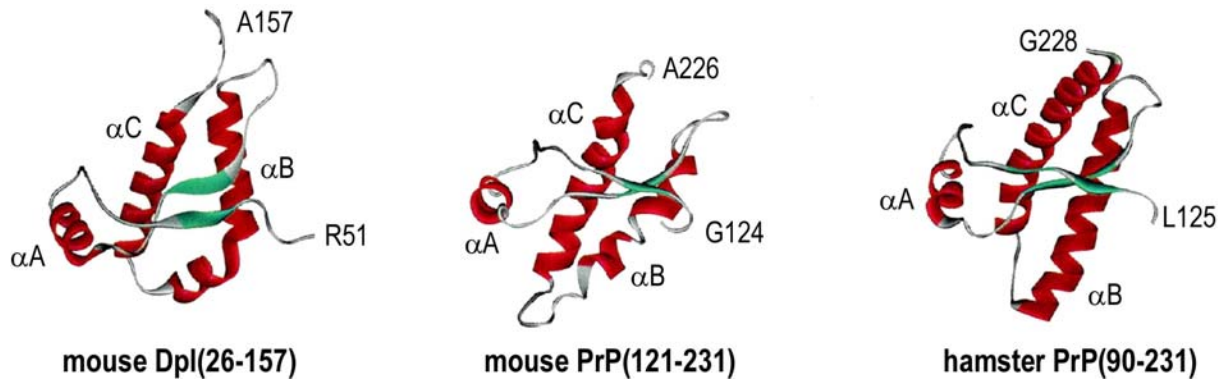


Figure 17: Comparaison des structures tridimensionnelles de la Dpl murine avec les PrP de souris et de hamster D'après Mo et al, 2001.

c) Localisation subcellulaire et tissulaire

La protéine Dpl, comme la PrP, est accrochée à la surface externe de la membrane plasmique par son ancre GPI. Le site d'attachement du groupement GPI se situe sur le résidu G155. Par des expériences de co-transfections de PrP et de Dpl dans les N2a, Massimino et ses collaborateurs démontrent que ces 2 protéines sont co-localisées dans les mêmes régions de la membrane plasmique, à savoir dans les radeaux lipidiques. Ils montrent également que ces 2 protéines suivent les mêmes processus d'internalisation (Massimino et al., 2004). En opposition avec ces résultats, une autre étude démontre que si Dpl est bien localisée au niveau des rafts, elle ne se situe pas dans les mêmes microdomaines membranaires que ceux occupés par la PrPc (Shaked et al., 2002).

Au niveau tissulaire, Dpl est caractérisée par une expression très élevée et quasi-exclusive au niveau des testicules (Makrinou et al., 2002), en particulier dans les spermatozoïdes et les cellules de Sertoli (Peoc'h et al., 2002). De façon remarquable et en opposition avec la PrPc, elle est totalement absente des tissus du système nerveux chez l'adulte, même si des quantités non négligeables de messagers *prnd* sont détectées dans le cerveau au cours de l'embryogénèse (Moore et al., 1999). Afin de définir les fonctions physiologiques potentielles de Dpl, Behrens et ses collaborateurs ont généré un modèle de souris transgéniques invalidées pour le gène *prnd* (*prnd*^{0/0}). Ces souris ne présentent aucune anomalie pendant leur développement embryonnaire et postnatal, cependant les mâles sont stériles (Behrens et al., 2002). Ces derniers présentent des spermatozoïdes en nombre réduit, malformés, immobiles et incapables de fertiliser des ovocytes *in vitro*. Ces observations suggèrent un rôle crucial de Dpl au cours de la spermatogénèse.

Il est important de souligner que Dpl ne participe pas en tant que tel au processus pathologique des EST, du moins en ce qui concerne le SNC. Premièrement, Dpl n'est pas convertie en une isoforme protéase résistante « Dplsc ». Cette hypothèse aurait pu être envisagée dans la mesure où il a été montré qu'une forme tronquée en amino-terminale de la PrPc ($\Delta 32-93$), qui présente une grande homologie structurale avec Dpl, peut être convertie en PrPsc (Flechsig et al., 2000). Deuxièmement, l'absence de Dpl ne prévient pas l'accumulation de PrPsc, ni l'apparition des phénomènes histopathologiques associés. Ceci a pu être observé par des expériences de neurogreffes : des tissus neuronaux issus de la différenciation de cellules ES *prnd*^{0/0} et ensuite greffés chez un hôte *prnp*^{0/0}, sont autant susceptibles à une infection par la Scrapie que les neurogreffes issues de cellules ES WT (wild type) (Behrens et al., 2001). Enfin chez la souris, la surexpression transgénique de Dpl dans le SNC n'a également aucune conséquence sur le temps d'incubation ou l'apparition des symptômes après infection avec une souche de Scrapie murine (Tuzi et al., 2002).

3) Protéine homologue à la PrP : Shadoo

En se basant sur des analyses bioinformatiques, Premzl et ses collaborateurs ont identifié un gène présentant des homologies avec la séquence nucléotidique de *prnp*, qui fut nommé *Sprn* pour « shadow of the prion protein » (Premzl et al., 2003). Ce gène semble hautement conservé puisqu'il est retrouvé dans le génome des poissons, des rongeurs ainsi que des primates. Les études phylogénétiques suggèrent une origine antérieure de *sprn* par rapport à celle de *prnp* et *prnd* (Premzl et al., 2004). *Sprn* ne fait pas parti du complexe génique *prn* (contenant *prnp* et *prnd*) et se situe sur les chromosomes 7 et 10 chez la souris et l'homme, respectivement. Comme *prnp* et *prnd*, la totalité de la phase ouverte de lecture est retrouvée dans un seul exon (**Fig.18**).

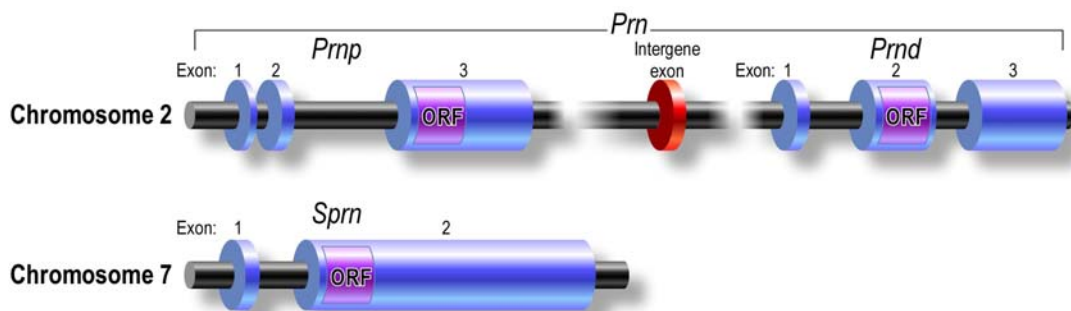


Figure 18 : Représentation schématique de la structure des gènes codant pour les protéines PrP, Dpl et Shadoo chez la souris. Le locus *Prn* situé sur le chromosome 2 contient les gènes *Prnp* et *Prnd* genes encodant pour les protéines PrP et Doppel, respectivement. Le gène *Sprn* encodant la protéine Shadoo est situé sur le chromosome 7. D'après Watts and Westaway, 2007.

La protéine encodée par le gène *spm*, nommée Shadoo (Sho), présente de nombreuses similitudes avec la PrPc et Dpl (**Fig.16**) et elle est considérée par certains auteurs comme le troisième membre de la famille des protéines prion (Watts and Westaway, 2007). Shadoo, est une glycoprotéine de 98 résidus dont les séquences signal en N-terminal et la séquence consensus d'ancrage GPI rappellent celles de PrP et Dpl. La N-glycosylation est également préservée mais sur un seul site uniquement. Même si Shadoo ne possède pas les séquences d'octapeptides répétées de la PrPc, elle possède une série de séquences tétramériques riches en résidus glycine, sérine, alanine et arginine. L'homologie de séquence à proprement parler entre Shadoo et la PrPc est retrouvée dans le segment hydrophobe, suggérant une homologie fonctionnelle. En revanche, en l'absence de résidus cystéine, Shadoo est dépourvue de pont disulfure. Globalement, Shadoo est proche de la partie N-terminale de la PrPc et semble ainsi dépourvue de tout élément associé à l'établissement d'une structure secondaire. Par conséquent, elle est assez différente de Dpl, qui elle ressemble structurellement à la partie C-terminale de la PrPc.

Shadoo est exprimée exclusivement dans le SNC, mais en comparaison avec la PrPc, son expression est plus spécifique de certains types cellulaires. De façon remarquable, elle est notamment exprimée très fortement dans 2 types cellulaires dépourvus de PrPc : les cellules de Purkinje du cervelet et les cellules pyramidales de l'hippocampe au niveau des prolongements dendritiques (Watts et al., 2007). Mais il existe également des régions où les profils d'expression de Sho et PrPc se recoupent comme dans le cortex cérébral, le thalamus, la medulla ou la rétine. Sho pourrait remplir des fonctions « de type PrP » dans des zones naturellement dépourvues de PrPc ou dans le cas des souris délétées du gène *prnp*. Enfin, l'expression de Sho étant restreinte au SNC, elle pourrait également être impliquée dans les processus pathologiques liés aux EST. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une nette diminution de l'expression de Sho chez des souris infectées par une souche de Scrapie murine (Watts et al., 2007).

B/ Physiologie de la PrPc dans le système nerveux central

1) Modèles transgéniques pour l'étude de la fonction de la PrPc

a) Souris invalidées pour le gène *prnp*

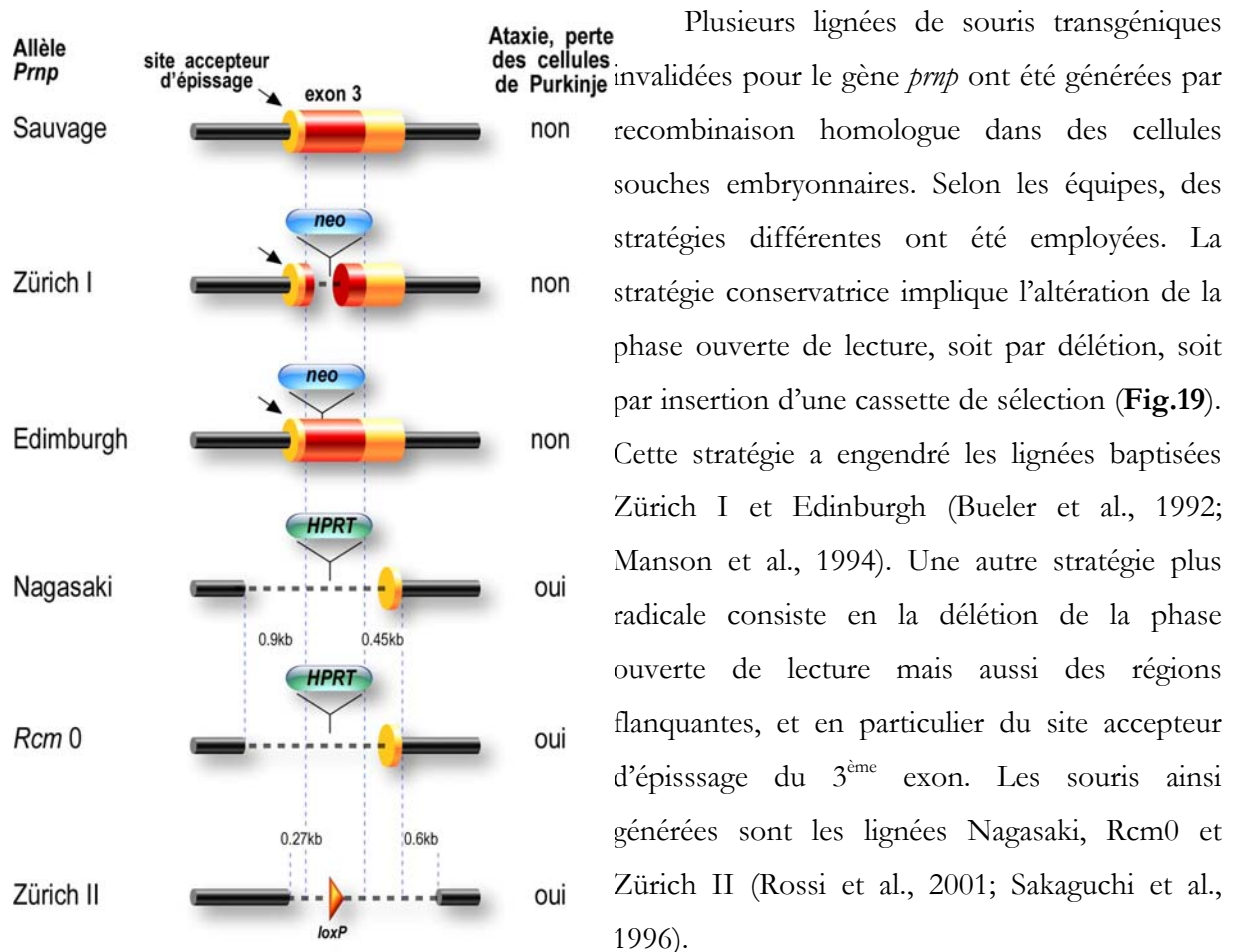


Figure 19 : Les différentes stratégies de construction des souris *prnp*^{0/0}

En rouge est représentée la phase ouverte de lecture, en jaune les régions non codantes de *prnp*, en bleu et vert, les cassettes de sélection insérées et en pointillé les séquences délétées. Neo: néomycine phosphotransférase ; HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase. D'après Rossi et al, 2001.

De façon surprenante, selon la stratégie employée pour la construction des souris *prnp*^{0/0}, les phénotypes observés étaient variables. Tandis que les souris Zürich I ou Edimburgh se développent et se reproduisent normalement (Bueller et al., 1992; Manson et al., 1994), les autres lignées de *prnp*^{0/0} présentent une ataxie sévère et tardive accompagnée d'une dégénérescence des cellules de Purkinje (Moore et al., 1999; Sakaguchi et al., 1996; Silverman et al., 2000). Ce phénotype est aboli par la réintroduction d'une seule copie du gène *prnp* (Nishida et al., 1999). Dans un premier temps, le phénotype observé a été expliqué par l'absence de la PrPc. Cependant, l'absence de syndromes cérébelleux chez les animaux Zürich I et Edimburgh indiquait que ce phénotype était vraisemblablement la conséquence de la délétion des séquences flanquantes de la

phase ouverte de lecture de la PrP (Weissmann, 1996). La découverte du gène *prnd*, situé en aval de la *prnp*, a permis de résoudre ce paradoxe. En effet, le phénotype observé chez les souris Nagasaki, Rcm0 et Zürich II était lié à l'expression ectopique de la protéine Dpl dans le SNC (Moore et al., 1999), le gène *prnd* se retrouvant artéfactuellement sous le contrôle du promoteur du gène *prnp*.

Si l'on considère les souris *prnp*^{0/0} de type Zürich I ou Edinburgh, la génération de ces souris n'a pas réellement permis de mieux cerner les fonctions de la PrPc dans le SNC. Les résultats étaient somme toute assez surprenants compte tenu du degré de conservation de la PrPc et de son expression massive dans les structures cérébrales. L'absence de défauts phénotypiques majeurs de ces souris pourrait s'expliquer par la mise en place de phénomènes compensatoires, comme le remplacement des fonctions de la PrPc par une autre protéine « PrP-like ». Certains dysfonctionnements mineurs ont été néanmoins constatés chez ces souris. Les études comportementales ont révélé une altération du rythme circadien et des troubles du sommeil (Tobler et al., 1997; Tobler et al., 1996). Les études d'électrophysiologie indiquent certaines anomalies dans la fonction synaptique comme l'affaiblissement de l'inhibition rapide induite par les récepteurs GABA A (Collinge et al., 1994) et une altération de la potentialisation à long terme (Manson et al., 1995), ainsi qu'un dysfonctionnement des courants potassiques calcium-dépendants dans certains types cellulaires (Colling et al., 1996; Herms et al., 2001).

En revanche, les souris *prnp*^{0/0} ont permis de faire une découverte capitale dans la compréhension de la physiopathologie des EST. En effet, ces souris sont totalement résistantes à une infection par la Scrapie (Bueler et al., 1993), ce qui démontre l'absolue nécessité de l'expression de la PrPc pour le développement d'une EST.

b) Les mutants de délétion des régions amino-terminale et centrales de la PrPc

Plusieurs mutants de délétions de la PrP, construits sur fond génétique *prnp*^{0/0}, présentent des phénotypes pathologiques. Les souris transgéniques exprimant des formes tronquées dans le domaine amino-terminal, comme les souris Δ 32-121 et Δ 32-134, développent des syndromes ataxiques et présentent une perte neuronale apoptotique dans la couche granulaire du cervelet dès l'âge de 2 mois (Shmerling et al., 1998). Plus récemment, un autre groupe a également détecté chez ces souris une leucoencéphalopathie (Radovanovic et al., 2005). Par opposition, il est important de souligner que jusqu'en position 106, la délétion de la portion amino-terminale de la PrPc n'entraîne pas de conséquence physiopathologique et les souris Δ 32-80, Δ 32-93 et Δ 32-106 se développent normalement. Ces expériences permettent de mettre en évidence les domaines essentiels aux fonctions physiologiques de la PrPc, au moins dans le cervelet. Il apparaît donc que

la région capitale pour la (les) fonction(s) de la PrPc n'est pas tant la partie amino-terminale que le domaine central hydrophobe.

L'effet toxique de la PrP tronquée semble spécifique au cervelet car bien qu'exprimée à des taux similaires dans d'autres régions cérébrales, celles-ci ne sont pas touchées par la mort cellulaire. Étonnamment, le phénotype pathologique est complètement aboli par la réintroduction d'un seul allèle *prnp* sauvage, alors que les quantités de PrP tronquées exprimées restent inchangées. Lorsque la PrP tronquée est exprimée spécifiquement dans les cellules de Purkinje (sur fond génétique *prnp*^{0/0}), les souris développent à nouveau une ataxie, une dégénérescence des cellules de Purkinje, mais la couche granulaire du cervelet est préservée (Flechsig et al., 2003). Globalement, ces phénotypes évoquent ceux observés dans les souris *prnp*^{0/0} de type Nagasaki, chez lesquelles l'expression ectopique de Dpl dans le cerveau provoque une perte des cellules de Purkinje et une dégénérescence de la couche granulaire du cervelet. Là encore, le phénotype était abrogé après réintroduction d'une copie de *prnp* (Nishida et al., 1999; Rossi et al., 2001). Au niveau structural, Dpl est très proche du domaine globulaire de la PrP et s'apparente à une PrP tronquée. Dans ce contexte, le mécanisme pathologique associé aux souris *prnp*^{0/0} de type Nagasaki et aux souris exprimant les formes Δ32-121 ou 134 pourrait être le même (Weissmann and Aguzzi, 1999).

Ces résultats ont permis d'imaginer un modèle théorique dans lequel la PrPc tronquée (ΔPrP) ou Dpl se comporteraient en dominants négatifs et induiraient un signal de mort cellulaire (**Fig.20**). Ce modèle présuppose l'existence d'un ligand commun de la PrPc et de Dpl (L_{PrP}). La liaison de la PrPc à L_{PrP} induirait une signalisation de survie cellulaire (Aguzzi and Polymenidou, 2004). En l'absence de PrPc, Doppel ou ΔPrP se lieraient également à L_{PrP} mais ces deux dernières étant dépourvues du domaine effecteur situées dans la portion centrale de la PrPc, cette liaison aurait pour conséquence soit de bloquer la voie de signalisation soit d'induire une signalisation non appropriée. La PrPc aurait une affinité pour son ligand supérieure à celles de Dpl et ΔPrP, ce qui permet d'expliquer que la présence de PrPc suffit à bloquer l'initiation du phénotype toxique. Une autre supposition de ce modèle est l'existence d'une protéine « PrP-like », nommée π, capable de se lier à L_{PrP} et d'induire une signalisation positive, ce qui expliquerait l'absence de troubles chez les souris n'exprimant pas la PrPc. En terme d'affinité pour L_{PrP}, l'ordre serait donc le suivant : PrPc >> ΔPrP, Dpl ≥ π. Si cette théorie semble satisfaisante, il faudrait pour la confirmer identifier les protéines L_{PrP} et π. Un candidat intéressant pour la protéine π vient d'être mis à jour : il pourrait s'agir du troisième et dernier membre dans la famille des protéines prion, Shadoo. Dans des neurones granulaires du cervelet préparés à partir de souris *prnp*^{0/0}, il a été montré que Shadoo, de la même façon que la PrPc, était capable de

bloquer l'effet neurotoxique induit par l'expression de Dpl (Watts et al., 2007). De plus, après délétion de son domaine hydrophobe, Shadoo perd ses propriétés neuroprotectrices. Quant aux ligands potentiels de la PrPc, de nombreux candidats ont été décrits, mais peu sont des ligands communs à PrP et à Dpl.

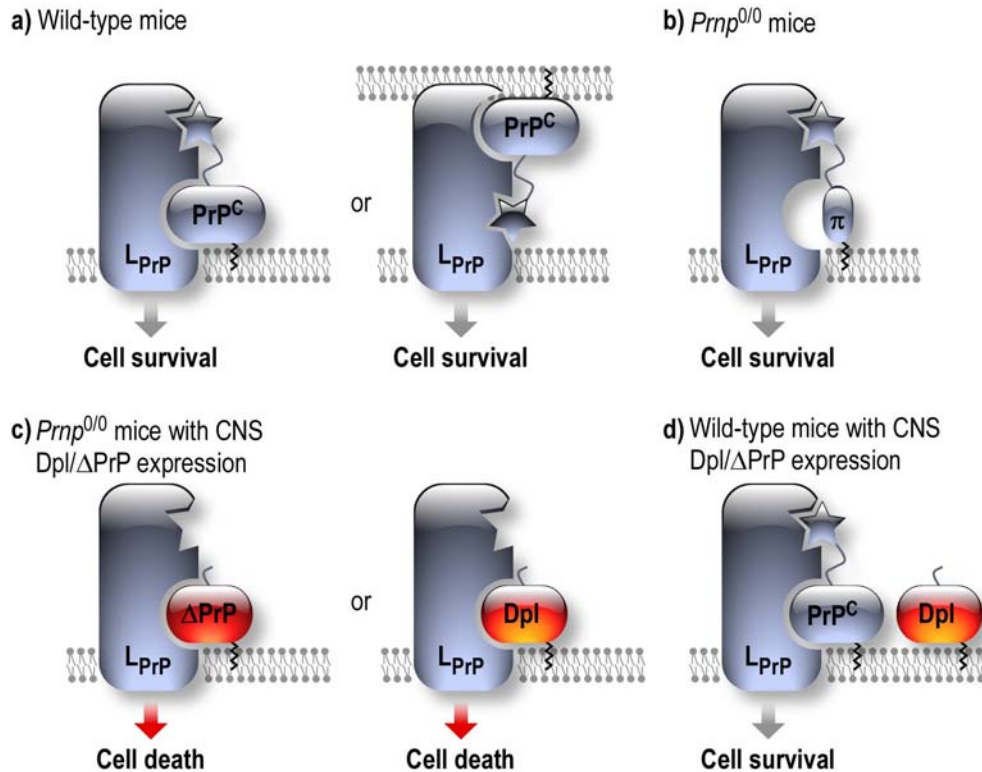


Figure 20 : Modèle théorique de récepteur pour la PrPc (a) Chez la souris sauvage ($prnp^{+/+}$), la PrPc se lie à un ligand hypothétique (L_{PrP}) et initie une signalisation de survie cellulaire. Cette liaison pourrait se présenter à la fois dans les configurations en *cis* et/ou en *trans*. Deux sites de liaison sont impliqués : un site d'ancrage C-terminal et un site effecteur de signalisation N-terminal. (b) Chez les souris $Prnp^{0/0}$, c'est une protéine hypothétique « PrPc-like », π , qui assure la liaison et la signalisation de survie. π et PrPc ont en commun le domaine effecteur en N-terminal et peuvent ainsi induire une signalisation à travers L_{PrP} . (c) La liaison de Doppel ou de ΔPrP à L_{PrP} chez les souris $Prnp^{0/0}$, induit une signalisation « inappropriée » en raison de l'absence du domaine effecteur N-terminal nécessaire à la signalisation de survie. (d) Quand Doppel et ΔPrP sont exprimées chez une souris sauvage, la PrPc prévient la toxicité provoquée par la liaison de Doppel/ ΔPrP à Lprp en raison de l'affinité supérieure de la PrPc pour Lprp. D'après Watts and Westaway, 2007.

Comme nous venons de le voir, les expériences de mutations des domaines aminoterminal et central de la PrPc ont permis de mettre en exergue l'importance du domaine hydrophobe pour la fonctionnalité de la PrPc : seules les mutations touchant au domaine hydrophobe sont porteuses d'effets délétères. D'autres groupes se sont lancés dans la création de mutants de la PrPc délétée exclusivement dans sa région centrale. Ainsi, il a été montré que les souris transgéniques, construites sur fond génétique $prnp^{0/0}$, exprimant une PrP délétée entre les résidus 94 et 134 ($\Delta 94-134$) (Baumann et al., 2007), ou une PrP délétée entre les résidus 105 et 125 ($\Delta 105-125$) (Li et al., 2007), présentent une neurodégénérescence foudroyante qui aboutit à la mort des animaux en l'espace d'une à 2 semaines. Ce phénotype létal peut être inversé par la co-

expression de la forme entière de la PrPc, et ce de façon dose-dépendante. En revanche, les souris Δ 114-121 ne présentent pas d'anomalie particulière (Baumann et al., 2007). Ces résultats permettent de confirmer que le domaine central de la PrPc est le déterminant principal des fonctions neuroprotectrices et/ou neurotoxiques de la PrPc. Si la PrPc possède des propriétés neuroprotectrices à l'état constitutif, la délétion de la région comprise entre les résidus 94 et 125, peut démasquer une activité neurotoxique puissante. Pour être encore plus précis, il semblerait, que la délétion des résidus 94 à 113 et non celles des résidus hydrophobes 114 à 121, soit responsable des effets les plus toxiques. Les résidus chargés (94 à 113) seraient donc indispensables à l'accomplissement des fonctions neuroprotectrices de la PrPc.

2) Partenaires de la PrPc

Lorsque la fonction d'une protéine est inconnue, la génération de modèles transgéniques « knock-out » constitue souvent l'approche la plus immédiate pour essayer d'élucider les fonctions de cette protéine. Cependant cette approche, dans le cas de la PrPc, ne s'est pas avérée être un franc succès. Parallèlement aux modèles transgéniques, la recherche de partenaires constitue une deuxième alternative pour l'étude des fonctions d'une protéine donnée. Cette approche a été tentée par de nombreuses équipes et a permis l'identification de nombreux partenaires de la PrPc. Néanmoins, peu de ces interactions ont pu être confirmées *in vivo*. L'implication physiologique des liaisons de la PrPc avec ces différents partenaires sera discutée dans le paragraphe « Fonctions potentielles de la PrPc dans le SNC ».

a) Partenaires non protéiques

- Le cuivre

La PrPc pourrait être impliquée dans le métabolisme du cuivre car elle possède dans sa région amino-terminale des séquences consensus octapeptidiques répétées, capables de lier les ions cuivre avec une affinité de l'ordre du micromolaire (Hornshaw et al., 1995; Viles et al., 1999). Ces séquences sont relativement sélectives pour le cuivre et peuvent lier de façon pH-dépendante, 4 à 6 atomes de cuivre (Stockel et al., 1998). Toutefois, ces séquences peuvent également fixer d'autres ions bivalents tels que le manganèse et le zinc. Plus récemment, un nouveau site de liaison pour le cuivre a été décrit dans la région centrale de la PrPc (Jones et al., 2004). Cette liaison impliquerait les résidus d'histidine 96 et 111 et posséderait une affinité nanomolaire. La liaison de la PrPc au cuivre entraînerait des changements conformationnels de la région amino-terminale et participerait à la structuration de la protéine (Jones et al., 2004; Leclerc et al., 2006) nécessaire à la formation d'un éventuel site-actif de la PrPc.

- Acides nucléiques

L'interaction de la PrPc avec des acides nucléiques a été en premier lieu étudié *in vitro* par l'étude de l'interaction entre un peptide synthétique de la PrP, correspondant à la région 106-126 (p106-126), et l'ADN (Nandi, 1997). Il a été montré que l'interaction entre des acides nucléiques et la PrP recombinante ou le p106-126 entraînait la polymérisation de ces derniers (Nandi and Leclerc, 1999; Nandi and Sizaret, 2001). Depuis, d'autres études ont montré que la PrP interagit de façon plus ou moins spécifique avec des molécules d'ADN, d'ARN et des oligonucléotides de phosphorothioate (Adler et al., 2003; Kocisko et al., 2006b). De plus, la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) a permis d'isoler des aptamères d'ADN (Takemura et al., 2006) et d'ARN (Mercey et al., 2006; Weiss et al., 1997) se liant spécifiquement à la PrPc. Ces interactions présentent une certaine sélectivité de séquence et de structure. La plupart des études ont déterminé le site de liaison de la PrP aux acides nucléiques dans sa région N-terminale, plus précisément entre les résidus 23 et 52 (Weiss et al., 1997). Ce site de liaison contient des résidus de proline et des résidus basiques disposés de façon alternée. Ce motif est retrouvé dans les sites de liaison d'autres protéines se liant à des acides nucléiques (Rajendran and Nagy, 2003). Les techniques RMN et SAXS (Small Angle X-ray Scattering) ont également confirmé l'implication de la région N-terminale dans les interactions de la PrP avec les acides nucléiques (Lima et al., 2006). Ces interactions, si elles sont confirmées *in vivo*, pourraient avoir des conséquences sur les deux partenaires. Les acides nucléiques rendent la PrPc partiellement résistante à la digestion par la PK et favorisent son oligomérisation ainsi qu'un changement de conformation en feuillet β , voire sa conversion en PrPres (Adler et al., 2003; Cordeiro et al., 2001; Deleault et al., 2003; Nandi and Leclerc, 1999). Réciproquement, la PrP modifie également l'acide nucléique : de manière très similaire à la nucléoprotéine Ncp7 du HIV, elle favorise la dimérisation de l'ARN du HIV *in vitro* et augmente l'efficacité de la reverse transcription (Gabus et al., 2001).

Si la PrPc est exclusivement localisée à la surface externe de la membrane plasmique, les probabilités de rencontre avec des acides nucléiques sont très faibles. Néanmoins, les formes cytosoliques de la PrPc (Mironov et al., 2003), ou les formes trans-membranaires présentant une extrémité N-terminale cytosolique (Stewart and Harris, 2005), pourraient interagir avec des acides nucléiques. Des mutations sur le gène *prnp* pourraient donc modifier la localisation sub-cellulaire ou la topologie de la PrP entraînant la possible rencontre avec des acides nucléiques.

- Les Glycosaminoglycans

Les GlycosAminoGlycans (GAGs) sont les chaînes latérales polysaccharidiques des protéoglycanes (PGs) et incluent l'héparan sulfate, l'héparine, le dermatan sulfate, le keratan sulfate et la chondroïtine sulfate. Les PGs sont des composants de la matrice extracellulaire impliqués dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. De nombreuses études ont mis en évidence des interactions de la PrPc avec des polyanions et des GAG (Brimacombe et al., 1999; Gonzalez-Iglesias et al., 2002; Pan et al., 2002). Cette interaction a été observée avec de la PrP recombinante et également avec la PrPc purifiée à partir du cerveau. La PrP peut se lier *in vitro* à différents GAG comme l'héparine, les chondroïtines sulfates A et B, ou encore à l'acide hyaluronique (Pan et al., 2002). Cette liaison avec les GAG implique principalement le groupe de lysines chargées en N-terminal (résidus 25-35) (Warner et al., 2002) et elle est stabilisée par la liaison au cuivre (Gonzalez-Iglesias et al., 2002). L'interaction de la PrPc avec les GAG stimulerait son internalisation (Shyng et al., 1995). De plus, l'héparan sulfate a également été identifié comme un co-récepteur de la PrPc dans sa liaison avec le récepteur de la laminine. Néanmoins, à l'heure actuelle, la façon dont ces liaisons avec les GAG influence la (les) fonction(s) physiologique(s) de la PrPc demeure inconnue.

b) Partenaires protéiques :

Si les candidats en tant que partenaires protéiques potentiels de la PrPc ne manquent pas, avec plus d'une vingtaine de ligands recensés à ce jour (**Tableau 2**), la signification physiologique de ces interactions est loin d'être prouvée pour tous. En effet, peu de ces interactions ont été démontrées *in vivo*. C'est pourquoi nous n'aborderons ici que les protéines candidates les plus plausibles, (i) identifiées par plusieurs méthodes et plusieurs équipes, (ii) ou dont la corrélation entre l'expression de la PrPc et du partenaire est démontrée, (iii) ou dont la fonctionnalité de l'interaction est prouvée *in vivo*.

Nombre des partenaires putatifs de la PrPc ont été identifiés grâce à la technique du double-hybride. L'inconvénient de cette technique réside dans le fait qu'elle permet également de caractériser des interactions entre des protéines, qui dans leur milieu naturel, ne sont pas retrouvées dans les mêmes compartiments cellulaires. Il convient de rappeler que la PrPc est une protéine majoritairement localisée à la membrane plasmique et que nombre de ligands caractérisés par le système double-hybride sont des protéines exclusivement cytosoliques (Bcl-2, Grb2, $\alpha\beta$ crystalline, caséine kinase 2,...) ou mitochondriales (Hsp60). La pertinence de ces interactions peut donc être sérieusement remise en doute.

Protéines partenaires de la PrP	Localisation subcellulaire	Méthode de découverte	Références
Bcl-2	Cytoplasme	Système double-hybride	(Kurschner and Morgan, 1995)
Grb2	Cytoplasme	Système double-hybride	(Spielhaupter and Schatzl, 2001)
Pint1	inconnue	Système double-hybride	(Spielhaupter and Schatzl, 2001)
Synapsine-1b	Synapse	Système double-hybride	(Spielhaupter and Schatzl, 2001)
Caveoline-1	Membrane plasmique	Co-purification dans les cellules N2a	(Harmey et al., 1995)
Dystroglycan	Membrane plasmique (transmembranaire)	Coimmunoprécipitation	(Keshet et al., 2000)
Synaptophysine	Vésicules synaptiques	Coimmunoprécipitation	(Keshet et al., 2000)
Nitric oxyde synthase neuronale (nNOS)	Protéine des membranes périphériques	Coimmunoprécipitation	(Keshet et al., 2000)
ApoE	Sécrétée	Coimmunoprécipitation/pull down avec des protéines recombinantes	(Gao et al., 2006)
Plasminogène*	Sécrétée	Tests de liaison avec protéines immobilisées du sérum	(Ellis et al., 2002; Fischer et al., 2000)
Hsp60	Mitochondrie	Système double-hybride	(Edenhofer et al., 1996)
NRAGE	Protéine des membranes périphériques et cytoplasmique	Système double-hybride	(Bragason and Palsdottir, 2005)
TREK-1	Membrane plasmique (transmembranaire)	Système double-hybride bactérien	(Azzalin et al., 2006)
Rdj-2	Membrane plasmique (côté cytoplasmique)	Pull-down <i>in vitro</i> avec de protéines de fusion GST	(Beck et al., 2006)
Tubuline	Microtubules	Cross-linking chimique	(Niezanski et al., 2006)
αcrystalline	Cytoplasme	Système double-hybride	(Sun et al., 2005)
ZAP70	Cytoplasme	Coimmunoprécipitation	(Mattei et al., 2004)
Tyrosine kinase Fyn	Membrane plasmique (côté cytoplasmique)	Coimmunoprécipitation	(Mouillet-Richard et al., 2000)
Caséine kinase 2	Cytoplasme	Far western blots	(Meggio et al., 2000)
Nrf2	Cytoplasme/Noyau	Criblage de banque d'ADNc issus de cerveau de souris	(Yehiely et al., 1997)
APLP1	Membrane plasmique	Criblage de banque d'ADNc issus de cerveau de souris	(Yehiely et al., 1997)
<u>Laminine*</u>	Protéine de la matrice extracellulaire	Co-purification avec la recombinante PrP-GST	(Graner et al., 2000)
<u>Récepteur de la laminine 37/67kDa*</u>	Membrane plasmique	Système double-hybride bactérien	(Hundt et al., 2001; Rieger et al., 1997)
<u>STI-1 (Stress inducible protein 1)*</u>	Cytoplasme	Hydropathie complémentaire	(Martins et al., 1997; Zanata et al., 2002)
<u>N-CAM*</u>	Membrane plasmique	Pontage au formaldéhyde	(Schmitt-Ulms et al., 2001)
<u>Vitronectine</u>	Protéine de la matrice extracellulaire	Liaison sur membrane, Co-localisation	(Hajj et al., 2007)

Tableau 2 : Récapitulatif des protéines partenaires identifiées pour la PrPc

* Les protéines soulignées représentent celles dont les interactions avec la PrPc ont été confirmées au moins dans des modèles cellulaires neuronaux ou *in vivo*.

Deux ligands putatifs ont fait l'objet d'une attention particulière : le récepteur de la laminine (37/67 kDa LRP/LR) (Rieger et al., 1997) et la molécule d'adhésion neuronale (N-CAM) (Schmitt-Ulms et al., 2001).

Le récepteur de la laminine de 67 kDa (LR), qui est la forme majoritaire de ce récepteur, est comme la PrPc, exprimée de façon étendue à travers le cerveau par l'ensemble des cellules neuronales (Baloui et al., 2004). A l'opposé, son précurseur de 37 kDa (LRP) est exprimé plus spécifiquement dans une sous-population d'inter-neurones corticaux, particulièrement sensibles à l'accumulation de PrPsc et à la dégénérescence précoce dans les cas de MCJ (Belichenko et al., 1999). Pour être précis, la protéine partenaire identifiée en 1997 par Rieger et ses collaborateurs n'était pas le récepteur de la laminine mais son précurseur. Celui-ci est majoritairement localisé dans le cytoplasme (Romanov et al., 1994) même s'il a également été détecté dans des fractions membranaires (Gauczynski et al., 2001). Quoiqu'il en soit, les protéines LRP/LR peuvent se comporter comme des récepteurs cellulaires de la PrPc et induire l'internalisation de cette dernière (Gauczynski et al., 2001).

L'interaction PrPc/N-CAM a été mise en évidence dans les cellules de neuroblastomes N2a sans surexpression de l'un ou l'autre des partenaires, par un pontage formaldéhyde, une technique permettant de bloquer des complexes protéiques transitoirement associés (Schmitt-Ulms et al., 2001). Il s'agit donc d'interaction *in cis* et la PrPc peut lier les 3 isoformes de N-CAM issues d'épissage alternatif. Cette interaction a été confirmée *in vivo* dans le cerveau de souris en réalisant un pontage au formaldéhyde par perfusion transcardiaque (Schmitt-Ulms et al., 2004). Santuccione et al. ont montré que la PrPc peut recruter N-CAM dans les rafts lipidiques et ce recrutement participe à l'activation de la kinase Fyn (Santuccione et al., 2005). L'activation par la PrPc d'un signal de transduction impliquant la kinase Fyn avait précédemment été décrite (Mouillet-Richard et al., 2000). Les interactions entre PrP et N-CAM ne se limitent pas à des interactions *in cis* mais existent également *in trans* (Santuccione et al., 2005).

Une autre protéine partenaire potentielle est la protéine STI-1 (stress-inducible protein 1). STI-1 a été initialement décrite comme une co-chaperonne retrouvée dans les complexes macromoléculaires des « heat shock proteins » Hsp70 et Hsp90. Bien que STI-1 soit dépourvue d'une séquence signal et qu'elle soit principalement localisée dans le cytoplasme et le noyau, il a été rapporté qu'elle pouvait également être exprimée au niveau de la membrane plasmique et être co-immunoprécipitée avec la PrPc (Zanata et al., 2002).

Enfin, une dernière protéine partenaire intéressante est le plasminogène, un zymogène précurseur d'une sérine protéase présent dans le sérum. Le plasminogène pourrait se lier à la PrPc, (Cuccioloni et al., 2005; Shaked et al., 2002a) probablement par l'intermédiaire de ses domaines « kringle » (Ryou et al., 2003). Cette liaison stimule à la fois l'activation du plasminogène par le tPa (activateur tissulaire du plasminogène) et le clivage de la PrPc (Epple et

al., 2004; Kornblatt et al., 2003). Néanmoins, les études *in vivo* indiquent qu'une déficience en plasminogène n'altère pas le processus endo-protéolytique de la PrPc (Barnewitz et al., 2006).

3) Fonctions potentielles de la PrPc dans le système nerveux central

a) PrPc, stress oxydant et cuivre

Un ensemble de résultats suggère que la PrPc pourrait jouer un rôle dans la protection neuronale contre le stress oxydatif, notamment en intervenant dans le métabolisme du cuivre (pour revue (Milhavet and Lehmann, 2002)). Un des effets décrits de la liaison du cuivre à la PrPc est la stimulation de l'endocytose de cette dernière. Ceci suggère que la PrPc pourrait se comporter comme un récepteur cuprique et jouer un rôle dans la régulation des concentrations intra- et extra- cellulaire en cuivre (Pauly and Harris, 1998). *In vitro*, Rachidi et al. ont montré une parfaite corrélation entre la fixation du cuivre et le niveau d'expression de la PrPc (Rachidi et al., 2003). L'expression de la PrPc augmente spécifiquement la résistance des cellules face à la toxicité du cuivre et face à un stress oxydant, comme l'exposition au monoxyde d'azote (NO). Les cellules de phéochromocytome du rat (PC12) qui sont caractérisées par une grande résistance à la toxicité du cuivre et au stress oxydant, expriment des quantités importantes de PrPc (Brown et al., 1997).

Par ailleurs, les cultures primaires de cellules granulaires du cervelet et de neurones corticaux issus de souris *prnp^{0/0}* sont plus susceptibles que des cultures issues de souris sauvages, au stress oxydant (Brown et al., 2002; Brown et al., 1997c) et beaucoup moins résistantes face à la toxicité du cuivre (Brown et al., 1998). La résistance améliorée des cellules sauvages serait liée à la capacité de la PrPc à lier les atomes de cuivre. La chélation du cuivre est très importante au niveau des synapses lors de la transmission de l'influx nerveux où la concentration en cuivre peut atteindre 250 μ M (Kardos et al., 1989). Il est à noter que la PrPc est fortement exprimée précisément au niveau des synapses (Sales et al., 1998).

In vivo, il a été montré que les souris *prnp^{0/0}* présentaient une concentration en cuivre diminuée au niveau cérébral (~20% de la concentration retrouvée chez les souris sauvages) (Brown et al., 1997a). Les tissus cérébraux de souris *prnp^{0/0}* présentent également des changements indicatifs d'un stress oxydatif, tels que la présence de protéines carbonylées et de produits de peroxydation lipidique en fortes concentrations (Wong et al., 2001a). De plus, les lésions cérébrales provoquées par hypoxie ou ischémie sont plus importantes chez les souris *prnp^{0/0}* comparativement aux souris *prnp^{+/+}* (McLennan et al., 2004; Sakurai-Yamashita et al., 2005; Spudich et al., 2005). Dans la mesure où l'ischémie et l'hypoxie causent probablement la mort

neuronale par un stress oxydatif accru, ces observations rattachent également la PrPc à la protection contre le stress oxydatif.

L'augmentation de l'expression de la PrP a également été corrélée avec l'augmentation de l'activité superoxyde dismutase (SOD) Cu/Zn, sans qu'il y ait une modification du taux d'expression de cette enzyme (Brown and Besinger, 1998). Un des mécanismes d'action proposé est que la PrPc serait responsable de la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce à une activité SOD intrinsèque dépendante de sa liaison au cuivre (Brown et al., 2001; Brown et al., 1999a). Ce résultat a été reproduit par la même équipe avec la protéine native immunoprécipitée à partir des cerveaux des souris. L'activité « SOD-like » de la PrPc est abolie suite à la délétion des octapeptides.

Cependant, la signification physiologique de ces résultats peut être remise en question pour plusieurs raisons. Premièrement, l'activité SOD décrite pour la PrPc a été observée en présence de concentrations supra-physiologiques en cuivre. Deuxièmement, même des molécules organiques de petite taille comme des acides aminés peuvent présenter une faible activité dismutase. Enfin, le cuivre se lie à la PrPc avec une affinité nettement inférieure en comparaison avec sa liaison avec les cuproenzymes connues telle que la Cu-Zn SOD (Rae et al., 1999). Par ailleurs, dans une récente étude, Jones et al. qui ont tenté de reproduire les résultats de Brown et al., ont été incapables de détecter une activité SOD significative, même en présence d'excès de cuivre (Jones et al., 2005). Une seconde hypothèse serait que la PrPc agisse de façon indirecte en stimulant l'activité ou l'expression d'autres protéines, comme la Cu-Zn SOD responsable de la détoxification des ROS. Il a en effet été décrit que l'activité Cu-Zn SOD dans le cerveau des souris *prnp*^{0/0} représente seulement 10 à 50%, de celle mesurée chez les souris sauvages (Brown et al., 1997c; Klamt et al., 2001). Néanmoins, là encore, les résultats s'avèrent variables et non reproductibles (Hutter et al., 2003; Waggoner et al., 2000). Enfin, il est également possible que la PrPc agisse sur les conséquences du stress oxydatif. Dans certains cas, le stress oxydatif peut activer les voies apoptotiques (Halliwell, 2006) et les effets anti-apoptotiques de la PrPc pourraient être responsables de l'effet protecteur de la PrPc contre le stress oxydatif.

b) Neuroprotection et signalisation de survie

A l'heure actuelle, un ensemble de résultats convergent vers l'hypothèse d'une activité neuro-protectrice de la PrPc, en particulier contre les stress internes et environnementaux aboutissant à la mise en place d'un programme apoptotique (pour revue (Roucou et al., 2004). Cette activité a pu être démontrée dans des modèles *in vitro* ainsi qu'en *in vivo*.

In vitro, un des exemples les plus parlants est la capacité de la PrPc à protéger les neurones fœtaux humains contre l'apoptose dépendante de Bax, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Bounhar et al., 2001). Lorsque ces neurones sont micro-injectés avec un plasmide encodant pour Bax, 90% de ces neurones entrent en apoptose. Lorsque des plasmides encodant pour Bax et la PrPc sont co-injectés, le pourcentage de neurones en apoptose est réduit à 10%. Cet effet anti-apoptotique apparaît spécifique de Bax puisque la PrPc ne protège pas contre l'apoptose induite par Bak, t-Bid, la staurosporine ou la thapsigargine (Roucou et al., 2005). De plus, dans des cultures primaires de neurones hippocampiques, l'expression de la PrPc protège de l'apoptose induite par la privation de sérum (Kuwahara et al., 1999). La privation de sérum conduit à une diminution d'expression du cytochrome c mitochondrial dans les cultures issues de souris *prnp*^{0/0} et pas dans les cultures de souris sauvages. Ces résultats indiquent que la PrPc exerce un effet protecteur en bloquant la voie apoptotique mitochondriale. Dans les neurones granulaires du cervelet et les neuroblastomes N2a, la PrPc protège de l'apoptose induite par l'expression de Dpl dans ces cellules (Driscaldi et al., 2004; Qin et al., 2006). Dans les cellules N2a, il a été suggéré que cet effet neuroprotecteur pourrait impliquer une interaction physique entre PrPc et Dpl à la membrane cellulaire. Cet effet anti-apoptotique a également été décrit dans des cellules non-neuronales, comme les cellules MCF-7, dérivées d'adénocarcinome humain. Cette lignée entre en apoptose en réponse à un traitement par le TNF- α . Récemment, un clone MCF-7 résistant à l'apoptose induite par TNF- α a été isolé et de façon intéressante ces cellules présentent une forte augmentation d'expression de la PrPc (~10 fois). De plus, la surexpression de PrPc dans les autres lignées de MCF-7, suffit à rendre les cellules résistantes à la mort cellulaire induite par le TNF- α (Diarra-Mehrpour et al., 2004).

In vivo, plusieurs modèles de souris transgéniques ont contribué à démontrer l'activité neuroprotectrice de la PrPc. La réintroduction d'un seul allèle *prnp* est suffisante pour abroger le phénotype de neurodégénérescence observé chez les souris exprimant les PrP Δ 32-121, Δ 32-134 délétées de leur région amino-terminale et les PrP Δ 105-125, Δ 94-134 délétées dans leur domaine central. Le fait que la PrPc supprime ces phénotypes suggère qu'il existe un mécanisme commun dans l'effet protecteur de la PrPc exercé contre chacune de ces protéines toxiques³.

Comme d'autres protéines ancrées par un GPI, la PrPc réside dans les rafts lipidiques, qui représentent une plateforme moléculaire particulièrement impliquée dans la transduction du signal dans les cellules neuronales (Tsui-Pierchala et al., 2002). La PrPc étant une protéine entièrement extracellulaire, elle doit nécessairement interagir avec des protéines transmembranaires afin de pouvoir transmettre des signaux intra-cytoplasmiques. Un des

³ Cf. Modèle théorique de récepteur de la PrPc, p.36

principaux challenges dans ce domaine réside dans l'identification des composants moléculaires intermédiaires dans la signalisation induite par la PrPc. Un grand nombre d'études suggèrent que la PrPc est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la survie neuronale.

Une des stratégies employées afin d'observer une signalisation impliquant la PrPc, a été l'utilisation d'anticorps anti-PrP permettant le « cross-linking » (ou pontage chimique) de la protéine à la surface cellulaire. Dans ce type d'expérience, les anticorps sont censés reproduire l'action de ligands naturels et l'activation des protéines GPI ancrées à l'aide d'anticorps est couramment utilisée dans l'activation des cascades de signalisation dans les lymphocytes. Dans la lignée neuroectodermale 1C11, le cross-linking de la PrPc induit l'activation de la protéine kinase p59Fyn *via* le recrutement de la cavéoline (Mouillet-Richard et al., 2000) et plus en aval la stimulation de la NADPH oxydase et de la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases (ERK1/2) (Schneider et al., 2003). Dans ces cellules, le cross-linking de la PrPc provoque également une altération des activités de certains récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines G (Mouillet-Richard et al., 2005). Les voies de signalisation engagées suite au cross-linking de la PrPc par des anticorps spécifiques dans les cellules 1C11 seraient impliquées dans la survie cellulaire. La PrPc jouerait un rôle dans l'homéostasie des réactions d'oxydo-réductions des neurones sérotoninergiques (Mouillet-Richard et al., 2007).

Un autre exemple de signalisation cellulaire de survie où la PrPc est impliquée, a été caractérisé par l'étude de l'interaction de la PrPc avec STI-1. Cette interaction à la surface cellulaire serait responsable de l'effet protecteur de la PrPc contre la mort cellulaire induite par l'anisomycine dans les explants rétiniens (Lopes et al., 2005; Zanata et al., 2002). Cet effet serait dépendant de l'activation de la voie AMPc/protéine kinase A (Chiarini et al., 2002).

Deux études suggèrent l'implication des voies de signalisation PI3 kinase/Akt dans les effets neuroprotecteurs de la PrPc. La première étude porte sur l'ischémie focale cérébrale, dans laquelle les volumes d'infarcts constatés chez les souris *prnp*^{+/+} et *prnp*^{0/0} ont été comparés (Weise et al., 2006). Les souris *prnp*^{0/0} présentent des infarcts beaucoup plus importants et une diminution du taux d'Akt phosphorylé, ce qui suggère un rôle protecteur de la PrPc dans les dommages cérébraux de type ischémique et la stimulation de la voie de signalisation de survie dépendante d'Akt par la PrPc. Dans une autre étude, il a été rapporté que l'activité d'Akt était diminuée dans les neurones et les tissus cérébraux provenant de souris *prnp*^{0/0} en comparaison avec une souris sauvage. En outre, l'inhibition pharmacologique d'Akt altère les capacités de la PrPc dans la protection contre le stress oxydatif (Vassallo et al., 2005).

c) PrPc et phénomènes pro-apoptotiques

A ce jour, la PrPc normale, dans sa forme entière et exprimée à la membrane, n'a jamais été démontrée comme étant une protéine toxique suite à sa surexpression dans des cellules transfectées. Ainsi, la PrPc n'est pas toxique en soi mais il a été montré dans quelques études que la surexpression de la PrPc pouvait sensibiliser certaines cellules à des stimuli apoptotiques. Ainsi, les lignées cellulaires HEK293, Rov9 et TSM1 seraient plus sensibles à la staurosporine après surexpression de la PrPc (Paitel et al., 2002; Paitel et al., 2003). Les auteurs observent également une certaine résistance à l'apoptose induite par la staurosporine dans des cellules dépourvues de PrPc (Paitel et al., 2004). Ces résultats sont en contradiction avec les résultats précédemment énoncés indiquant une meilleure résistance des cellules en présence de PrP à des stress apoptotiques tels que la privation de sérum ou un stress oxydatif (Brown et al., 2002; Brown et al., 1997c). Il existe plusieurs explications possibles à cette contradiction. Premièrement, la surproduction de la PrP pourrait interférer avec la production de protéines endogènes essentielles en saturant la machinerie de synthèse cellulaire. Deuxièmement, la surexpression de la PrPc peut conduire à la formation de formes toxiques de la PrP comme la forme transmembranaire C-term (Hegde et al., 1998) ou la forme cytosolique (Ma et al., 2002). L'expression de ces formes alternatives de la PrPc pourrait être spécifique de certains types cellulaires et donc expliquer la susceptibilité de certaines lignées en cas de surexpression de la PrP. En effet, la forme cytosolique a été décrite toxique dans les N2a, et non toxique dans les HEK 293 ou les COS (Roucou et al., 2003). Troisièmement, l'effet de la PrPc elle-même peut dépendre du type cellulaire et de la présence ou pas de partenaires protéiques.

Il a été récemment démontré *in vivo*, que la dimérisation de la PrPc à la surface cellulaire pouvait conduire à la transduction d'un signal toxique. L'injection stéréotaxique d'anticorps monoclonaux spécifiques de la PrP dans l'hippocampe de souris sauvages, mais pas chez la souris *prnp^{0/0}*, provoque une perte neuronale massive dans l'hippocampe et le cervelet (Solfrosi et al., 2004). Les auteurs en concluent que le « cross-linking » de la PrP à la surface cellulaire provoque la transduction d'un signal apoptotique dans les neurones. Dans cette étude, le cross-linking de la PrP n'est pas clairement démontrée, et il n'est pas exclu que le traitement par les anticorps induise l'apoptose neuronale en inactivant la fonction neuroprotectrice de la PrPc, par exemple en empêchant son interaction avec un récepteur. De plus, la liaison de la PrPc à des anticorps pourrait interférer avec son trafic, empêchant son endocytose et son recyclage. Ceci pourrait conduire à une accumulation anormale de la PrPc à la membrane et causer un phénotype toxique indépendant de sa fonction normale. Une autre alternative intéressante serait que la signalisation induite par la PrPc soit dépendante de la forme sous laquelle elle se présente à la membrane

conduisant à une signalisation de survie à l'état monomérique et une signalisation de mort à l'état dimérique ou multimérique.

d) Rôle de la PrPc dans la synapse

Plusieurs observations suggèrent que la PrPc joue un rôle dans la structure, la fonction ou le maintien des synapses. Cette hypothèse est en accord avec le fait qu'une pathologie synaptique est souvent l'apanage des EST (Jeffrey et al., 2000a). Les études de microscopie électronique et les marquages immunocytochimiques, ainsi que la localisation de la protéine de fusion PrP-EGFP indiquent que la PrPc est préférentiellement concentrée le long des axones et dans les terminaisons pré-synaptiques (Barmada et al., 2004; Laine et al., 2001; Moya et al., 2000; Sales et al., 2002). De plus, la PrPc est soumise à un transport axonal antérograde et rétrograde (Borchelt et al., 1994; Moya et al., 2004). L'incubation de neurones d'hippocampe en culture primaire avec de la PrP recombinante induit la formation rapide d'axones et de dendrites, et une augmentation des contacts synaptiques (Kanaani et al., 2005). La PrPc pourrait ainsi jouer un rôle dans la formation des synapses. Les enregistrements électrophysiologiques effectués sur des coupes de cerveaux de souris *prnp*^{0/0} appuient également l'hypothèse d'un rôle de la PrPc dans la transmission synaptique. Au niveau de l'hippocampe, en absence de PrPc, la potentialisation à long terme (LTP) est altérée et l'inhibition rapide impliquant les récepteurs GABA A est diminuée (Collinge et al., 1994; Manson et al., 1995). Ces résultats sont cependant très controversés (Lledo et al., 1996). Des études ont démontré une corrélation entre le taux de PrPc exprimée et l'intensité de la transmission glutamatergique dans l'hippocampe (Carleton et al., 2001).

Les souris *prnp*^{0/0} présentent une post-hyperpolarisation réduite dans les neurones CA1 de l'hippocampe (Colling et al., 1996) et des courants potassiques dépendants du calcium d'intensité réduite dans les cellules de Purkinje (Herms et al., 2001). Les élégants travaux de Mallucci et al. ont permis de montrer que les neurones pyramidaux des souris *prnp*^{0/0} présentent un défaut de post-hyperpolarisation du potentiel d'action, que la délétion de la PrPc soit initiée en pré ou post-natale (Mallucci et al., 2002). D'autres anomalies neurobiologiques en rapport avec la fonction synaptique ont été détectées chez les souris *prnp*^{0/0}, notamment une modification dans l'organisation des fibres nerveuses (Colling et al., 1997), des troubles du rythme circadien (Tobler et al., 1996), et des déficiences dans les processus de l'apprentissage spatial (Criado et al., 2005). L'interaction de la PrPc avec la protéine STI-1 pourrait être impliquée dans les phénomènes d'apprentissage, en particulier dans la consolidation de la mémoire à court et long terme (Coitinho et al., 2007).

e) Adhésion, croissance neuronale et neurogenèse

La PrPc favorise la croissance neuritique au cours de son interaction avec des protéines d'adhésion neuronale ou des protéines de la matrice extra-cellulaire. La PrPc facilite notamment la croissance axonale *via* des interactions en *cis* et *trans* avec N-CAM. Cet effet passe par un recrutement de N-CAM dans les rafts lipidiques et l'activation de la Fyn kinase (Santuccione et al., 2005). Par ailleurs, les cultures primaires de neurones incubées avec de la PrP recombinante présentent aussi une croissance neuritique et une signalisation de survie. Cet effet s'accompagne de l'activation de nombreuses kinases, comprenant Fyn, PKC, PKA, PI-3 kinase/Akt, et ERK (Chen et al., 2003a; Kanaani et al., 2005). De plus, la PrPc en se liant à la laminine stimule la neuritogenèse par un mécanisme dépendant de la voie des MAP kinases (Chen et al., 2003a; Graner et al., 2000). La laminine est une molécule d'adhésion majeure et son interaction avec la PrPc peut favoriser l'adhésion neuronale et indirectement la survie. Une étude récente démontre que la PrPc peut interagir avec une autre protéine de la matrice extra-cellulaire, la vitronectine, et que cette interaction favorise la croissance axonale (Hajj et al., 2007). Dans une autre étude, il a également été démontré que l'incubation de STI-1 recombinante sur des neurones d'hippocampe en culture primaire, stimule la croissance neuritique de façon dépendante de la PrP par activation de la voie des MAP kinases (Lopes et al., 2005).

Enfin, la PrPc pourrait également être impliquée dans la neurogenèse au cours du développement mais aussi chez l'adulte. Par comparaison entre des souris adultes sauvages, *prnp*^{0/0}, ou surexprimant la PrPc (lignée Tga20), il a été montré que la PrPc influence positivement et de façon dose-dépendante la prolifération et la différenciation des précurseurs neuronaux (Steele et al., 2006).

En définitive, face à la multitude de ligands et de fonctions proposées pour la PrPc, il peut paraître difficile de se faire une idée précise de ses fonctions physiologiques. Mais, la PrPc étant exprimée dans un grand nombre de neurones, il est tout à fait envisageable qu'elle puisse exercer des fonctions différentes selon l'aire cérébrale considérée. Sa liaison avec les GAGs, N-CAM, les protéines de la matrice extra-cellulaire ou avec le récepteur de la laminine semble physiologiquement importante puisque que ces molécules, comme la PrPc, sont largement exprimées et remplissent diverses fonctions. Dans le cas des neurones, de telles interactions pourraient moduler l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites, la formation des synapses ainsi que la survie cellulaire. La restructuration des cellules et des composants tissulaires est un autre élément commun des processus physiologiques dont la PrPc semble relever. Pendant le développement, l'apprentissage, la différenciation cellulaire et les réponses aux stress, certaines

structures sont nouvellement mises en place tandis que d'autres sont éliminées. L'association de la PrPc aux rafts lipidiques, aux molécules d'adhésion et à de multiples voies de signalisation est en accord avec l'hypothèse de sa participation aux processus de pousse neuritique, de formation et de maintien des synapses (Fig.21).

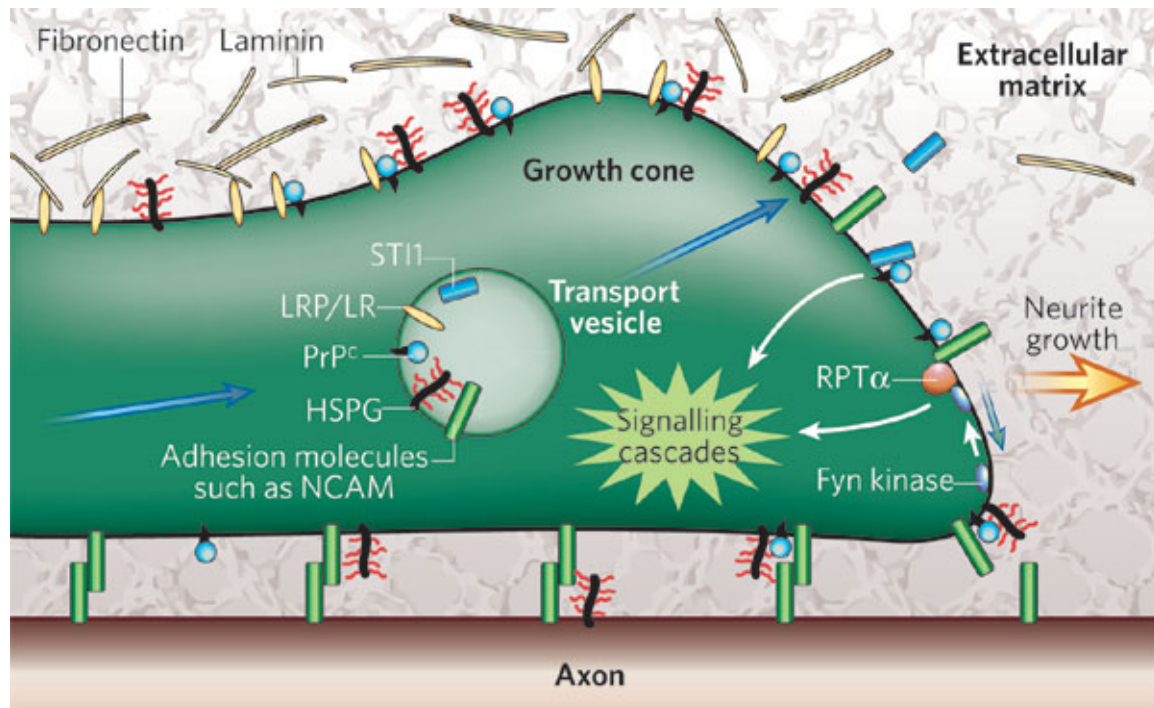


Figure 21: Modèle des interactions potentielles liées à la croissance axonale

La PrPc semble jouer un rôle important dans la formation des synapses et la pousse neuritique. La croissance neuritique pourrait être modulée par les interactions de la PrPc avec les protéines N-CAM et STI-1 par l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Dans le cas de NCAM, cette voie de signalisation passe par l'activation de Fyn kinase. La PrPc se lie aux HSPG, à la laminine et au récepteur de la laminine LRP/LR. De nombreuses molécules d'adhésion et de la matrice extracellulaire participe dans la guidance axonale. Ces molécules sont probablement transportés vers les cônes de croissance dans des vésicules. Ces molécules, dont N-CAM, participent à l'établissement des contacts entre les neurones, les autres cellules et la matrice extracellulaire. *D'après Caughey and Baron, 2006.*

C/Physiologie de la PrPc dans le système immunitaire

Après les tissus du système nerveux, les tissus lymphoïdes sont ceux où l'expression de la PrPc est la plus abondante. La relation entre les prions et le système immunitaire est une relation complexe. Dans les EST, aucune réaction inflammatoire n'est clairement observée en raison de la tolérance du système immunitaire à la PrPsc, puisqu'il s'agit de la conformation anormale d'une protéine cellulaire de l'hôte. Néanmoins, lors d'une infection par voie périphérique – qui constitue la majorité des cas non expérimentaux – le système immunitaire contribue à la pathogenèse des EST en répliquant la PrPsc dans les compartiments lymphoïdes, et facilite ainsi indirectement une neuroinvasion efficace (Aguzzi, 2003). Ce phénomène est partiellement dépendant de l'expression de la PrPc dans les cellules immunitaires (Brown et al., 1999). Comme l'évènement majeur des EST est le changement conformationnel de la PrPc en PrPsc, viser la PrPc constitue une stratégie thérapeutique attractive. Cependant, comme les fonctions constitutives de la PrPc dans le système lymphoïde demeurent obscures, il n'est pas évident de prédire comment les thérapies visant la PrPc pourraient affecter le système immunitaire. Il est donc important d'essayer de déterminer quelles pourraient être les fonctions remplies par la PrPc dans le système immunitaire. La découverte du rôle de la PrPc dans le système immunitaire pourrait amener non seulement à une meilleure compréhension de la pathogenèse périphérique des EST mais aussi de la fonction immune en général.

1) Expression de la PrPc dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes

a) Expression de la PrPc au cours de l'ontogénèse

Chez la souris, la PrPc est exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques et elle pourrait définir une sous-population particulière de ces cellules possédant des capacités de renouvellement à long-terme (Zhang et al., 2006). Chez l'Homme, il a également été montré que les cellules souches hématopoïétiques CD34+ expriment la PrPc (Dodelet and Cashman, 1998).

Au cours de leur différenciation, il semblerait que les lymphocytes et les monocytes maintiennent l'expression de la PrPc mais celle-ci est réprimée après la différenciation de la lignée des granulocytes (Dodelet and Cashman, 1998). De la même façon, le précurseur murin des granulocytes (CD 43+ Gr-1+) exprime la PrPc, ce qui n'est plus le cas dans les neutrophiles matures (Liu et al., 2001). En revanche, la maturation des cellules dendritiques conduit à une augmentation de l'expression de la PrPc (Burthem et al., 2001; Durig et al., 2000).

Les études chez la souris indiquent une tendance à la baisse dans l'expression de la PrPc au cours de la maturation des cellules B et T, et l'expression dans les lymphocytes T quiescents est très faible (Kubosaki et al., 2001; Liu et al., 2001). Cependant chez l'homme et le mouton

l'expression de la PrPc demeure importante dans les lymphocytes matures (Durig et al., 2000). En effet, les lymphocytes circulant dans le cordon ombilical présentent des taux de PrPc plus faibles que les lymphocytes de l'adulte (Li et al., 2001), avec des taux croissants avec l'âge (Politopoulou et al., 2000). Il existe donc une différence significative dans l'expression de la PrPc, au moins en ce qui concerne les lymphocytes T, entre l'Homme et la souris.

b) Expression de la PrPc dans les cellules immunes matures

La PrPc a été détectée dans les lymphocytes B et T, les natural killers (NK), les plaquettes, les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules folliculaires dendritiques (Dodelet and Cashman, 1998; Durig et al., 2000; Kubosaki et al., 2001; Li et al., 2001; Thielen et al., 2001). Elle est donc exprimée par un grand nombre de types cellulaires appartenant au système immunitaire. A partir de l'ensemble de ces données, il est cependant difficile de dresser un profil d'expression comparatif en termes de quantité exprimée dans chaque type cellulaire. En effet, les anticorps et les méthodes de détection utilisées diffèrent largement selon les études.

Chez l'Homme, parmi les cellules T, les cellules CD8⁺ expriment un peu plus abondamment la PrPc que les CD4⁺ (Durig et al., 2000; Politopoulou et al., 2000). De façon intéressante, l'expression de la PrPc est également plus importante dans les cellules mémoire CD45RO⁺ en comparaison avec les lymphocytes T CD45RA⁺ naïfs (Li et al., 2001). Les profils d'expression génique sur puces à ADN ont révélé que le gène *prnp* murin était positivement régulé chez certains types de lymphocytes T régulateurs (Huehn et al., 2004), par un mécanisme Stat-6 dépendant (Chen et al., 2003b) et dans les cellules T mémoires CD8⁺ (Goldrath et al., 2004).

c) Expression de la PrPc au cours de l'activation lymphocytaire

Chez la souris, la PrPc est sur-exprimée dans les cellules T dans les heures suivant une activation mitogénique par la concanavoline (ConA), la phytohématoglutinine (PHA), ou des anticorps anti-CD3 (Cashman et al., 1990; Kubosaki et al., 2003; Li et al., 2001; Mabbott et al., 1997). En revanche, un traitement au phorbol myristate acétate (PMA)/ionomycine n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de la PrPc dans les cellules T périphériques humaines (Antoine et al., 2000). Les résultats obtenus chez la souris suggèrent que les changements transcriptionnels de la PrPc nécessitent l'implication d'éléments de signalisation du récepteur des cellules T (TCR). A l'opposé des cellules T, dans les cellules B il a été décrit que le traitement au lipopolysaccharide (LPS) n'entraîne pas d'augmentation d'expression de la PrPc (Kubosaki et al., 2003). A l'heure actuelle, les voies de signalisation intracellulaires reliant l'activation des cellules T et l'augmentation de la quantité de messagers *prnp* ne sont toujours pas caractérisées. En règle

générale, la régulation de l'expression de *prnp* est peu connue. Il s'agit là d'un des rares exemples de variation de l'expression de la PrPc, considérée jusqu'alors comme un « housekeeping gene » dont l'expression est constitutive et stable.

2) Expression de Doppel dans le système immunitaire

Récemment, l'expression de Dpl a été décrite dans les cellules du système immunitaire. Néanmoins, à l'heure actuelle, il n'existe que très peu d'études à ce sujet. De plus, ces études ont été réalisées sur des tissus lymphoïdes ou du sang d'origine bovine et restent donc difficilement transposables à l'Homme ou la souris. Paltrinieri et ses collaborateurs ont montré que Dpl est principalement exprimée dans les cellules B, les cellules dendritiques, et les granulocytes bovins et concluent que dans l'ensemble la distribution de la PrP et de Dpl dans les tissus lymphoïdes sont assez similaires (Paltrinieri et al., 2004). Plus récemment, les mêmes auteurs ont suivi l'évolution des taux d'expression de PrP et de Dpl dans les lymphocytes après incubation avec diverses cytokines ou des anticorps anti-PrP. Après 18 heures d'incubation, le traitement avec l'IL-2 et l'IFN- γ induit dans les lymphocytes une surexpression de Dpl. Le traitement avec des anticorps anti-PrP entraîne également une augmentation de l'expression de Dpl. Ces effets observés après 18 heures d'activation pourraient être liés à une augmentation de la synthèse protéique. Les variations d'expression constatées après utilisation de différents activateurs dépendent vraisemblablement de récepteurs ou de voies de signalisation différentes. Ces résultats démontrent qu'il est possible de moduler l'expression de Dpl *in vitro*, par incubation avec des cytokines ou des anticorps anti-PrP.

3) Fonctions potentielles de la PrPc dans le système immunitaire

a) Rôle de la PrPc dans la maturation des lymphocytes T

La possible influence de la PrPc sur le développement des cellules T a été étudiée par l'utilisation deux types de souris transgéniques surexprimant la PrPc (TgA20 et Tg33) (Jouvin-Marche et al., 2006). Dans ces modèles, la surexpression de PrPc induit des changements importants dans différentes étapes de la maturation des cellules T. Premièrement, les thymus de ces souris sont nettement atrophiés par rapport à ceux d'une souris sauvage. Sur les souris TgA20, à l'échelon cellulaire, il a été constaté une nette diminution des cellules T $\alpha\beta$ et de façon concomitante, une augmentation du nombre de cellules T $\gamma\delta$. De façon intéressante, en cas de régime supplémenté en cuivre, les souris TgA20 présentent une restauration partielle du développement de cellules T $\alpha\beta$, suggérant que la surexpression de la PrPc, par une chélation trop

importante du cuivre, génère un contexte anti-oxydant important pour la différenciation des cellules T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$.

b) Trafic et maturation de la PrPc dans les lymphocytes

Dans les cellules T humaines, la PrPc est présente dans les radeaux lipidiques où elle est co-localisée ou co-immunoprecipitée avec les gangliosides GM3, GM1 (Hugel et al., 2004; Mattei et al., 2002), avec les protéines fyn, Reggie-1, et la tyrosine kinase lymphocyte-spécifique P56lck (Mattei et al., 2004; Stuermer et al., 2004). Après activation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, la PrPc est co-immunoprecipitée avec la chaîne zêta de la protéine Zap70 (Mattei et al., 2004). Dans la lignée de lymphocytes T Jurkat, la PrPc est concentrée au niveau des « caps » dont la formation est induite par un choc hypothermique (Wurm et al., 2004). Cependant, bien que la PrPc s'accumule au niveau des sites de contact entre les cellules T et les cellules dendritiques (DC) lors d'une stimulation peptidique *via* le complexe majeur d'histocompatibilité dans un modèle de culture primaire, elle n'est co-localisée ni avec CD3, ni avec l'antigène de fonction leucocytaire LFA- 1, ni avec CD43 ou LAT (linker for activation of T cells) ni avec Thy1 (Ballerini et al., 2006). Ainsi, suite à l'activation dans les lymphocytes T, la PrPc semble subir un effet de regroupement au niveau des radeaux lipidiques, en parallèle avec d'autres acteurs majeurs de l'activation tel que CD3, mais sa localisation précise n'est toujours pas clairement établi.

L'incubation des cellules T avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la PrP pendant 10 minutes provoque l'internalisation d'une grande proportion de la PrPc dans des endosomes Limp-2 positifs (Stuermer et al., 2004). Cependant, il n'est pas clairement établi si la PrPc subit une endocytose constitutive dans les lymphocytes et si tel est le cas, les mécanismes empruntés ne sont pas connus.

Par ailleurs, dans les lymphocytes, la PrPc peut être libérée dans le milieu extracellulaire par le mécanisme du « shedding ». Il a également été montré que des molécules de PrPc pouvaient être transférées d'une cellule à une autre dans différents modèles cellulaires. Dans le cas des lymphocytes, ceci nécessite une activation préalable par la ConA ou le PMA (Liu et al., 2002). La PrPc pourrait être constitutivement libérée par les lymphocytes (Parizek et al., 2001) sous diverses formes. Des microparticules immunoréactives pour la PrP sont libérées à partir de lymphocytes T apoptotiques (Gidon-Jeangirard et al., 1999). Il a également été décrit que les plaquettes activées libèrent des exosomes et des microvésicules contenant de la PrPc (Perini et al., 1996; Robertson et al., 2006). Ces phénomènes pourraient expliquer la présence de quantités importantes de PrPc soluble dans le plasma (MacGregor et al., 1999; Volkel et al., 2001). Cependant, les rôles biologiques de la PrPc sécrétée par les lymphocytes demeurent inconnus. De

façon intéressante, l'internalisation de la protéine recombinante dimérique, PrP-Fc, incubée sur des monocytes entraîne une activation des protéines ERK1/2 et d'Akt par phosphorylation des tyrosines kinases Syk et Pyk2 (Krebs et al., 2006).

c) Apport des expériences de cross-linking et des souris transgéniques *prnp*^{0/0}

Le cross-linking de la PrPc à la surface des lymphocytes avec des anticorps anti-PrP induit le regroupement des molécules de PrP dans des « caps » contenant Thy1, Reggie-1, Reggie-2, CD3, l'actine F, Fyn, Lck, LAT et GM1, et une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une phosphorylation plus importante des kinases de la famille des Src et de ERK1/2 (Hugel et al., 2004; Schneider et al., 2003; Stuermer et al., 2004). Le cross-linking de la PrPc, dans la lignée de cellules T humaines CEM, module l'entrée de calcium induite par les ionophores et le relargage intracellulaire du calcium (Hugel et al., 2004). Dans les cellules Jurkat le cross-linking de la PrPc induit des flux calciques, bien que modérés par rapport à ceux obtenus après cross-linking par un anticorps anti-CD3 (Stuermer et al., 2004).

Ces effets semblent généralement aller dans le sens d'une activation cellulaire, pourtant les anticorps anti-PrP peuvent également bloquer l'activation des cellules T humaines induites par la ConA (Cashman et al., 1990) ou des anticorps anti-CD3 (Li et al., 2001). Le mécanisme de ces effets bloquants reste inconnu. La PrPc est présente à côté de la synapse immunitaire et après cross-linking, elle est plus fortement localisée dans les radeaux lipidiques à proximité du TCR (Stuermer et al., 2004). Elle est également co-localisée avec le MHC de classe II dans les cellules dendritiques (Burthem et al., 2001). Ainsi, les effets bloquants des anticorps anti-PrP pourraient passer par l'intermédiaire soit des lymphocytes T soit des cellules présentatrices d'antigène (APC). En effet, il a été montré que l'anti-PrP SAF 83 empêchait la prolifération des lymphocytes aussi bien lorsque l'expression de la PrP est limitée aux DCs qu'aux lymphocytes T (Ballerini et al., 2006). Ainsi, les effets des anticorps anti-PrP sur l'activation des lymphocytes T pourraient ne pas être simplement dus à une interférence mécanique, mais pourraient provoquer une déstabilisation de la synapse immunitaire ou une altération des voies de signalisation.

La relation entre ces résultats et la fonction de la PrPc reste floue. Toutes ces expériences impliquent le cross-linking de la PrPc de la surface cellulaire et que le(s) ligand(s) potentiel(s) de la PrP soient multimériques.

Il a été rapporté que les souris *prnp*^{0/0} ont une expression normale des molécules MHC de classe I et II, une maturation correcte des DC, et un nombre satisfaisant de cellules souches hématopoïétiques et de lymphocytes T et B (Ballerini et al., 2006; Bueler et al., 1992; Kubosaki et

al., 2001; Zhang et al., 2006). Ces observations indiquent que ces souris ne sont pas immunodéficientes. De plus, les souris *prnp*^{0/0} ne présentent pas une susceptibilité particulière aux infections, ni au développement de tumeurs. Par ailleurs, ces souris se sont avérées être un outil utile pour la production d'anticorps monoclonal dirigé contre la PrP par immunisation avec la PrPsc ou la PrP recombinante (Prusiner et al., 1993; Williamson et al., 1996), indiquant l'existence d'une réponse humorale fonctionnelle.

Le fait que la PrPc soit nécessaire à une activation optimale dans les cellules T *in vitro* n'est pas clairement établi. Dans l'étude initiale réalisée sur une souris KO de type Zürich I, les réponses immunologiques après activation à la Con A étaient normales (Bueler et al., 1992), tandis qu'un article récent montre une prolifération réduite chez ces souris (Mazzoni et al., 2005). Les splénocytes issus de souris *prnp*^{0/0} de type Edimbourg présentent une réponse en dessous de la normale après activation par la ConA (Mabbott et al., 1997). Ces observations sont controversées par Liu et ses collègues qui ont rapporté des réponses normales après activation par la ConA et par des anticorps anti-CD3 dans les cellules T issues de cette même lignée (Liu et al., 2001). Afin d'essayer de résoudre ces paradoxes, Ballerini et ses collègues ont étudié des réactions croisées dans lesquelles la PrP a été sélectivement supprimée dans les cellules T ou dans les DCs (Ballerini et al., 2006). Les cellules T PrP^{-/-} ont répondu normalement aux DCs issus de PrP^{+/+}, tandis que les DCs PrP^{-/-} étaient moins efficaces que les DCs PrP^{+/+} dans la stimulation des cellules T PrP^{+/+}. Ces expériences soulignent l'importance de la PrPc dans l'établissement de la synapse immunitaire entre les cellules T et les DC et suggèrent une fonction différente de la PrPc dans ces deux types cellulaires.

L'absence de PrP peut affecter d'autres fonctions immunitaires. Au cours d'une péritonite expérimentale, l'infiltration leucocytaire chez des souris *prnp*^{0/0} présente un nombre accru de monocytes et beaucoup moins de neutrophiles que l'infiltrat des animaux sauvages (de Almeida et al., 2005). La PrPc pourrait être ainsi impliquée dans la régulation de l'activité de phagocytose. Ce pourrait être également le cas au cours de l'infection des macrophages par la bactérie *Brucella abortus* lors de l'invasion des macrophages (Watarai et al., 2003) : l'interaction entre la protéine Hsp60 bactérienne et la PrPc située à la surface cellulaire des macrophages faciliterait l'internalisation de la bactérie. Néanmoins, ces résultats sont sujets à controverse (Fontes et al., 2005).

L'anomalie la plus saisissante détectée jusqu'ici par l'utilisation des souris *prnp*^{0/0} est peut-être l'altération des capacités d'auto-renouvellement dans les cellules souches hématopoïétiques PrP^{-/-}, bien que cette altération ne soit constatée qu'après une série de transplantations chez des receveurs PrP^{+/+} irradiés de façon létale (Zhang et al., 2006). La PrPc pourrait être nécessaire à la

croissance cellulaire en condition extrême. Cette hypothèse est soutenue par les données provenant des puces d'expression génique qui montrent que l'expression de la PrPc est augmentée dans les cellules CD8+ entrant en prolifération homéostatique après transfert dans des souris immunodéficientes (Goldrath et al., 2004). Le programme moléculaire de repopulation lymphocytaire est remarquablement semblable à celui de la différenciation mémoire, dans lequel l'augmentation de l'expression de la PrPc à la surface a été également observée (Goldrath et al., 2004; Li et al., 2001). De plus, les cellules T issues de souris transgéniques pour le TCR (Marilyn) présentent un nombre réduit de mitoses après transfert dans des souris *prnp*^{0/0} stimulées par voie peptidique (Ballerini et al., 2006). Ainsi, le rôle de la PrPc dans l'expansion et la différenciation des cellules T peut dépendre de la cellule elle-même ou des populations cellulaires de soutien issues d'autres lignées.

En fin de compte, les anomalies rapportées sur les souris *prnp*^{0/0} sont assez subtiles sur le plan immunitaire. Notons que le KO post-natal de la PrPc dans les cellules lymphoïdes n'a jamais été réalisé. C'est pourquoi il n'est pas exclu qu'un mécanisme compensatoire, se mette en place dans les lymphocytes et les cellules myéloïdes des souris *prnp*^{0/0}, prenant ainsi le relais des fonctions de la PrPc. Enfin, il est important de tenir compte du fait que la délétion embryonnaire du gène *prnp* et le pontage de la PrPc par les anticorps ne reflètent pas nécessairement des processus similaires. De nombreuses études indiquent que les protéines GPI-ancrées, comme la PrPc, ont des fonctions de signalisation dans les lymphocytes, principalement par association avec les tyrosines kinases de la famille Src (Ilangumaran et al., 2000). L'absence de PrPc, en elle-même, peut changer la composition des radeaux lipidiques mais il est peu probable que cette délétion ait un effet sur la signalisation induite par les autres composants des radeaux lipidiques. Le traitement par des anticorps anti-PrP est susceptible d'induire des effets additionnels, telle que la rupture des interactions protéiques dans les radeaux lipidiques, ou la mise en place d'une signalisation non appropriée et excessive par l'intermédiaire de la PrP.

4) Expression des protéines PrP et Dpl et de leurs récepteurs dans les splénocytes murins (Article 1)

En définitive, les données de la littérature passées en revue ci-dessus montrent que la PrPc joue vraisemblablement un rôle important au sein du système immunitaire. Les arguments principaux en faveur de cette hypothèse sont une expression étendue de la PrPc dans une grande variété de types cellulaires (cellules souches hématopoïétiques, cellule folliculaire dendritique, lymphocytes B, DC, monocytes, ...) et l'existence d'une régulation transcriptionnelle de la PrPc dans les lymphocytes T murins activés. Aucune modulation de l'expression du gène *prnp* n'avait été montrée jusqu'alors et il s'agit là de la première démonstration de la modulation de l'expression de la PrPc. Parmi les fonctions potentielles suggérées, les trois plus intéressantes sont une implication dans la maturation des cellules souches et des lymphocytes T, la stabilisation physique de la synapse immunitaire lors de l'interaction T-DC et la participation active de la PrPc aux phénomènes de phagocytose. Néanmoins, certaines de ces fonctions suggérées sont encore soumises à controverse et nécessitent confirmation.

Concernant la protéine homologue Dpl, les données sont encore plus fragmentaires et l'identification même de son expression par les cellules du système immunitaire est assez récente (Paltrinieri et al., 2004; Paltrinieri et al., 2006). Les auteurs ont néanmoins démontré que le profil d'expression de Dpl est assez proche de celui de PrP. Dans ce contexte, dans le but d'améliorer notre compréhension des fonctions physiologiques de PrPc et de Dpl dans le système immunitaire, nous avons tenté de caractériser les sites de liaisons potentiels de ces deux protéines. Pour cela, nous avons tout d'abord construits et purifiés des recombinants solubles de ces deux protéines, biotinylées sur l'extrémité carboxy-terminale. Tirant parti de l'extrême affinité de la liaison biotine/streptavidine, nous avons ensuite produit des tétramères fluorescents de PrP et de Dpl. Ces tétramères ont été utilisés comme traceurs afin de caractériser des sites de liaisons spécifiques pour ces deux protéines dans des splénocytes murins par cytométrie de flux.

Parallèlement, nous avons également décidé de (re)définir l'expression des protéines PrP et Dpl à la surface des différentes populations de splénocytes à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques. Cette première étape nous a permis de confirmer plusieurs résultats de la littérature. Nous avons en effet montré l'expression de la PrPc à la surface des lymphocytes B, les DC et les monocytes. La PrP n'est présente ni à la surface des lymphocytes T ni à la surface des NK. Nous avons également montré que les granulocytes expriment des quantités importantes de PrPc, ce qui est en désaccord avec les études précédentes (Liu et al., 2001). Cette différence peut provenir de l'utilisation de souris de fond génétique différent ou de l'affinité variable des anticorps anti-PrP utilisés. La nouveauté principale réside dans la définition du profil d'expression de Dpl dans

les splénocytes, qui à notre connaissance n'avait jamais été abordé chez la souris. Le profil d'expression de Dpl est quasiment superposable à celui de la PrP, exception faite des lymphocytes B où l'expression de Dpl semble plus importante que celle de la PrP.

Grâce à l'utilisation des tétramères PrP et DpL, nous avons montré que ses deux protéines possèdent des sites de liaison sur tous les types cellulaires de la population splénique, à l'exception notable des lymphocytes T et des NK. Parmi les cellules exprimant les plus importantes quantités de sites de liaison, on retrouve les lymphocytes B et les macrophages. Les cellules dendritiques et les granulocytes expriment des quantités de ligands moindres. Grâce à des marquages sur coupes de rates, nous avons montré l'absence de site de liaison des tétramères sur les FDC. Ces cellules expriment des quantités très importantes de PrPc et sont considérées comme le lieu principal d'amplification de la PrPc au sein du système lymphoïde. La présence de récepteurs potentiels de la PrPc à la surface de ces cellules aurait également pu avoir des conséquences sur la pathogenèse des EST.

Comme c'était le cas pour le profil d'expression de ces deux protéines, le profil des sites de liaison est également en tout point comparable. Ce résultat qui peut paraître surprenant au départ, n'est pas si inattendu. Ces deux protéines, malgré une homologie de séquence stricte limitée (25%), présente une très grande homologie de conformation tridimensionnelle. Il n'est donc pas impossible que ces deux protéines accomplissent des fonctions redondantes. Le deuxième élément qui peut être source de réflexion est la présence de sites de liaison sur autant de types cellulaires différents. Mais, il est tout à fait possible que des protéines qui sont exprimées de façon aussi étendue possèdent aussi des ligands largement exprimés. C'est notamment le cas des récepteurs des molécules d'adhésion. Nous avons donc vérifié qu'aucun des partenaires précédemment décrits pour la PrPc (tels que le récepteur de la laminine, la protéine STI-1, la PrP endogène ou les héparans sulfates) n'étaient impliqués dans les liaisons décrites dans cette étude.

Des études précédentes ont décrit une augmentation de l'expression de la PrPc dans les lymphocytes T activés (Cashman et al., 1990). Nous avons donc étudié l'évolution des profils d'expression de PrP et de Dpl ainsi que de leurs sites de liaison dans des lymphocytes T et B activés. Comme précédemment décrit, 48 heures d'incubation en présence de concanavaline A, provoque l'augmentation de l'expression de PrP et Dpl dans l'ensemble des cellules T. En revanche, il n'y a aucune variation d'expression des sites de liaison sur les cellules T activées. Les cellules T activées interagissent avec les cellules présentatrices d'antigène comme les macrophages, les DC ou les lymphocytes B, qui présentent des niveaux d'expression de PrP ou de Dpl très élevés même à l'état quiescent. Nous avons donc fait la démonstration de la modulation de l'expression de PrP et de Dpl dans les cellules B activées. En effet, au bout de 48

heures d'incubation avec du LPS, l'expression de ces deux protéines est encore plus importante qu'à l'état quiescent. En ce qui concerne, le site de liaison sur les cellules B activées, seul le site de liaison pour Dpl est augmenté. L'expression du site de liaison de la PrP n'augmente pas après activation. Néanmoins, il s'agit là de la seule différence constatée dans les profils des sites de liaison de la PrP et de Dpl. Cette expérience suggère une implication plus spécifique de Dpl et de son ligand dans les cellules B en cas d'activation.

Enfin, afin de démontrer la fonctionnalité des interactions établies par nos tétramères, nous avons choisi de travailler avec un système homogène : la lignée de lymphocytes B, A20. Dans cette lignée nous avons montré que la liaison des tétramères avec leurs ligands provoque une activation de la voie des MAP kinases ainsi qu'une élévation de la concentration calcique intracellulaire. L'activation de la voie des MAP kinases est plus transitoire dans le cas du tétramère Dpl par rapport au tétramère PrP, suggérant des différences fonctionnelles entre PrP et Dpl dans les lymphocytes B. Les observations de microscopie confocale indiquent la présence de sites communs pour les deux tétramères mais également de sites spécifiques pour les deux tétramères.

L'utilisation de tétramères est courante en immunologie pour détecter et/ou activer un récepteur de basse affinité ou qui nécessite d'être lié à son ligand sous forme multimérique. Nous avons choisi cette approche afin d'optimiser nos chances de détection des sites de liaison. L'affinité des tétramères pour les sites de liaison situés sur les cellules A20 se situe autour de 28nM. Nous nous sommes alors posé la question de savoir si la tétramérisation de la PrP et de Dpl était réellement nécessaire à l'établissement de la liaison. Au vu des résultats d'expériences de compétitions et de déplacements, il semblerait que si la tétramérisation n'est pas requise, elle améliore tout de même la liaison. Des concentrations équivalentes de PrP non marquée sous forme monomérique et sous forme tétramérique, déplacent de façon similaire la liaison du tétramère PrP fluorescent. Ceci suggère que les 4 molécules de PrP formant le tétramère sont impliquées dans la liaison mais que la liaison ne nécessite pas la multimérisation de la PrP.

En résumé, ce travail a permis de mieux définir l'expression des protéines PrP et Dpl au sein des différentes populations spléniques mais surtout de mettre en évidence l'existence de nombreux sites de liaison en *trans* dans les splénocytes. Les profils d'expression et de sites de liaison de ces deux protéines qui sont très similaires suggèrent la possibilité de sites de liaison communs et de fonctions redondantes. Toutefois, l'augmentation spécifique des sites de liaison de Dpl dans les lymphocytes B activés ainsi que la variabilité de la cinétique d'activation de la voie des MAPkinases suite à la liaison des tétramères PrP et Dpl sur les cellules A20, suggèrent une fonction spécifique à Dpl dans les lymphocytes B. La variation d'expression de la PrPc n'avait été

à ce jour observée que dans les lymphocytes T activés, et nous montrons ici que c'est aussi le cas des lymphocytes B. Ces travaux contribuent à ouvrir de nouvelles perspectives sur les fonctions physiologiques potentielles de la protéine prion ainsi que de son homologue Dpl dans le système immunitaire.

ARTICLE 1

“EXPRESSION PROFILES OF PRION AND DOPPEL PROTEINS AND OF THEIR RECEPTORS IN MOUSE SPLENOCYTES”

Sevda Cordier-Dirikoc, Nicole Zsürger, Julie Cazareth, Baptiste Ménard and Joëlle Chabry

Soumis à *European Journal of Immunology*

Statut : en révision

**EXPRESSION PROFILES OF PRION AND DOPPEL PROTEINS AND
OF THEIR RECEPTORS IN MOUSE SPLENOCYTES**

Sevda Cordier-Dirikoc, Nicole Zsürger, Julie Cazareth,

Baptiste Ménard and Joëlle Chabry

“Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire”, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6097. 660, route des lucioles, 06560 Valbonne, France.

KEY WORDS: Prion, doppel, binding sites, spleen, intracellular signaling

CORRESPONDING AUTHOR: Joëlle Chabry “Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire”, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6097. 660, route des lucioles 06560 Valbonne, France, Tel. +334 93 95 77 67; Fax. +334 93 95 77 08; E-mail. chabry@ipmc.cnrs.fr

ABBREVIATIONS: PrP, prion protein; PrPres, protease resistant isoform of PrP; Dpl, doppel; TSEs, Transmissible Spongiform Encephalopathies; BAP, biotinylated acceptor peptide; MAP, mitogen activated protein; MBP, maltose binding protein; FDC, follicular dendritic cells; DC, dendritic cells; STI-1, stress inducible protein-1; LR, laminin receptor; N-CAM, neural cell adhesion molecule; APC, allophycocyanin.

SUMMARY

Doppel (Dpl) shares common structural features with the prion protein (PrP) whose pathologic isoform is considered as the causative agent of prion diseases. Although their physiological functions in the immune system remain largely unknown, we demonstrated that substantial amounts of PrP and Dpl are expressed onto spleen cells notably B-lymphocytes, granulocytes and DC, but not T-lymphocytes and NK. In order to characterize trans-interacting partners of PrP and Dpl on mouse splenocytes, fluorescent PrP and Dpl tetramers were produced and used as tracers. Both tetramers specifically bind to B-lymphocytes, DC, macrophages and granulocytes and in a lesser extend to T-lymphocytes. No binding was observed on NK, FDC and mesenchymal spleen cells. The activation of intracellular transduction signals (i.e intracellular calcium concentration and activation of the MAP kinase pathway) suggested that PrP and Dpl tetramers bind to functional receptors on B-cells. None of the previously described PrP partners account for the binding sites characterized here. Our study suggests a possible role for PrP and Dpl in the cell-cell interactions in the immune system.

1. INTRODUCTION

Owing to its crucial role in the development of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), the biology of the mammalian prion protein (PrP) has been extensively studied. *Prn* gene family in mammals consists in two members ~ 20 kb apart: *Prnp* and *Prnd* encoding for Prion (PrP) and Doppel (Dpl) proteins respectively [1]. Key events in the development of TSEs pathogenesis are the conversion of PrP into an aggregated and protease resistant isoform (PrPres) and its accumulation within the central nervous system of affected humans and animals [2]. PrP and Dpl share common structural features since they are both N-linked to the cell membrane by a GPI anchor. Despite only 25% sequence identity, Dpl tri-dimensional structure is very similar to the C-term two-thirds of PrP [3]. Nevertheless, some structural differences are noticeable. Typical PrP sequences include a long and flexible N-terminal tail, a highly conserved palindrome sequence AGAAAAGA and an octapeptide repeat region which binds copper ions. Despite numerous transgenic mouse models and extensive investigations, the physiological functions of PrP and Dpl remain largely unclear. PrP is highly expressed in neuronal cells where it is thought to participate in copper uptake, cell signaling, survival adhesion, and differentiation mechanisms [4]. In PrP-expressing peripheral organs such as spleen, testis, heart and muscle, physiological functions of PrP remain obscure. However, lymphoreticular system plays a crucial role in the TSE pathogenesis, since, following both central and peripheral infections, prion replication begins in the spleen and splenectomy leads to a delay in the onset of prion diseases [5].

Normally expressed in spermatozoa and Sertoli cells [6], Dpl plays an important role in spermatogenesis since male $Dpl^{0/0}$ mice are sterile [7]. The different tissue

distribution and membrane microenvironment of PrP and Dpl [8] suggest that both proteins fulfill distinct physiological functions. However, owing to their structural similarity and their common expression in certain tissues such as spleen, functional redundancy between both proteins cannot be ruled out. PrP and Dpl are both expressed in B-cells and DC within the lymphoid follicles [9]. Expression of PrP is enhanced at the cell surface of human lymphocyte in the course of immune cell activation [10] and is required for the self-renewal of hematopoietic stem cells [11]. As other GPI-linked lymphoid proteins, PrP may act either as a cell-cell adhesion molecule, as a membrane receptor-transducer or as an activation-released soluble factor that may modulate activation of other lymphoid subsets.

On the other hand, the role of Dpl in spleen and immune cells maturation and/or activation, its relationships with PrP and its involvement in TSEs pathogenesis remain totally unknown.

It has been postulated that PrP and Dpl might activate and/or compete for common, hitherto undiscovered, partners expressed on target cells [12]. The identification of partners, receptors or binding sites for both proteins would be of considerable interest in the understanding of their physiological functions in the immune system. The tetramer technology is one of the most popular approaches in immunology to label cell receptor having a low affinity for their cognate peptide/MHC ligand [13]. To get insights into PrP and Dpl binding sites expressed at the surface of the splenic cells, we used similar biochemical methodologies and flow cytometry analysis. Tetrameric fluorescent tracers turned out to be powerful tools to characterize splenocyte populations expressing PrP and Dpl binding sites and to study the associated transduction signals.

2. RESULTS

2.1. Purification and characterization of PrP- and Dpl-BAP proteins- A peptide tag (BAP) was added at the C-terminal end of the GPI *minus* PrP and Dpl (i.e. soluble) proteins, introducing a unique site of enzymatic biotinylation (Fig.1A). Biotinylated PrP- and Dpl-BAP were further purified by affinity chromatography (Fig.1B and C). Proteins from the different steps of the purification were analyzed by SDS-PAGE and revealed by silver stain and western blotting using streptavidin. Based on the silver staining, the purity of the biotinylated PrP- and Dpl-BAP recovered in the eluates was estimated to $\approx 80\%$ (Fig.1B and C). Eluate from PrP-BAP purification was analyzed by blotting using a series of specific monoclonal and pAb raised against PrP (Fig.1D). Three bands with apparent *Mr* around 17, 25 and 29 kDa were specifically revealed. Despite the presence of two putative N-linked glycans binding sites in the PrP sequence, PNGaseF digestion did not change the apparent *Mr* of the three PrP-immunoreactive bands (Fig.1E). Therefore, these bands could be produced by differential proteolysis of the N-terminal end of PrP molecules. By N-terminal sequence analysis, we determined that the upper band (i.e. ~ 29 kDa) started at residue Lys24 (data not shown), indicating efficient signal peptide removal and full-length PrP synthesis. The middle band (i.e. ~ 20 kDa) was a mix of PrP molecules with N-terminal end starting between residues 60 to 90 (data not shown), whereas the lower band (i.e. ~ 17 kDa) started at residue His110. Consistently, the lower band was barely detectable when western blot analysis was revealed by the SAF32 Ab recognizing the octarepeat region (Fig.1D). A *Mr* of 17943Da was found for the purified Dpl-BAP consistent with an unglycosylated Dpl-BAP protein with

two formed di-sulfide bridges (data not shown). The formation of tetramer was assessed by size exclusion chromatography (Fig.1F). Purified PrP-BAP monomer and PrP-streptavidin tetramer were eluted in fractions corresponding to approximate M_r of 20kDa and above 185kDa, respectively. These results confirmed the expected M_r of the PrP-tetramer composed with a single unit of streptavidin coupled with 4 PrP-BAP molecules. When the tetramer was formed, the amount of free PrP-BAP was negligible. The formation of the Dpl-BAP tetramer was checked using the same method (data not shown).

2.2. Cell expression of PrP and Dpl proteins and distribution of their binding sites on mouse splenocytes- Anti-PrP and -Dpl mAb were used to precisely characterize the mouse splenic cell populations expressing endogenous PrP and Dpl proteins (Fig.2A, "Expression"). PrP and Dpl were strongly expressed at the cell surface of B-lymphocytes (Fig.2B) and granulocytes (Fig.2D, upper panel) and to a lesser extent on macrophages (Fig.2D, down panel). DC, enriched using anti-CD11c magnetic beads before flow cytometry analysis, expressed low levels of PrP and Dpl (Fig.2E). Noticeably, Dpl was more strongly expressed at the surface of B-cells than PrP (Fig.2B). T-lymphocytes and NK were devoid of PrP and Dpl proteins (Fig.2C). Fluorescent tetramers were used as tracers to characterize splenocytes expressing PrP and Dpl binding sites on their cell surface (Fig.2A, "Binding sites"). PrP and Dpl tetramers labeled massively B-lymphocytes ($CD19^+$; $B220^+$; Fig.2B), granulocytes ($Gr1^+$ high, $CD11b^+$ high), macrophages ($Gr1^+$, $CD11b^+$; Fig.2D) and DC ($CD11c^+$; Fig.2E). The half population of T lymphocytes ($CD3^+$) and less than 10% of NK ($DX5^+$) were positively labeled with both tetramers (Fig.2C). Non-specific labeling

was established using similar analysis with either biotin-saturated streptavidin or a biotinylated MBP-streptavidin tetramer (Fig.2A-E, gray line).

Using *in situ* tetramer staining technique on tissue sections, we easily observed massive binding of fluorescent tetramers within the splenic white pulp. Confirming flow cytometry analysis, fluorescence microscopy experiments indicated that B-cells (B220⁺ cells) were strongly stained by both PrP and Dpl tetramers (Fig.3). No tetramer staining was found in FDC (FDC-M1⁺ cells) and fibroblasts (ERTR7⁺ cells) suggesting that these cells do not express PrP and Dpl binding sites (Fig.3). No staining was observed with either biotin-saturated streptavidin or biotinylated MBP-streptavidin tetramer demonstrating the specificity of the *in situ* tetramer binding (Fig.3).

Table 1 summarizes the expression profiles of both PrP and Dpl proteins as well as that of their binding sites obtained by flow cytometry on splenocytes and spleen section staining. Remarkably, macrophages expressed low PrP and Dpl proteins but high levels of their binding sites. Under physiological conditions, half of the T-lymphocyte population expressed binding sites but was devoid of endogenous PrP and Dpl.

Insofar as B- and T-lymphocytes come into activation state after recognition of antigens, it was of interest to measure the expression level of PrP and Dpl proteins and of their receptors on activated lymphocytes. To do so, splenocytes were cultured in the presence of polyclonal activators (i.e. conA and LPS) for two days prior labeling. In Con A-stimulated T cells, PrP and Dpl proteins were over-expressed (Fig.4A, left), whereas the level of expression of their binding sites remained unchanged (Fig.4B, left). In LPS-activated B-lymphocytes, the expression level of

both proteins was highly increased (Fig.4A, right) as well as Dpl tetramer staining but not that of PrP (Fig.4B, right). In summary, the expression profile of both PrP and Dpl partners almost perfectly overlapped in the different spleen cell populations under physiological conditions (table 1). However, Dpl binding sites are over-expressed in activated B-lymphocytes suggesting that Dpl might play a role during the activation stages of immune cells.

2.3. Characterization of PrP and Dpl binding sites on splenocytes- The specificity of the tetramer binding was demonstrated by labeling in the presence of specific Ab raised against PrP and Dpl (table 2). The PrP tetramer binding was strongly inhibited by mAbs SAF70 and SAF83, whereas SAF32 raised against the octapeptide region, was unable to decrease the PrP tetramer binding. Never these mAb α PrP were able to decrease the binding of Dpl tetramer on splenocytes. pAb directed against Dpl selectively inhibited the binding of Dpl tetramer while it remained without effect on the PrP tetramer binding. Several cell surface PrP-interacting partners have been previously identified including heparan sulfate [14], laminin receptor [15], stress inducible protein-1 (STI-1) [16] and even PrPc itself. In our attempt to identify the binding sites characterized in the present study, splenocytes were labeled with the PrP tetramer in the presence of heparin or specific Abs raised against laminin receptor and STI-1 (table 2). The concentrations of Abs used have been demonstrated previously to be sufficient for significant reduction of the PrP binding [15, 16]. Neither heparin, nor anti-laminin receptor (α LR), nor anti-STI-1 Ab reduced the PrP tetramer labeling as compared to the control conditions performed by incubating PrP tetramer with non-immune IgG, taken as 100%. Similar results were obtained when splenocytes

were labeled with Dpl tetramer (table 2). Finally, we investigated the binding of PrP tetramer onto PrP^{0/0} splenocytes. No significant difference can be detected by flow cytometry when comparing labeling of splenocytes from WT and PrP^{0/0} mice demonstrating that endogenous PrP was not involved in PrP/Dpl tetramer binding (table 2). Thus, fluorescent tetramers allowed us to characterize new types of partners for PrP/Dpl in splenic cells.

2.4. Characterization of PrP and Dpl binding sites on B cell line- Using flow cytometry, we screened a panel of established cell lines from mouse splenic origin, for positive tetramer labeling. We found that the B-cell line A20 was intensively labeled by both PrP and Dpl tetramers making it a suitable cell model to further characterize PrP and Dpl binding sites (Fig.5A). The non-specific binding was determined under the same experimental conditions using fluorescent streptavidin-MBP tetramer. To investigate whether tetramerization of PrP is a requirement for the binding, A20 cells were labeled with equal concentrations of the fluorescent streptavidin coupled with PrP in a final ratio 1:1 or 1:4 (Fig.5B). The fluorescence intensity obtained with the streptavidin-coupled PrP tetramer was higher than that of streptavidin-PrP mixed in a 1:1 ratio indicating that tetramerization of PrP is not required but improved the binding parameters. Competition experiments were carried out by incubating A20 cells with fluorescent PrP tetramer alone or in the presence of increasing concentrations of unlabeled monomer or tetramer of PrP (Fig.5C). Equal concentrations of PrP under monomeric or tetrameric form were able to similarly compete for the binding of the fluorescent PrP tetramer. This suggested that the four PrP molecules forming the tetramer are involved in the binding with partner(s) and that four monomers of PrP are needed to compete the binding. As negative controls,

MBP tetramer or monomer failed to decrease the fluorescent PrP tetramer binding (Fig.5C). To estimate the affinity constants, saturation experiments were performed by incubating A20 cells with fluorescent PrP tetramer alone or in the presence of increasing concentrations of unlabeled PrP monomer (Fig.5D). The specific binding of fluorescent PrP tetramer to A20 cells was concentration-dependent and saturable. Saturation experiments gave linear Scatchard plot suggesting the presence of a single binding site with an apparent K_d value of 28 nM (Fig.5D, *insert*). Confocal microscopy experiments indicated that the labeling of PrP and Dpl tetramers was located at the surface of A20 cells as discrete spots as well as the B-cell marker CD19 (Fig.5E). In the course of these experiments, no intracellular labeling has been observed indicating the absence of endocytosis of tetramers (Fig.5E). Superimposed images clearly revealed massive co-labeling fluorescence between PrP- and Dpl-tetramers however, specific staining was also observed (Fig.5E). These results demonstrate that binding sites of both PrP and Dpl are expressed at the cell surface of B lymphocytes.

2.5. Induction of intracellular signaling pathways by PrP and Dpl tetramers– We next tested whether the binding of both tetramers induced the activation of intracellular signaling pathways such as elevation of intracellular calcium concentration and activation of the MAP kinases. First, A20 cells were loaded with the calcium binding dye Fluo-4 AM. In the absence of calcium in the incubating medium, PrP and Dpl tetramers induced a rapid increase of the intracellular calcium fluxes (Fig.6A). In comparison to the transient stimulation induced by the calcium ionophore ionomycin, the tetramer-induced responses were persistent over twenty minutes. At this time point, adding calcium and ionomycin in the incubation

medium provoked a strong increase of the extra-cellular calcium fluxes indicating that the quantity of Fluo-4 AM was not a limiting factor. No increase in intracellular calcium was detected in A20 cells incubated with the control tetramer.

Then, we assayed the level of phosphorylation (i.e. activation) of ERK1/2, the key enzyme of the MAP kinase pathway, as a function of the incubation time in the presence of PrP or Dpl tetramer (Fig. 6B). A20 cells were incubated with PrP or Dpl tetramers for various periods of time then labeled with a specific mAb raised against the phosphorylated form of ERK1/2 and analyzed by flow cytometry. After two minutes of incubation, the PrP tetramer induced a maximal response in ERK phosphorylation that decreased slowly thereafter. At fifteen minutes of incubation time, 40% of the cells were still phospho-ERK positive. Compared to that of the PrP-tetramer, the Dpl tetramer-induced response was more transient since after fifteen minutes of incubation, ERK was totally dephosphorylated. The MBP-tetramer did not change the level of intra-cellular phospho-ERK whereas cells incubated with PMA exhibited the maximum signal of phosphorylation. The activation of intracellular transduction signals suggested that PrP/Dpl tetramers bind to functional receptors on A20 B-cell line.

3. DISCUSSION

The present study was designed to detect and characterize trans-interacting partners of PrP and Dpl on the cell surface of immune cells. Taking advantage of the high affinity of the streptavidin/biotin complex and of the availability of a wide range of streptavidin derivatives, we engineered fluorescent ligands of PrP and Dpl, suitable for flow cytometry analysis on cells and *in situ* binding experiments on tissue

sections. We demonstrated that PrP and Dpl binding sites are expressed massively at the cell surface of B-cells, macrophages, granulocytes and DC. Half of the T-lymphocyte population was positively labeled. No staining was detected on NK, FDC and spleen fibroblasts. Due to the unique site of biotinylation, PrP and Dpl proteins are coupled with streptavidin *via* their C-terminal end letting the molecules free to interact with potential trans-interacting partner(s). The measured binding may reflect possible cell-cell recognition through trans-interactions of PrP/Dpl with their partners located at the surface of target cells. Alternatively, soluble tetramers may reflect biochemical interactions carried out by soluble forms of PrP. Indeed, substantial amounts of a soluble form of PrP lacking the GPI anchor have been characterized in the medium of splenocytes [17]. A number of GPI-anchored proteins have been shown to be released from lymphocytes by phospholipases in the serum and to exert important signaling functions in the lymphoid system [18]. Soluble PrP has been detected in serum of humans and mice, suggesting possible physiological relevance [19]. Our finding that soluble tetramers specifically bind to partner(s) and induce the activation of intracellular signaling pathway in B-cells may argue in favor of physiological functions of soluble forms of PrP and Dpl.

Labeling profiles of both tetramers were almost perfectly superimposed on splenic cell populations suggesting that PrP and Dpl could share the same receptor(s) and therefore ensure close if not identical physiological functions. Two-thirds of the C-terminal part of PrP and the entire molecule of Dpl present a similar globular three-dimensional structure encompassing the α -helical rich domain. Spectroscopic analyses of rDpl has revealed a α -helical signature, virtually superimposable with that

of PrP [20]. Staining experiments performed in the presence of mAb α PrP emphasize the importance of the central domain of PrP in its interaction with the binding sites and minimize the implication of the N-terminal region. Thus, our results are compatible with a competitive binding to common receptor(s) recognizing partly or entirely the α -helical rich domain of PrP and Dpl. Based on transgenic mouse models presenting cerebellum degeneration, the existence of α -helical domain specific binding sites was first postulated by Shmerling and co-workers [21]. Here, we demonstrate that similar interactions could exist in tissues naturally co-expressing PrP and Dpl such as spleen.

Activated B-lymphocyte over-expressed Dpl binding sites but not that of PrP. Moreover, in A20 B-cell line the kinetics of activation of intracellular signaling pathways mediated by PrP and Dpl were slightly different. These results suggest that Dpl or PrP recognize different receptors. Altogether, we propose the existence of two classes of binding sites, one common to PrP and Dpl and one specific to each protein. To date, several proteins have been shown to bind to PrP *in vitro* such as heparin, laminin, Bcl-2, chaperone HSP60, apolipoprotein 1 and glial fibrillar acidic protein (for review [22]). However, *in vivo* interactions have been confirmed only with the laminin receptor [15], STI-1 [16] and N-CAM [23] in relation with neuronal cell adhesion, neurite outgrowth and neuroprotection mechanisms. It has been shown that PrP interacts with these proteins in cis-interactions through its N-term tail. Importantly, the laminin receptor is also involved in the binding [24] and the endocytosis of the pathological isoform of PrP, PrPres [25]. Although, the precise nature of the binding sites remains to be established, none of the previously described

PrP partners could account for the binding described here in immune cells. Of course, we cannot totally rule out that different results might have emerged from binding studies in case of use of monomers or dimers instead of tetramers. No Dpl interacting partners(s) have been identified so far, although controversy remains concerning possible interactions between Dpl and the laminin receptor [26, 27]. We also excluded that endogenous PrP could be responsible for the binding of PrP/Dpl tetramer since similar binding parameters were measured onto splenocytes from PrP^{0/0} mice whatever the considered sub-population. Thus, trans-interactions with endogenous PrP can be ruled out in mouse splenic cells.

In the present study, we showed that PrP and Dpl proteins were strongly expressed at the cell surface of B-lymphocytes and granulocytes and to a lesser extent in DC. The profile of PrP and Dpl expression was quite similar with the exception of B-cells that expressed more strongly Dpl than PrP. Macrophages, T lymphocytes and NK from C57Bl6 mice were found to express very low levels of PrP and Dpl. Since B-cells, granulocytes and DC co-express both PrP and Dpl proteins and their trans-interacting receptors, one can imagine that these proteins are involved in cell-cell adhesion, immune cell maturation and activation mechanisms. Consistent with such a role, PrP has been shown to co-localize with MHC classII molecules in immature and mature myeloid DC [28]. As previously proposed, the normal function of PrP may involve immune complex trapping [29]. Moreover, PrP might play an important role in T-cell activation since its level of expression is up-regulated in activated T lymphocytes ([10] and the present study). Interestingly, dendritic cells, the natural partners of T-cells in initiating primary response, highly express PrP and Dpl binding sites. Through their interactions with specific receptors on both cell partners forming the

immune synapse, PrP and/or Dpl might play crucial roles in the initiation or the accomplishment of immune responses [30].

Further investigations will be required to precisely identify PrP and Dpl partners in immune cells as well as to understand their functions in physiological and pathological paradigms. In addition, characterization of the cellular partner(s) of the normal form of PrP may provide important clues to study pathogenesis of prion disorders.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Cell cultures- Schneider S2 cell line was grown in Schneider Drosophila medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% inactivated FCS, (BioWest, France), penicillin-streptomycin (P/S; 0.5mM), L-glutamine, and G418 (50µg/ml) at 25°C. The murine B lymphoma cell line A20 was grown in RPMI1640 containing 10% FCSi, P/S, L-glutamine, 2-ME and sodium pyruvate at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

4.2. Expression, purification and quantification of PrP and Dpl proteins- Single site biotinylation of the soluble PrP- and Dpl-BAP proteins was performed by incubation with the BirA enzyme (0.5µg/ml) in biotinylation buffer (bicine 50mM pH 8.3, magnesium acetate 10mM) containing 50µM biotin and 20mM adenosine triphosphate for 12h at room temperature [33]. After extensive dialyze in PBS to remove free biotin, biotinylated proteins were purified by affinity chromatography on a monomer avidin gel. Briefly, PBS-equilibrated gel (5ml) was incubated with biotinylated proteins overnight at 4°C under stirring, then washed with 10 volumes of PBS, 20 volumes of PBS-1% CHAPS, 20 volumes of PBS-1.5% CHAPS and 10

volumes of PBS. Proteins were finally eluted with 10% acetic acid and NaOH was added to the eluate to adjust the pH to 7. Purity was estimated by SDS-PAGE and silver staining. Purified fractions were stored at 4°C in PBS containing 0.1% CHAPS, 0.02% CHS, a protease inhibitor cocktail and 0.01% NaN₃ until use. Biotinylated and purified PrP- and Dpl-BAP proteins were quantified using an ELISA assay. Briefly, proteins were allowed to adsorb for 3h at room temperature on a 96-well plate. Non-specific binding was blocked by incubation in PBS-2% BSA; the plate was then incubated with HRP-streptavidin for 1h before revelation by TMB reactive. Absorption was monitored at 650nm and quantification was performed by comparison with a standard curve obtained from biotinylated MBP-AviTag protein.

4.3. SDS-PAGE and immunoblotting- Protein samples were analyzed on 12% acrylamide gels, then blotted onto nitrocellulose membrane for 1h at 200mA. The blots were saturated in PBS containing 0.1% Tween 20 and 5% milk, incubated with α -PrP Ab at a 1/1000 dilution, then revealed using appropriate secondary HRP-coupled Ab. Alternatively, biotinylated proteins were directly revealed using HRP-coupled streptavidin. The detection was performed by enhanced ECL on a LAS3000 apparatus. To analyze the purification steps, proteins were submitted to SDS-PAGE and gels were directly silver stained.

4.4. Enzymatic deglycosylation- Deglycosylation experiments were performed by denaturing biotinylated and purified PrP-BAP at 95°C for 10min in PBS containing 0.5% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% 2-ME, then the reaction was initiated by incubating PNGaseF (5 U/reaction) for 16h at 37°C.

4.5. Formation of PrP and Dpl protein tetramers- Tetramers were produced by adding aliquots of purified biotinylated PrP-, Dpl- or MBP-BAP molecules every

15min to PE or APC labeled streptavidin (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) at a final molar ratio of 4:1. The formation of tetramers was checked by size exclusion chromatography. Briefly, purified PrP-BAP or streptavidin-coupled PrP tetramer (15pmol in a total volume of 100 μ l) was loaded on a superose 12 column (Pharmacia, Munich, Germany) and eluted at a flow rate of 0.5ml/min in 25mM Hepes pH7.5 containing 100mM KCl, 1mM MgCl₂ and 1mM DTT. The column was calibrated by recording the optic density at 280 and 260nm using the following standards: aldolase (185kDa), bovine serum albumin (67kDa), trypsin inhibitor (20kDa) and myoglobin (17.8kDa). Collected fractions (0.3ml) were further analyzed by dot blot assay using Ab α PrP SAF83.

4.6. Immunofluorescent labeling and FACS analysis- Spleens were cut into small pieces and incubated into HBSS (Invitrogen) containing 4000 U/ml collagenase IV and 0.1mg/ml DNase I at 37°C for 30min. Digestion was stopped by adding HBSS (*minus* Ca²⁺ and Mg²⁺) containing 5mM EDTA, and the cell suspension was gently passed through a 70- μ m-pore-size sterile cell strainer. Cell suspension was subjected to ACK red cell lysis buffer, then the viable cells were counted using trypan blue. When indicated, DC were positively selected by MACS using N418 (anti-CD11c mAb) magnetic beads (Miltenyi Biotec, France) in the presence of 10% mouse serum and 5mM EDTA. Finally, cells were resuspended in PBS pH7.4 supplemented with 2% FCS and 0.1% NaN₃ and blocked with Fc-Block (Pharmingen, San Diego, CA) to prevent Ab binding to Fc receptors. PE-coupled PrP-, Dpl- or MBP-tetramers were incubated a final concentration of 8.5nM with 10⁶ cells in 200 μ l of PBS-0.1% BSA (labeling buffer) for 30min. Alternatively, cells were pre-incubated 15min with the

indicated concentrations of potential competitor heparin or Abs directed against anti-mouse rSTI-1 [16], α laminin receptor [32] and α Dpl raised in rabbit or mouse mAbs directed against mouse PrP (purified IgG). Rabbit or mouse non-immune purified IgG were used as negative controls. Flow cytometry analyses were done on a FACSCaliburTM using the CELLQuestTM software. Cells were gated according to size and scatter to eliminate dead cells and debris from analysis. When needed, dead cells were further gated out by TOPO-3 uptake.

4.7. *In vitro* polyclonal activation- For B and T lymphocytes activation experiments, freshly isolated splenocytes (2.10^6 cells/ml) were cultured in RPMI containing 10%FCSi, P/S, LPS, 20 μ g/ml or ConA, 10 μ g/ml for two days at 37°C. Staining with the CD25 (clone PC61) marker was performed to check the activation state of the cells. CD3-CD25 and CD19-CD25 double-positive cells were gated to visualize activated T and B cells, respectively. Staining and FACS analysis were performed as described above. All experiments were repeated five times for consistency.

4.8. Immunohistochemistry and binding experiments on frozen tissue sections- Dissected spleen were frozen in 2-methyl butane at -30°C then mounted in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek; SAKURA). Frozen sections (10 μ m) were cut on a cryostat, transferred onto slides and stored at -70°C until use. Adjacent sections were used for total and non-specific binding. Sections were pre-incubated in binding buffer (PBS, 2%BSA, 0.1%CHAPS) for 20min then incubated for 60min with the primary Abs (1/200) directed against FDC (FDCM1), fibroblasts (ERTR7⁺), or B-lymphocytes (B220). Slides were washed three times and then incubated in the binding buffer containing the appropriate secondary Abs (1/500) and 34nM of PE-coupled PrP-, Dpl- or MBP-tetramers for 60min at room temperature. At the end of

the incubation time, slides were washed twice for 30s in ice-cold PBS, 2% BSA; PBS, 1% BSA; PBS and water then dried under air stream and mounted with mowiol for fluorescence microscopy examination.

4.9. Intracellular calcium and MAP kinase activation measurements- For intracellular calcium measurements, A20 cells (1.5×10^6 cells/ml) were loaded with $10\mu\text{M}$ Fluo-4 AM in the presence of pluronic F-127 for 45min at 37°C , then washed twice in labeling buffer and cell density was adjusted to 10^7 cells/ml. Cells (10^6) were incubated with PrP-, Dpl-, or MBP-tetramers (final concentration of 34nM). Aliquots (10^5 cells) were taken at various times and the fluorescence intensity was immediately measured. As a positive control, cells were stimulated with $0.5\mu\text{g}$ ionomycine. The time scale was divided into discrete periods and the MFI was calculated using a Becton Dickinson CellQuest software.

ERK1/2 phosphorylation assay was performed by incubating A20 cells (4×10^6) with 34nM of PrP-, Dpl-, or MBP-tetramers at 37°C in a final volume of $200\mu\text{l}$. As a positive control, cells were stimulated with 400nM PMA for 15min at 37°C . Cells were then fixed by adding Lyse/Fix Buffer and permeabilized with Perm III Buffer for 30min at 4°C . Cells were resuspended in $100\mu\text{L}$ of labeling buffer, preincubated with saturating doses of Fc-Block and labeled for 30min at room temperature with AlexaFluor 647 coupled Ab20a, which recognizes the phospho-ERK1/2 (T202/Y204).

4.10. Confocal microscopy observation- A20 cells were triple-color stained with 34nM PE-coupled PrP tetramer, APC-coupled Dpl tetramer, and FITC-coupled MB19.1 (αCD19) for 30min at room temperature in labeling buffer, then washed and fixed in 1% paraformaldehyde. Cells were centrifuged, mounted in mowiol and

observed under a Leica laser scanning confocal microscope (SP5) equipped with a DM-IRBE inverted microscope and an argon-krypton laser. Images were acquired as single trans-cellular optical sections and averaged over at least 5 scans/frame.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Aguila for excellent artwork and F. Brau for microscopy observations. We are indebted to Drs. C. Weissmann for providing *Prnp*^{0/0} mice, D. Westaway for constructs encoding Dpl, N. Glaichenhaus for A20 cells and V. Braud for E.Coli/B121 expressing BirA. We thank Drs. V. Martins and S. Weiss for their kind supply of Abs raised against STI-1 and laminin receptor respectively; J. Grassi for anti-PrP SAFs mAb and B. Caughey for anti-PrP R30 pAb. A very special thank is due to Drs. S. Scarzello, N. Leroudier and D. Mounier for mass spectrometry, DNA and protein sequencing analyses. S.C-D was recipient of the "Fondation pour la Recherche Médicale". This study was supported in part by the "Agence Nationale de la Recherche-Neuroscience" (2006-2009).

REFERENCES

- 1 **Mastrangelo, P. and Westaway, D.,** The prion gene complex encoding PrP(C) and Doppel: insights from mutational analysis. *Gene* 2001. **275**: 1-18.
- 2 **Caughey, B. and Chesebro, a. B.,** Prion protein and transmissible spongiform encephalopathies. *Trends Cell Biol.* 1997, pp 56-62.
- 3 **Mo, H., Moore, R. C., Cohen, F. E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P. E. and Dyson, H. J.,** Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. **98**: 2352-2357.

- 4 **Lasmezas, C. I.**, Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull* 2003. **66**: 61-70.
- 5 **Fraser, H. and Dickinson, A. G.**, Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature* 1970. **226**: -.
- 6 **Peoc'h, K., Serres, C., Frobert, Y., Martin, C., Lehmann, S., Chasseigneaux, S., Sazdovitch, V., Grassi, J., Jouannet, P., Launay, J. M. and Laplanche, J. L.**, The human "prion-like" protein Doppel is expressed in both Sertoli cells and spermatozoa. *J Biol Chem* 2002. **277**: 43071-43078.
- 7 **Behrens, A., Genoud, N., Naumann, H., Rulicke, T., Janett, F., Heppner, F. L., Ledermann, B. and Aguzzi, A.**, Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *Embo J* 2002. **21**: 3652-3658.
- 8 **Shaked, Y., Hijazi, N. and Gabizon, R.**, Doppel and PrP(C) do not share the same membrane microenvironment. *FEBS Lett* 2002. **530**: 85-88.
- 9 **Paltrinieri, S., Comazzi, S., Spagnolo, V., Rondena, M., Ponti, W. and Cecilian, F.**, Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes. *J Histochem Cytochem* 2004. **52**: 1639-1645.
- 10 **Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. and Bendheim, P. E.**, Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 1990. **61**: 185-192.
- 11 **Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S. and Lodish, H. F.**, Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. **103**: 2184-2189.
- 12 **Behrens, A. and Aguzzi, A.**, Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP(C) and its homologue Dpl. *Trends Neurosci* 2002. **25**: 150-154.
- 13 **Hugues, S., Malherbe, L., Filippi, C. and Glaichenhaus, N.**, Generation and use of alternative multimers of peptide/MHC complexes. *J Immunol Methods* 2002. **268**: 83-92.
- 14 **Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodaysky, I. and Taraboulos, A.**, Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J Biol Chem* 2005. **280**: 17062-17067.
- 15 **Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. and Weiss, S.**, The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* 2001. **20**: 5863-5875.

- 16 **Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R., Cabral, A. L., Lee, K. S., Juliano, M. A., de Oliveira, E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R. R. and Martins, V. R.**, Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* 2002. **21**: 3307-3316.
- 17 **Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A. and Raeber, A. J.**, Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *J Biol Chem* 2001. **276**: 44627-44632.
- 18 **Lehto, M. T. and Sharom, F. J.**, Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. *Biochem J* 1998. **332 (Pt 1)**: 101-109.
- 19 **Perini, F., Vidal, R., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. and Prelli, F.**, PrP²⁷⁻³⁰ is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1996. **223**: 572-577.
- 20 **Silverman, G. L., Qin, K., Moore, R. C., Yang, Y., Mastrangelo, P., Tremblay, P., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. and Westaway, D.**, Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* 2000. **275**: 26834-26841.
- 21 **Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A. and Weissmann, C.**, Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 1998. **93**: 203-214.
- 22 **Gauczynski, S., Hundt, C., Leucht, C. and Weiss, S.**, Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Adv Protein Chem* 2001. **57**: 229-272.
- 23 **Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. and Schachner, M.**, Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2005. **169**: 341-354.
- 24 **Gauczynski, S., Nikles, D., El-Gogo, S., Papy-Garcia, D., Rey, C., Alban, S., Barritault, D., Lasmezas, C. I. and Weiss, S.**, The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as a receptor for infectious prions and is inhibited by polysulfated glycanes. *J Infect Dis* 2006. **194**: 702-709.
- 25 **Morel, E., Andrieu, T., Casagrande, F., Gauczynski, S., Weiss, S., Grassi, J., Rousset, M., Dormont, D. and Chambaz, J.**, Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *Am J Pathol* 2005. **167**: 1033-1042.

- 26 **Yin, S. M., Sy, M. S., Yang, H. Y. and Tien, P.,** Interaction of Doppel with the full-length laminin receptor precursor protein. *Arch Biochem Biophys* 2004. **428**: 165-169.
- 27 **Hundt, C. and Weiss, S.,** The prion-like protein Doppel fails to interact with itself, the prion protein and the 37 kDa/67 kDa laminin receptor in the yeast two-hybrid system. *Biochim Biophys Acta* 2004. **1689**: 1-5.
- 28 **Burthem, J., Urban, B., Pain, A. and Roberts, D. J.,** The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* 2001. **98**: 3733-3738.
- 29 **Jeffrey, M., McGovern, G., Martin, S., Goodsir, C. M. and Brown, K. L.,** Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch Virol Suppl* 2000: 23-38.
- 30 **Ballerini, C., Gourdain, P., Bachy, V., Blanchard, N., Levavasseur, E., Gregoire, S., Fontes, P., Aucouturier, P., Hivroz, C. and Carnaud, C.,** Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol* 2006. **176**: 7254-7262.
- 31 **Schatz, P. J.,** Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 1993. **11**: 1138-1143.
- 32 **Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I. and Weiss, S.,** The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 1997. **3**: 1383-1388.
- 33 **Garboczi, D. N., Hung, D. T. and Wiley, D. C.,** HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 3429-3433.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Structures, affinity chromatography purification and characterization of mouse PrP- and Dpl-BAP and their tetramers. **A,** Schematic of GPI *minus* PrP- and Dpl-BAP showing positions of mouse protein features including di-sulfide bridges, the predicted signal peptide (white boxes) and the α -helical domain (gray boxes). The box with vertical stripes shows the octapeptide repeat region. The C-term

BAP sequence containing the lysine residue (bold) and enzymatically biotinylable is indicated using the one lettering code. Arrows indicate the determined positions of N-terminal cleavages. Epitopes of α -PrP Ab used in the present study are indicated with horizontal bars. Mouse mAbSAF32 and SAF70 were directed against the octarepeat region and the 142–160 sequence respectively. Rabbit pAb R30 was raised against the sequence 89–103. **B and C**, Analysis of the different steps of the purification of biotinylated PrP-BAP (**B**) and Dpl-BAP (**C**) by affinity chromatography. An aliquot of the different steps of the purification procedure (ld, load; ft, flow through; w, wash; e, eluate) was loaded onto SDS-PAGE gels, submitted to electrophoresis before silver stain (SS). Alternatively, gels were blotted onto nitrocellulose and proteins were revealed by western blotting (WB) using HRP-coupled streptavidin. **D**, Characterization of purified PrP-BAP by western blotting using different Ab raised against PrP. **E**, Alternatively, purified biotinylated PrP-BAP was digested by PNGaseF and analyzed by WB using HRP-coupled streptavidin. Molecular masses (MM) of standards are indicated in kDa on the left. **F**, Size of purified monomeric PrP-BAP or streptavidin-coupled tetrameric PrP-BAP was assessed by gel filtration chromatography as described in "Materials and Methods". Elution fractions were analyzed on dot-blot assay using the mAb SAF83. *Mr* of monomer and tetramer PrP-BAP were determined by comparison with elution fractions of standard proteins. OD: optic density.

Figure 2. Cell surface expression of PrP and Dpl proteins and distribution of their binding sites on splenocytes. Freshly isolated splenocytes from C57BL6 mice were labeled either to determine cells presenting PrP and Dpl tetramer binding sites

(*BINDING SITES*) or to identify PrP and Dpl expressing cells (*EXPRESSION*). Cells presenting binding sites were identified using 8.5nM PE-labeled PrP (*dot line*), Dpl (*solid line*) or control MBP (*gray line*) tetramers prepared as described in the “Materials and Methods” section. Cells expressing PrP and Dpl proteins were identified using rabbit antisera R30 (*dashed line*) and FL176 (*solid line*) respectively and detected with FITC-labeled anti-rabbit IgG. Control experiments were performed in the same conditions with the secondary Ab alone (*gray line*). **A**, dot-plot splenocytes were gated according to size and scatter to eliminate dead cells and debris. **B, C, D, E**, splenocytes were further gated according to the expression of cell surface antigens. Binding sites and expression visualized in histogram parts **A, B, C, D, E** through fluorescence intensity were first assessed on total splenocytes (**A**) and then in various cell types: B-lymphocytes defined as CD19 and B220 double-positive (**B**); T lymphocytes defined as CD3 positive (**C, upper panel**); NK defined as DX5 positive (**C, bottom panel**); granulocytes defined as Gr1⁺ high and CD11b⁺ high (**D, upper panel**); macrophages defined as defined as Gr1⁺ and CD11b⁺ (**D, bottom panel**) and DC defined as being CD11c high which were positively selected and enriched using anti-CD11c magnetic beads before flow cytometry analysis (**E**). Representative data from five experiments are shown.

Figure 3. *In situ* tetramer staining on spleen sections. Tissue sections were prepared as described in the “Materials and Methods” section, then incubated with the indicated primary Ab directed against B-cells (anti-B220), FDC (anti-FDC-M1) or fibroblasts (anti-ERTR7) for 60min. Slides were washed and incubated in the binding buffer containing the appropriate secondary Abs (1/500) and 34nM of PE-coupled

PrP- (*upper panel*), or Dpl- (*middle panel*). After washing, slides were dried and mounted with mowiol for fluorescence microscopy observation. Tetramer staining appears in red (*left*), cell markers in green (*middle*), overlapping fluorescence in the merged images in yellow (*right*). Controls were performed in the presence of streptavidin-PE, MBP-tetramer or the secondary Ab alone (*bottom panel*). Magnification X25.

Figure 4. Expression of PrP and Dpl proteins and of their binding sites on activated T- and B-lymphocytes. Splenocytes were cultured in presence (*black line*) or in absence (*gray line*) of the indicated activator for 2 days then labeled either to determine the level of expression of PrP and Dpl (**A**) or that of their binding sites (**B**). Cells expressing PrP and Dpl proteins were identified using rabbit pAb R30 (*PrP*) and FL176 (*Dpl*) respectively and detected with FITC-labeled anti-rabbit IgG (**A**). Cells expressing binding sites were identified using 17nM PE-labeled PrP and Dpl tetramers (**B**). CD3-CD25 and CD19-CD25 double-positive cells were gated to visualize activated T and B cells, respectively. Representative data from four experiments are shown.

Figure 5. Characterization of PrP binding sites onto A20 B-cell line. **A**, Flow cytometry analysis of A20 cells (10^6) labeled with PE-labeled tetramers of PrP (*blue line*), Dpl (*red line*) or MBP (*green line*). **B**, A20 cells (10^6) were labeled with 8.5nM PE-labeled streptavidin alone (*green line*) or mixed with PrP in a ratio 1:1 (*light blue line*) or 1:4 (*dark blue line*). **C**, For competition experiments, A20 cells were labeled with 8.5nM PE-labeled PrP tetramer alone (*left, middle and right panels; dark blue*

line) in the presence of 17nM (*blue line*) or 34nM (*clear blue line*) unlabeled PrP tetramer (*left*) or with equivalent concentrations i.e. 68nM (*blue line*) and 136nM (*clear blue line*) of PrP monomer (*middle*). As a control, PE-labeled PrP tetramer staining was performed in presence of 8.5nM MBP-tetramer (*right, green line*). Representative data from five independent experiments are shown. **D**, Flow cytometry analysis of A20 cells labeled with 8.5nM PE-labeled PrP tetramer alone (*dark line*) in the presence of 17, 34, 68 or 136nM unlabeled PrP tetramer (*gray lines*). Results of three independent experiments of saturation are shown in the right panel with the Scatchard plot representation derived from mfi values (*insert*). **E**, Confocal microscopy examination of A20 cells (magnification X100) triple stained with PE-labeled PrP tetramer (*red*), APC-labeled Dpl tetramer (*green*) and FITC-coupled anti-CD19 cell surface antigen (*blue*) without NaN₃. Overlapping fluorescence in the merged images appears respectively in yellow (merged PrP and Dpl tetramers), purple (merged PrP tetramer and CD19) and cyan (merged Dpl tetramer and CD19). Scale bar, 20µm.

Figure 6. PrP and Dpl tetramers induce intra-cellular calcium elevation and ERK activation into A20 cells. **A**, Fluo-4AM-loaded A20 cells were incubated with 34nM PrP, Dpl or MBP tetramers or ionomycin (*iono*) in absence of extra-cellular calcium. Samples were taken off at various time points and the fluorescence intensity was measured during 25min. At 20 min, a calcium/ionomycin mixture was added in the medium (*arrowhead*). Results are means of six independent experiments ± standard deviation. AU, arbitrary units. **B**, Kinetics of ERK1/2 activation induced by tetramers onto A20 cells. A20 cells were stimulated with 34nM PrP, Dpl, or MBP

(*ctrl*) tetramers for 1, 2, 5 or 15minutes at 37°C or with 0.4μM PMA as positive control. Cells were then fixed, permeabilized and labeled with AlexaFluor 647-coupled α-phospho-ERK Ab before FACS analysis. Representative data from four independent experiments are illustrated.

Table 1. Expression of PrP and Dpl proteins and of their binding sites on mouse splenocytes.

Cell type	Binding sites (MFI)		Expression (MFI)	
	PrP	Dpl	PrP	Dpl
Granulocytes	++	++	+++	+++
Macrophages	+++	+++	+	+
DC	++	++	+	+
FDC	-	-	n.d	n.d
NK	-	-	-	-
B lymphocytes	++	++	++	++
T lymphocytes	+	+	-	-

n.d: not determined; -:MFI<10; +:10< MFI <25; ++:25< MFI <75; +++: MFI >75

Table 2. Effect of potential competitors and endogenous PrP expression on fluorescent PrP and Dpl tetramer binding on mouse splenocytes.

		Percent of tetramer binding (\pm S.D)	
		PrP-BAP	Dpl-BAP
WT mouse splenocytes		100	100
	+Ab α PrP SAF32 ^a	100.8 \pm 4.5	101.5 \pm 5.0
	+Ab α PrP SAF70 ^a	25.3 \pm 5.3	97.5 \pm 6.4
	+Ab α PrP SAF83 ^a	19.5 \pm 4.0	99.2 \pm 4.5
	+Ab α Dpl ^b	97.5 \pm 5.8	21.6 \pm 5.5
	+Ab α LR ^b	95.4 \pm 8.0	93.0 \pm 7.5
	+Ab α STI-1 ^b	104.0 \pm 7.5	95.6 \pm 6.6
	+ heparin ^c	96.5 \pm 5.0	94.0 \pm 7.8
<i>Prnp</i> ⁰ mouse splenocytes		102.8 \pm 5.7	98.8 \pm 7.0

Control experiments were performed in the presence of non immune mouse (a) and rabbit (b) purified IgG. Ab α PrP SAF32, 70, 83 were used at a final concentration of 10 μ g/ml, Ab α LR and α STI-1 at 65 μ g/ml and 25 μ g/ml respectively. Heparin was used at 4mg/ml (c).

Figure 1

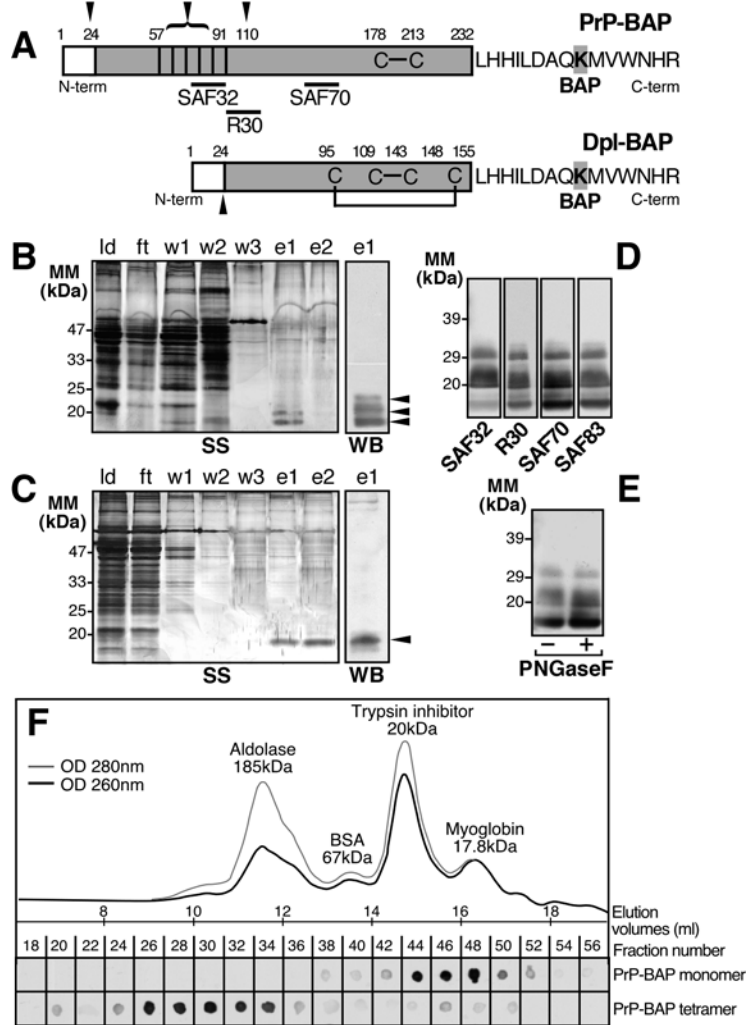


Figure 2

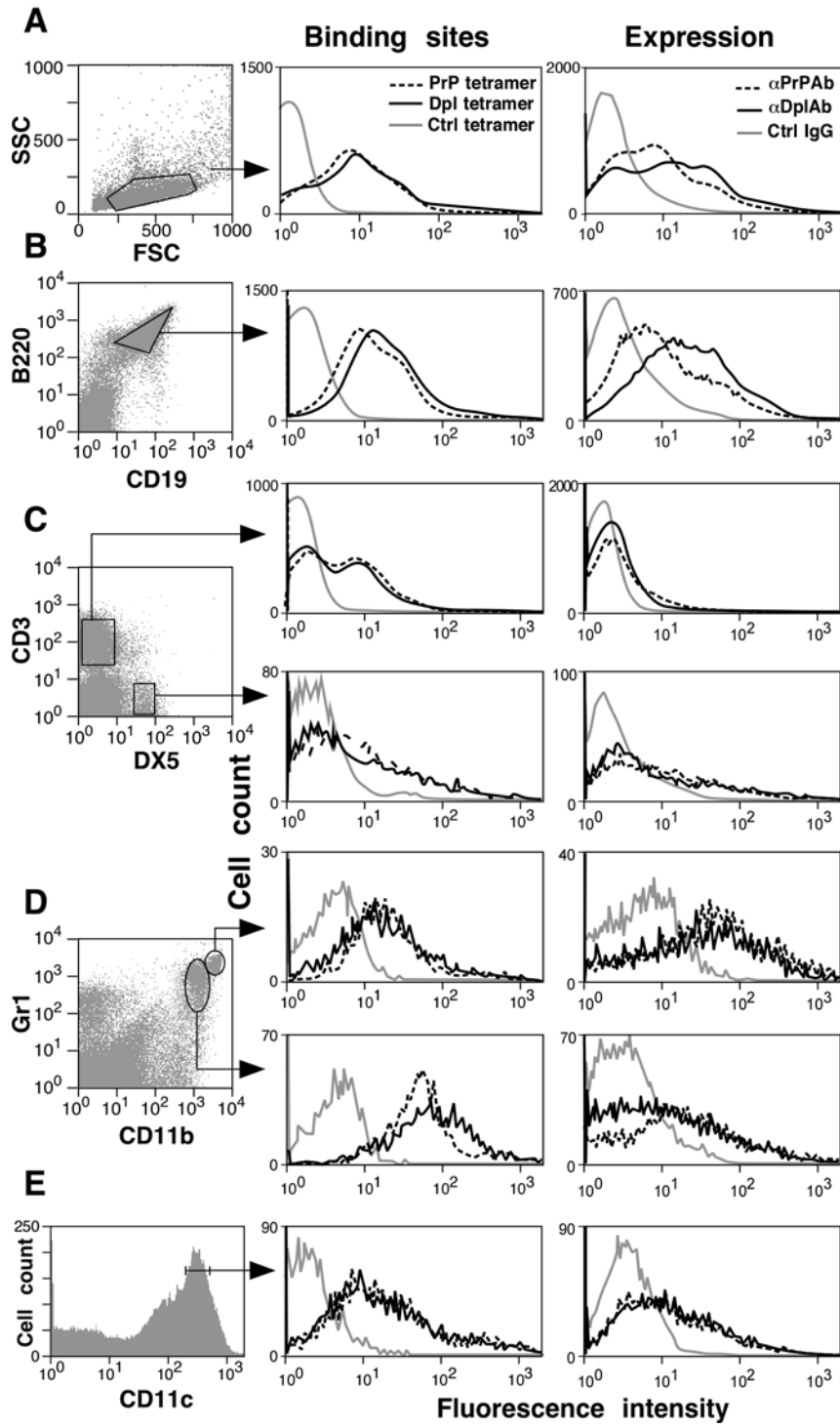


Figure 3

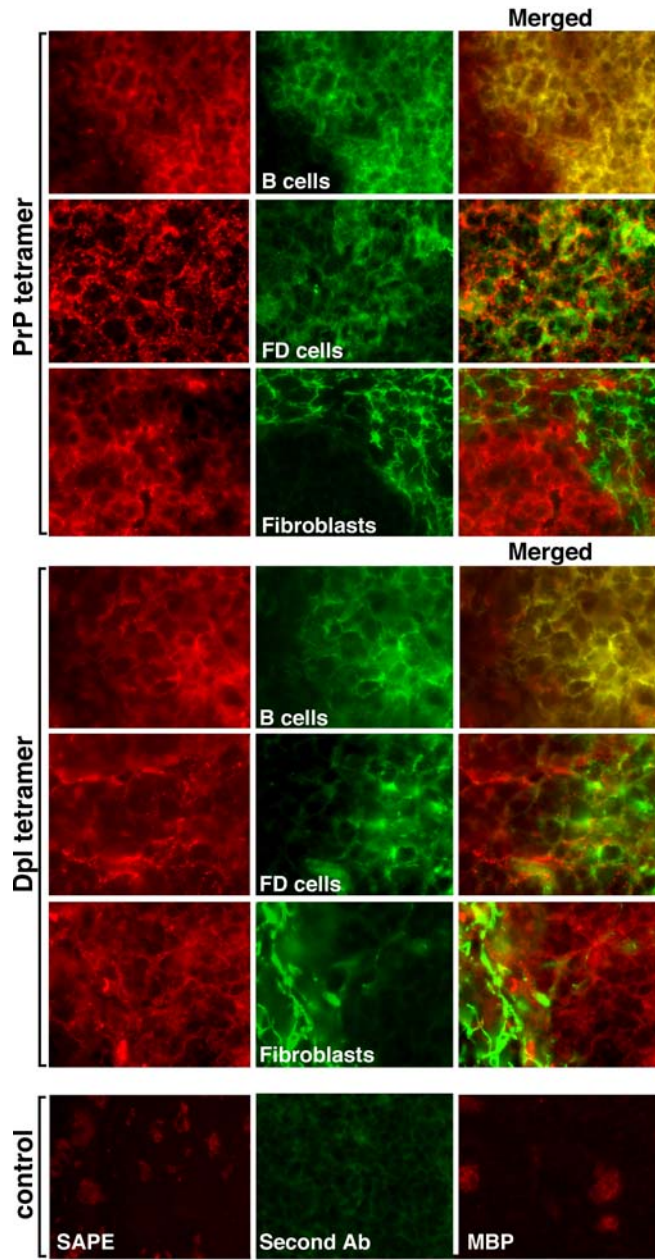


Figure 4

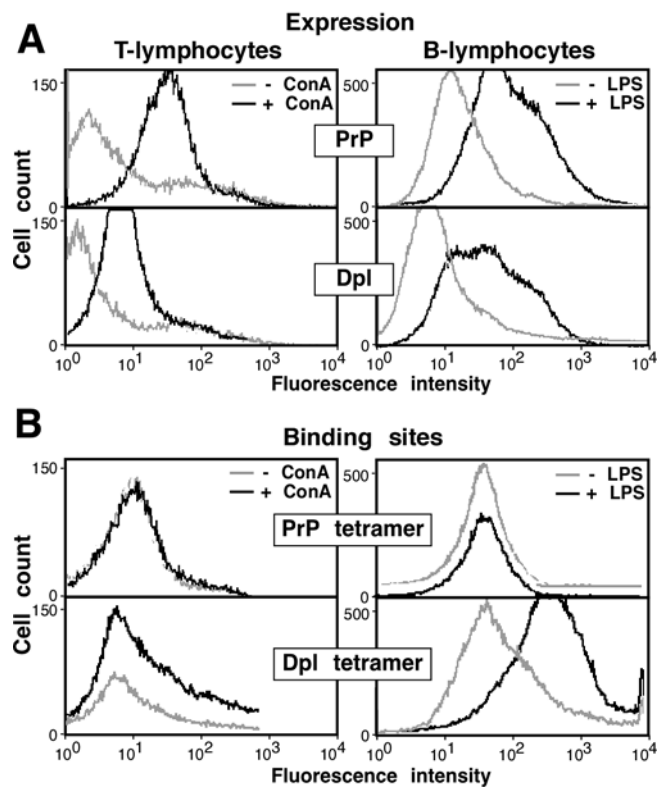


Figure 5

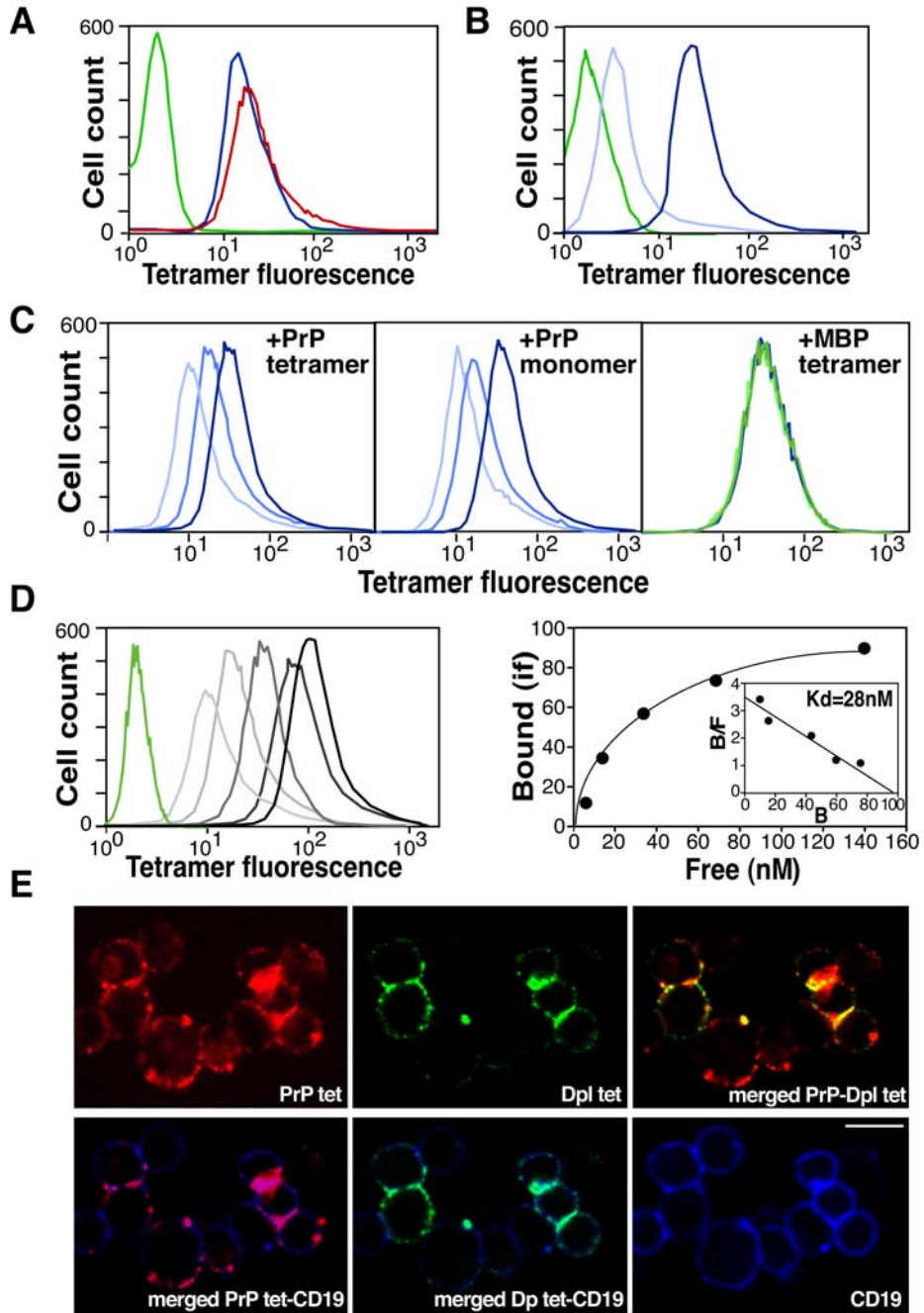
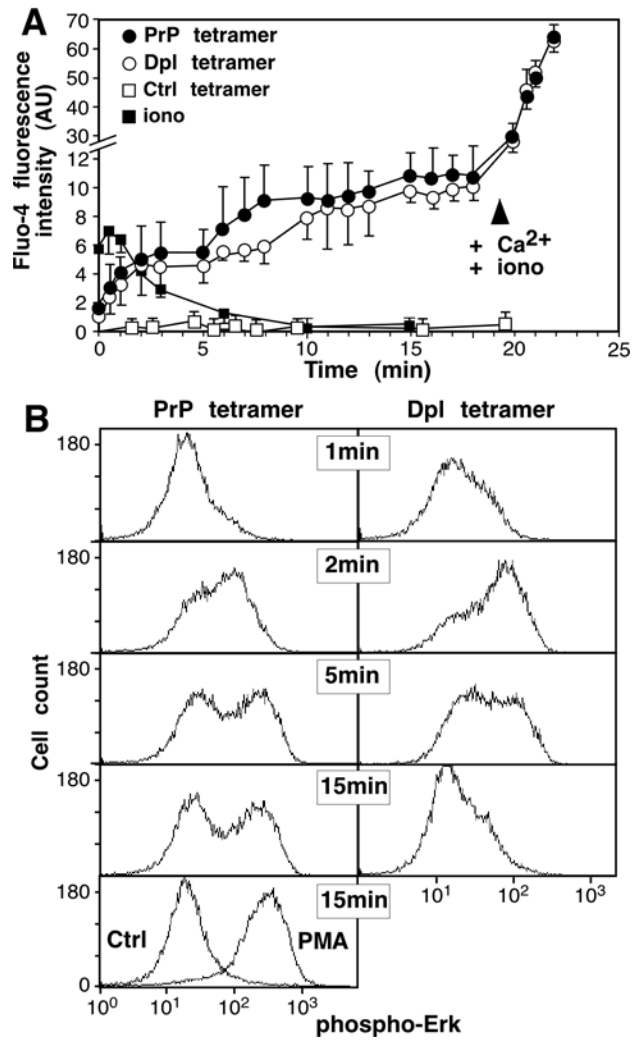


Figure 6



Supplemental Materials

Animals- C57BL6 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'arbresle, France). PrP^{0/0} mice (Zurich I) were bred in the animal facilities of the "Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire" CNRS, France. Animals were housed under pathogen-free conditions and used between 8 and 12 weeks old.

Reagents- Heparin, CHAPS, ionomycin, DNase I, collagenase IV, horseradish peroxidase (HRP) coupled streptavidin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO), monomer avidin gel from Promega, (Madison, WI), biotinylated MBP-AviTag protein from Avidity, (Denver, CO), nitrocellulose membrane from Schleicher & Schuell (Dassel, Germany), chemiluminescence reactive from ECL, Amersham, (Piscataway, NJ), protease inhibitor cocktail from Roche (Basel, Switzerland), 96-well plate from Nalge Nunc International (Rochester, NJ), Fluoro-4 AM and pluronic F-127 from Molecular Probes. Rabbit pAb anti-Dpl (FL176) was from SantaCruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), FITC-coupled anti-rabbit IgG, Lyse/Fix Buffer and Perm III Buffer from BD Biosciences (San Jose, CA). Rabbit pAb raised against STI-1 and laminin receptor were supply by Drs. V. Martins and S. Weiss respectively. Secondary HRP-coupled Ab was purchased from Jackson ImmunoResearch, (West Grove, PA). All reagents listed below were purchased from eBiosciences (Clinisciences, Montrouge, France); fluorescein (FITC)-coupled Abs including DX5 (anti-pan-NK), HL3 (anti-CD11c), M1/70 (anti-CD11b), MB19.1 (anti-CD19) and APC-coupled RB6-8C5 (anti-Gr1), C145-2C11 (anti-CD3), RA3-6B2 (anti-B220), FDCM1 (anti-FDC), HL3 and M1/70 were from BD Biosciences.

Expression, purification and quantification of PrP and Dpl proteins- To engineer soluble recombinant PrP and Dpl proteins, the carboxy-terminus GPI sequence was replaced by the biotin acceptor peptide (BAP). The 15-amino acid BAP sequence (LHHILDAQKMVWNHR) is substrate for BirA-dependent biotinylation [1]. Vectors containing the entire open reading frame encoding mouse PrP and Dpl were used as template to amplify tagged PrP- and Dpl-BAP constructs by PCR using the following forward primers: 5'TACAAACATGGCGAACTTGGCTAC3'; 5'CGCCACCATGAAGAACCGGCT3' and reverse primers 5'TTATTAACGATGATTCCACACCATTTTTTGAGCGTCCAGAATATGATGCAGGCTGCTGGATCTTCTCCCGTC3';5'TTATTAACGATGATTCCACACCATTTTTTGAGCGTCCAGAATATGATGCAGAGCTCCCCTTCCAGCCAGAA3' for PrP- and Dpl-BAP respectively. Primers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). PCR products were cloned first into pTarget vector (Promega, Madison, WI) and then sub-cloned into pS2neo in the BamH1-Sal1 restriction sites. The integrity of the constructs was checked by sequence analysis.

Construct transfections into drosophila S2 cell line were performed using the calcium phosphate procedure (Invitrogen). Stable transfected cells were then selected in the presence of G418 (1.5mg/ml) for four weeks. Since pS2neo plasmid contains a metallothionein promoter, expression of PrP- or Dpl-BAP was induced by incubating cells for four days in the presence of 600µM CuSO₄. BirA enzyme was produced and purified as described previously [2].

1 **Schatz, P. J.**, Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 1993. **11**: 1138-1143.

2 **O'Callaghan C, A., Byford, M. F., Wyer, J. R., Willcox, B. E., Jakobsen, B. K., McMichael, A. J. and Bell, J. I.**, BirA enzyme: production and application in the study of membrane receptor-ligand interactions by site-specific biotinylation. *Anal Biochem* 1999. **266**: 9-15.

- Vers l'identification de(s) récepteur(s) de la PrP

La suite directe de ce travail consistait à identifier le (ou les) récepteur(s) que nous avons détecté(s) à la surface des cellules immunes grâce à l'utilisation de tétramères fluorescents. Dans ce but, plusieurs démarches ont été entreprises en parallèle. La première d'entre elles a été de tenter d'identifier un récepteur putatif de la PrP par analogie avec le profil d'expression que nous avons déterminé sur les splénocytes. Les sites de liaison détectés sur les lymphocytes B, les granulocytes, les macrophages et les cellules dendritiques pouvaient refléter la présence d'un seul et unique récepteur plus ou moins exprimé sur l'ensemble de ces cellules. Cette hypothèse de travail était une hypothèse envisageable au vu de l'expression étendue de la PrP elle-même. Parmi les protéines candidates, le récepteur du complément CR2/CR1 (ou CD21/CD35) nous est apparu comme une piste intéressante. En effet, son profil d'expression correspondait relativement bien à celui du site de liaison du tétramère PrP avec notamment une forte expression dans les cellules B, les macrophages et les granulocytes et une absence d'expression dans les lymphocytes T. Chez la souris, CD21 et CD35 sont deux protéines transmembranaires issues de l'épissage alternatif du gène *Cr2* et jouent un rôle clé dans les mécanismes de l'immunité innée et dans la régulation de l'activité des cellules B (pour revue Carroll, 1998; Chen et al., 2000). Les ligands principaux de ces récepteurs sont des composantes solubles du système du complément. Il a également été montré que CR2 pouvait servir de portail d'entrée au virus d'Epstein-Barr (Fingerroth et al., 1984). De plus, en rapport avec les EST, il a été décrit que l'absence de ces récepteurs pouvait altérer l'accumulation de la PrP^{sc} dans la rate (Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2001). Afin de vérifier cette hypothèse, en collaboration avec le Dr. Andy Knight, nous avons obtenu la lignée de cellules B CH27 qui n'expriment pas le récepteur CR2/CR1 de façon endogène (CH27 WT) (Haughton et al., 1986), ainsi qu'un mutant de cette lignée transfecté par le gène *Cr2* (CH27-CR2) (Barrault and Knight, 2004). Nous avons procédé à un marquage avec le tétramère fluorescent de PrP sur les lignées CH27 et CH27-CR2 en parallèle mais n'avons constaté aucune différence dans l'intensité du marquage entre les deux lignées. Les deux lignées présentent donc un site de liaison pour la PrP, distinct du récepteur CR1/CR2.

Une autre possibilité concernant les sites de liaison détectés par le tétramère PrP était l'existence de récepteurs distincts selon le type cellulaire considéré. Nous nous sommes intéressés en particulier aux cellules T qui présentent une augmentation significative de l'expression de PrP^c en cas d'activation et dont l'expression à l'état basal est négligeable. En revanche, un site de liaison à la PrP est présent à la surface de ces cellules à l'état basal mais son expression n'est pas augmentée en cas d'activation. Nous avons alors tenté d'établir un parallèle entre l'augmentation de l'expression de FasL (FasLigand) et de la PrP^c en cas d'activation. FasL et son récepteur Fas

constituent l'une des voies d'induction de l'apoptose. La fixation de FasL sur le récepteur de mort Fas induit son oligomérisation et le déclenchement d'une cascade moléculaire qui aboutit à l'activation de caspases effectrices. Alors que le récepteur Fas est exprimé de façon constitutive par de nombreux types cellulaires différents, FasL est une protéine inductible dont l'expression tissulaire est restreinte aux cellules natural killer (NK) et aux lymphocytes activés. Cette interaction entre Fas et son ligand joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, alors que Fas est exprimé de façon constitutive par les lymphocytes T, FasL ne sera exprimé par ces lymphocytes qu'après leur activation par l'antigène. L'interaction entre FasL et le récepteur Fas présent sur les lymphocytes T activés aboutit à une régulation négative de ces populations par apoptose. Nous avons alors émis l'hypothèse que dans les cellules T, le ligand de la PrPc pouvait être Fas. Afin d'explorer cette hypothèse, en collaboration avec le Dr. Anne-Odile Huebert, nous avons testé par cytométrie de flux la liaison du tétramère PrP sur les lignées de lymphocytes T, W4 et AURE 17. Les deux lignées ont été transfectées pour le gène encodant Fas et expriment des quantités différentes du récepteur Fas. Nous avons alors montré que la liaison du tétramère PrP sur la lignée AURE17, lignée exprimant FAS en plus grande quantité, était d'intensité légèrement supérieure à la liaison détectée sur les cellules W4. Afin de poursuivre cette piste, nous avons utilisé des souris *lpr/lpr* qui présente une lymphoprolifération suite à l'inactivation du récepteur d'apoptose Fas (mutation *lpr*) et constitue un modèle murin spontané de maladies auto-immunes systémiques. Nous avons procédé au marquage des splénocytes de la souris *lpr/lpr* avec le tétramères PrP et n'avons constaté aucune différence après analyse des différentes sous-populations, en comparaison avec une souris sauvage.

La dernière tentative d'identification a été effectuée par approche protéomique sur la lignée de cellules A20, qui présente l'avantage d'être un système homogène, uniformément marqué par le tétramère PrP. Brièvement, la PrP purifiée a été immunoprécipitée sur des billes de streptavidine et ensuite incubée avec une préparation membranaire de A20. Après plusieurs lavages extensifs, la PrP ainsi que les protéines immunoprécipitées ont été éluées en tampon de charge et déposées sur gel SDS-PAGE. Les protéines d'intérêts après coloration du gel, ont ensuite été séquencées par spectrométrie de masse. Aucune protéine membranaire spécifiquement immunoprécipitée par la PrP n'a pu être révélée.

- Validation de l'outil tétramérique dans le système nerveux

La plupart des études ayant pour but la caractérisation de récepteurs de la PrP ont été réalisées dans des cellules du système nerveux. Nous avons donc utilisé le tétramère fluorescent de PrP afin de confirmer la présence de sites de liaison dans différentes lignées du système nerveux par cytométrie de flux et par microscopie confocale. Nous avons montré la présence de sites de liaison sur la lignée de neuroblastomes N2a et sur la lignée neuronale TSM (**Fig. 22, A**). Ces liaisons sont fortement inhibées après préincubation du tétramère avec l'anticorps anti-PrP SAF83, démontrant ainsi la spécificité de la liaison. La liaison du tétramère PrP sur les cellules TSM est sensible à l'héparine et au dextran sulfate, contrairement aux cellules N2a. L'héparine induit un déplacement de la liaison de façon dose-dépendante sur les TSM. Il est intéressant de remarquer que les neuroblastomes sont issus du système nerveux périphérique tandis que les TSM sont issus de neurones corticaux et donc du SNC. Il se pourrait donc que les récepteurs présents à la surface de ces deux types cellulaires soient de nature différente. Enfin, nous avons également procédé au marquage de neurones embryonnaires, de microglie et d'astrocytes en culture primaires (**Fig. 22, B**). Ces trois populations présentent toutes un site de liaison à la PrP, toutefois ce sont les neurones embryonnaires qui expriment les quantités les plus importantes de ligands. La PrPc endogène n'intervient pas dans cette interaction puisque les marquages effectués sur des neurones issus de souris sauvage et sur des neurones issus de souris *prnp*^{0/0} présentent des profils superposables. Les expériences de microscopie confocale indiquent un marquage intense au niveau des corps cellulaires (**Fig. 22, C**).

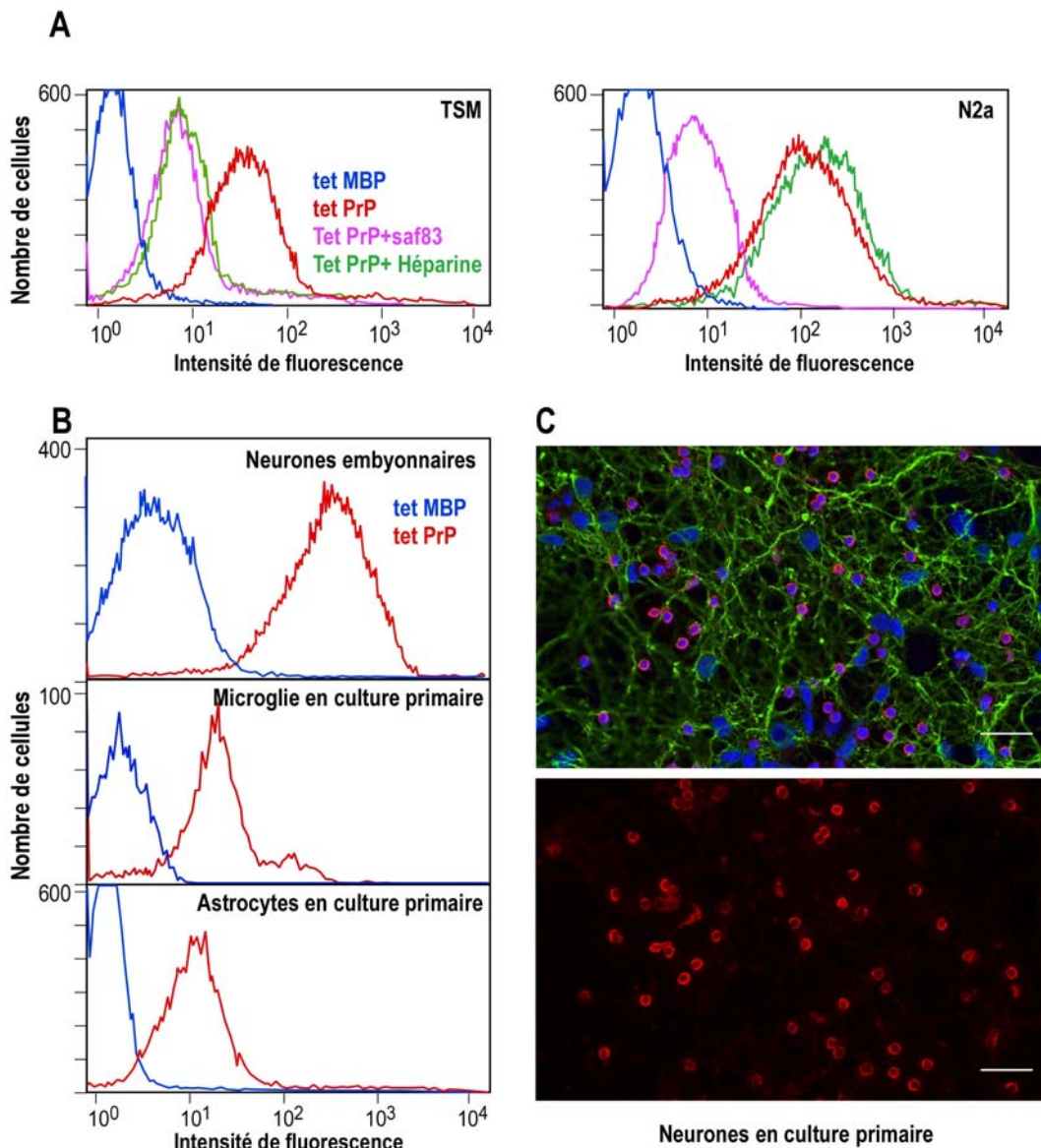


Figure 22 : Expression de sites de liaisons pour la PrP à la surface de différentes populations du système nerveux. (A) Analyse en cytométrie de flux des cellules TSM et N2a, ainsi que des neurones embryonnaires et des cellules microgliales et astrocytaires en culture primaire (B) marquées par le tétramère fluorescent de PrP ou par le tétramère MBP, utilisé comme contrôle. Pour tous les types cellulaires, 1.10^6 de cellules ont été marquées avec 8,5 nM de tétramères PrP (ligne rouge) ou MBP (ligne bleue) fluorescents (couplage à la phycoérythrine PE) en PBS-BSA0,1%. La formation des tétramères est décrite dans la section matériel et méthodes de la publication “PrP and Doppel expression and binding sites in mouse spleen” présentée précédemment. Alternativement, lors des marquages des cellules TSM et N2a, le tétramère PrP a été incubé avec les cellules en présence de l’anticorps monoclonal anti-PrP SAF83 (ligne rose) ou d’héparine à une concentration finale de 4 mg/mL (vert). Les neurones embryonnaires, les cellules microgliales et les astrocytes en culture primaire ont été préparés selon les protocoles décrits dans les publications suivantes : Dirikoc et al., 2007 et Marella et al. 2004. (C) Analyse en microscopie confocale de neurones en culture primaire co-marqués par le tétramère PrP-PE (rouge), un anticorps anti- β tubuline (vert) et par le colorant DAPI (bleu) permettant de visualiser les noyaux. Brièvement, les neurones embryonnaires cultivés sur lamelles de 19mm de diamètre, sont différenciés pendant 7 jours en présence de B27. Dans un premier temps, les neurones sont incubés avec 8,5nM de tétramère PrP-PE en PBS-SVF 0,5% (tampon de marquage), puis fixés en PBS-PAF 2% après plusieurs lavages. Après perméabilisation en PBS-Triton 0,1% , les neurones sont marqués avec l’anticorps monoclonal anti- β tubuline (Becton Dickinson, clone 5H1, concentration 2,5 μ g/mL) puis avec l’anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au FITC (Molecular probes, référence A-11001, concentration finale 5 μ g/mL). Le colorant DAPI est rajouté dans le liquide de montage (Mowiol). Le panneau supérieur représente le triple marquage, tandis que le panneau inférieur correspond à l’observation de la même image dans le canal PE exclusivement. La barre d’échelle correspond à 20 μ m.

III/La PrPsc

A/ Caractéristiques biochimiques

La PrPsc est l'isoforme pathologique et pathogène de la PrPc et elle est retrouvée exclusivement chez les individus atteints d'EST. La PrPsc et la PrPc présentent une séquence primaire identique mais de grandes différences structurales et biochimiques (**tableau 3**). Premièrement, la PrPsc est partiellement résistante à l'action de la protéinase K (PK) alors que la PrPc est totalement dégradée par cette protéase. La digestion partielle de la PrPsc par la PK entraîne un changement du profil électrophorétique. Cette réaction enzymatique est couramment utilisée pour distinguer la PrPsc de son isoforme cellulaire sur Western-blot et elle est également utilisée dans le diagnostic *post mortem* des EST.

	PrPc	PrPsc
Isoforme	normale	pathologique
Hélices α	42%	30%
Feuillets β	3%	42%
Sensibilité à la PK	sensible	Partiellement résistante
Solubilité dans les détergents	oui	non
Structure	monomérique	Agrégat
Temps de demi-vie	3-6 heures	> 24 heures
Clivage par PI-PLC	oui	non

Tableau 3 : Comparaison des propriétés physico-chimiques de la PrPc et de la PrPsc

Deuxièmement, la PrPsc présente une insolubilité partielle dans les détergents non ioniques (Meyer et al., 1986) et une forte propension à s'agréger. En effet, après ultracentrifugation d'un lysat de cellules ou de tissus infectés, la PrPsc peut être sédimentée (Caughey et al., 1991). Cette capacité intrinsèque de la PrPsc à s'agréger peut être rattachée à sa résistance à la PK. En effet, agrégation et résistance à la digestion diminuent parallèlement après dénaturation de la protéine au thiocyanate de guanidium (Caughey et al., 1997) ou après ajout de 0,3% de sodium dodécyl sulfate (SDS) .

L'insolubilité de la PrPsc a sérieusement compromis l'analyse de sa structure tridimensionnelle par RMN (Caughey and Raymond, 1991). Néanmoins, les analyses en spectrométrie infrarouge et de dichroïsme circulaire ont permis de montrer des différences structurales essentielles. Alors que la PrPc contient majoritairement des hélices α , la PrPsc est fortement enrichie en feuillets β : 43% dans la PrPsc *versus* 3% dans la PrPc (**Tableau 3**) (Caughey et al., 1991b; Pan et al., 1993). Il est tout de même important de souligner que ces

analyses ont été effectuées sur des fractions enrichies en PrP^{sc} mais jamais pures à homogénéité. Ce changement de conformation, ou « conversion » est considéré comme un élément essentiel de la propagation des prions.

B/ Nature de l'agent infectieux

1) L'hypothèse du tout protéique (ou « the protein-only hypothesis »)

L'hypothèse du tout protéique postule que la conformation anormale de la PrP est le principal, voire l'unique constituant de l'agent infectieux (Prusiner, 1982). Toujours selon cette hypothèse, la réaction de conversion est un processus cyclique et tous les intervenants de cette réaction sont de nature exclusivement protéique (Prusiner, 1998).

Une étape cruciale dans la compréhension de la nature de ce nouvel agent infectieux a été franchie suite à l'isolement de la PrP^{res} dans le matériel infectieux (Bolton et al., 1982). A ce stade, il est important de préciser la différence entre les termes PrP^{sc} et PrP^{res}. Le terme PrP^{sc} est un terme générique qui désigne la protéine pathologique associée aux EST et historiquement associée à la **Scrapie**. Le terme PrP^{res} fait référence à l'état de résistance à la dégradation par la PK de l'isoforme conformationnelle de la PrP^c et permet de la désigner sans pour autant l'associer à la notion d'infectiosité. La PrP^{res} est ainsi systématiquement co-purifiée avec l'infectiosité, et la concentration de la protéine est proportionnelle au titre infectieux (Gabizon et al., 1988). La purification de la protéine a permis l'identification du gène codant la PrP, le gène *prnp* (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985) et la PrP^c, qui est le produit de ce gène. Il est ainsi clairement apparu que la PrP pouvait exister sous deux formes alternatives : la protéine cellulaire normale, la PrP^c et son isoforme pathologique, PrP^{sc}. En outre, l'infectiosité est réduite de façon significative par les agents capables de détruire les structures protéiques et également par des anticorps dirigés contre la PrP (Gabizon et al., 1988).

Un argument majeur en soutien à l'hypothèse prion a été apporté par le groupe de Charles Weissmann, qui a montré que les souris dépourvues du gène *prnp* étaient résistantes à l'infection par la Scrapie, qu'elles ne développaient aucun des signes de la tremblante et qu'elles ne permettaient pas la propagation de la maladie (Bueller et al., 1993). Toutefois, si cette découverte capitale confirme les prédictions de l'hypothèse du tout protéique, elle ne constitue pas une preuve de l'infectiosité de la PrP^{sc} et démontre seulement l'absolue nécessité de la présence de la PrP pour l'infection.

Les études génétiques ont montré que la plupart des cas familiaux d'EST sont liés à des mutations du gène *PRNP* et que ces maladies peuvent aussi être propagées de manière infectieuse (Collinge, 2001). Ces résultats démontrent également l'existence d'un lien étroit entre la PrP et la

pathogénèse de la maladie. De façon intéressante, une maladie de type EST a été provoquée chez des souris surexprimant un gène de la PrP comportant des mutations ponctuelles liées au syndrome GSS (Hsiao et al., 1990). Ces animaux ont spontanément développé des dysfonctionnements neurologiques, une dégénérescence spongiforme et une gliose astrocytaire. L'étude initiale indiquait que la maladie pouvait être transmise aux animaux exprimant le gène mutant mais ces résultats n'ont pu être reproduits par un autre groupe et restent soumis à la controverse (Barron and Manson, 2003).

La démonstration de la réplication de la PrPres dans un système acellulaire a permis de confirmer un des postulats de l'hypothèse prion : la PrPres nouvellement produite est capable d'induire le changement de conformation afin de maintenir la propagation. Le système original a été développé par Caughey et ses collaborateurs, et dans ce système, le mélange de PrPc purifiée avec de la PrPsc purifiée, dans des conditions non physiologiques, conduit à la formation de PrPres, toutefois avec un faible rendement (Kocisko et al., 1994). Plus récemment, le groupe de Claudio Soto a développé un nouveau système de conversion *in vitro* afin de pouvoir convertir de grandes quantités de PrPc en utilisant des faibles quantités de PrPres (Saborio et al., 2001). Ce système, appelé PMCA (pour « **P**rotein **M**isfolding **C**yclic **A**mplification »), consiste à mélanger *in vitro* de faibles quantités de PrPres avec de la PrPc non purifiée en excès dans des conditions spécifiques puis à effectuer plusieurs cycles de sonication/conversion au cours desquels a lieu l'élongation la PrPres (Fig.23).

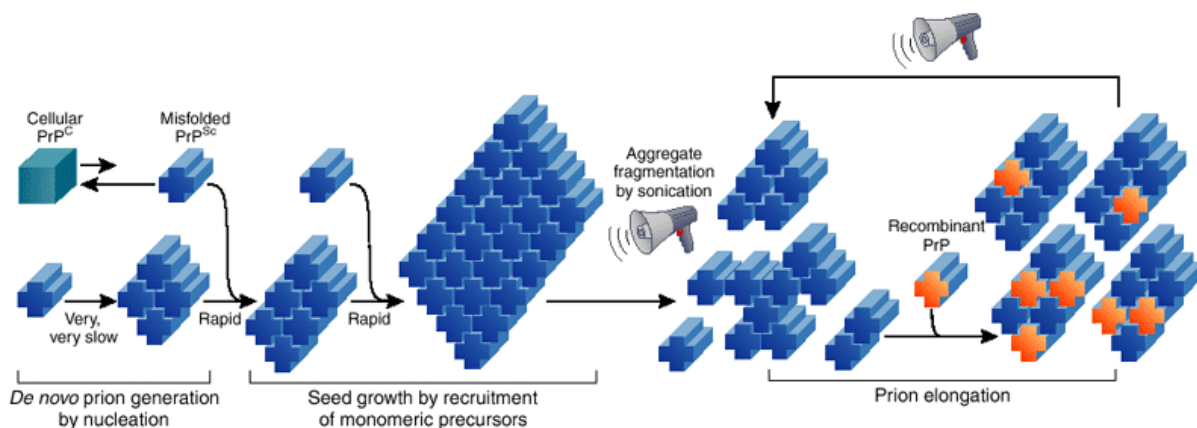


Figure 23 : Réplication de la PrPres grâce au système PMCA

La réaction de PMCA consiste en une étape de sonication, qui permet de rompre les agrégats de PrPsc hautement structurés et est suivie d'une étape d'élongation où la PrPc recombinante est rajouté dans le milieu réactionnel. Les agrégats nouvellement formés sont ensuite soumis à des cycles répétés de sonication et d'élongation. D'après Aguzzi et al., 2007.

Longtemps, il a été affirmé que l'argument le plus solide que l'on puisse apporter en faveur de l'hypothèse du tout protéique serait la génération de l'infectiosité dans le tube à essai. Cette expérience, considérée par beaucoup de scientifiques comme la preuve finale de l'hypothèse

prion, vient d'être réalisée. L'amélioration du rendement de la technique PMCA a permis de générer *de novo* de la PrPres aux propriétés infectieuses (Aguzzi, 2007; Castilla et al., 2005). Cette avancée cruciale apporte la preuve qu'une protéine, la PrPsc dans les cas des EST, peut être le support d'information transmissible et être source d'infectiosité.

Malgré cet argument majeur en faveur de l'hypothèse du tout protéique, certaines incertitudes persistent. La présence et la quantité de PrPsc sont, dans la majorité des cas, corrélées avec l'infectiosité mais il existe cependant des exceptions. Certains auteurs ont en effet rapporté des cas où l'infectiosité était propagée en l'absence de PrPsc (Lasmezas et al., 1997). D'autres travaux font état d'échantillons de tissus riches en PrPsc mais ne contenant que peu ou pas d'infectiosité (Hill et al., 2000).

L'existence de souches multiples, caractérisées par des périodes d'incubation différentes et des profils lésionnels et cliniques spécifiques, pose également un vrai dilemme (Chesebro, 1998). Les différentes souches rencontrées dans les autres maladies infectieuses résultent généralement des mutations ou des polymorphismes du matériel génétique de l'agent infectieux. Pour réconcilier l'existence des souches avec un agent infectieux exclusivement protéique, il a été proposé que la PrPsc puisse présenter de légères différences de conformation et dans son état d'agrégation en fonction des différentes souches de prion. Les caractéristiques de la PrPsc seraient fidèlement conservées lors de la réplication de la PrPc de l'hôte (Prusiner, 1998). En accord avec cet argument, diverses études ont montré que la PrPsc isolée à partir de souches différentes, possédait des structures secondaires distinctes (Caughey et al., 1998a; Safar et al., 1998), et que ces dernières pouvaient être fidèlement transmises à la PrPc *in vitro* (Bessen et al., 1995). Cependant, le lien de causalité entre les différences de conformation de la PrPsc et la multiplicité des souches n'a pas été clairement établi. En effet, ces différentes conformations de la PrPsc pourraient n'être qu'une manifestation supplémentaire du phénomène de souches.

Bien qu'aucun acide nucléique spécifique des préparations infectieuses de PrPsc n'ait été identifié, plusieurs groupes ont rapporté la présence d'acides nucléiques dans des échantillons de matériel infectieux (Chesebro, 1998; Narang, 2002). Une publication récente mentionne l'existence de particules virales de 25nm de diamètre, dans des cellules chroniquement infectées, mais cette étude, principalement basée sur des observations en microscopie électronique, nécessitera confirmation. Il a également été montré la PrPsc interagit avec une haute affinité avec des acides nucléiques, en particulier avec les ARN (Weiss et al., 1997), et aussi que l'ARN pouvait aider à catalyser la conversion de la PrPc en PrPres *in vitro* (Deleault et al., 2003). Si l'on envisage ces ARN comme des co-facteurs de la réaction de conversion, la liaison de la PrPsc aux molécules d'ARN est en contradiction avec l'hypothèse du tout protéique mais pas

nécessairement avec la notion d'une protéine infectieuse. L'existence d'interactions entre des acides nucléiques et la PrP, imposant des changements conformationnels à la protéine, permettrait de mieux concevoir le phénomène de souches.

2) Les modèles de conversion proposés

Selon l'hypothèse du tout protéique, le problème au cœur de la pathologie des maladies à prions est une question de structure protéique et de changement de conformation. Si les bases moléculaires du mécanisme de conversion de la PrP ne sont pas complètement élucidées, plusieurs modèles ont tout de même été proposés.

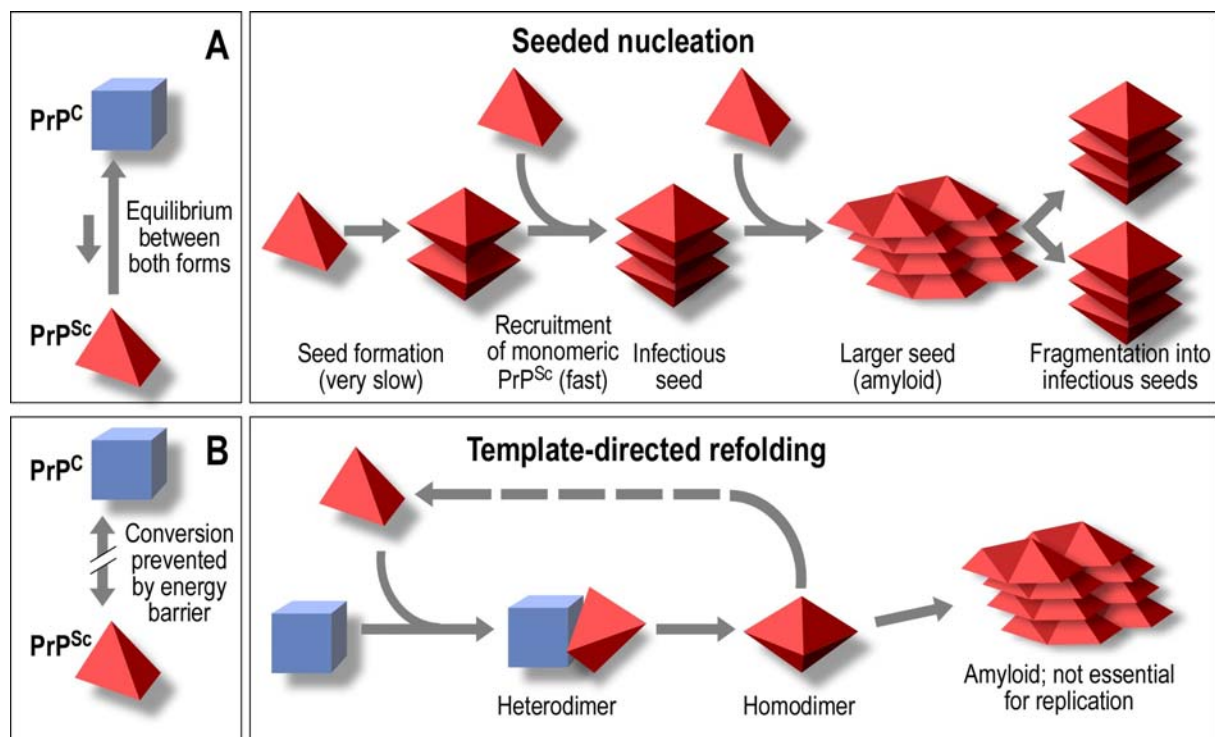


Figure 24 : Modèles du changement conformationnel de la PrPc en PrPsc : modèle de nucléation polymérisation et modèle auto-catalytique

(A) Selon le modèle de nucléation-polymérisation ("seeded nucleation"), la PrPc et la PrPsc sont dans un état d'équilibre thermodynamique réversible. La PrPsc monomérique ne peut être recrutée et agrégée en amyloïdes que si une graine de nucléation hautement ordonnée a été préalablement formée. Au sein de la graine de nucléation, la PrPsc est stabilisée. La fragmentation de la PrPsc augmente le nombre de graine de nucléation et entraîne la réplication de l'agent infectieux. (B) Le modèle autocatalytique ("template-directed") postule que l'interaction entre une PrPsc exogène et la PrPc endogène provoque le changement de conformation de cette dernière et sa conversion en PrPsc. L'existence d'une barrière énergétique très importante entre ces deux isoformes empêcherait la conversion spontanée de la PrPc en PrPsc. *D'après Aguzzi and Polymenidou, 2004.*

Selon le modèle dit de nucléation-polymérisation (ou « seeded-nucleation »), la PrPsc monomérique existe à l'état d'équilibre avec la PrPc (Jarrett and Lansbury, 1993; Kocisko et al., 1994) et cet équilibre est largement en faveur de la PrPc d'un point de vue thermodynamique (Fig.24 A). Dans ce scénario, la PrPsc monomérique représenterait donc une isoforme mineure

et transitoire et ne serait stabilisée qu'en cas de formation d'agrégats ordonnés. Les oligomères stabilisés agissent comme des noyaux permettant de recruter la PrPsc monomérique au sein des polymères. Ce processus est bien plus rapide que l'étape de formation du noyau initial de PrPsc. Dans le cadre de cette théorie, la PrPsc, sous sa forme monomérique, ne serait pas infectieuse puisqu'elle serait présente de façon ubiquitaire. Les auteurs stipulent que l'agent infectieux consisterait en un agrégat d'ordre supérieur des molécules de PrPsc. L'état agrégé serait une propriété intrinsèque de l'infectiosité : la PrPsc monomérique serait « inoffensive » mais elle serait susceptible d'être incorporée dans les agrégats de PrPsc. Par ailleurs, ce modèle intègre bien la situation rencontrée lors des formes génétiques des EST. La mutation de la PrPc entraînerait un déplacement de l'équilibre, en favorisant la formation de PrPsc.

Le modèle auto-catalytique (ou « template-directed refolding ») stipule que la PrPsc contient les instructions de repliement nécessaires au changement de conformation de la PrPc suite à l'interaction des deux isoformes (**Fig.24 B**). Le processus de conversion implique d'abord la formation d'une unité hétérodimérique PrPc-PrPsc qui initierait le changement conformationnel de la PrPc, et qui générerait une unité homodimérique de PrPsc. Cette dernière interagirait ensuite avec d'autres dimères de PrPsc, ayant pour conséquence de former des agrégats de plus en plus grands. Dans ce modèle, l'unité infectieuse est le monomère de PrPsc, et la formation de plus grands agrégats n'est pas nécessaire à la réplication des prions.

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

Soto et coll. ont récemment proposé un nouveau modèle de réplication, nommé modèle de nucléation assistée (Abid and Soto, 2006). Dans ce modèle, l'événement principal serait la formation d'un état structural intermédiaire (PrP*) lors de l'interaction de la PrPc avec le facteur de conversion (**Fig.25**). La conformation intermédiaire préparerait la PrP à subir les changements structuraux profonds menant à la formation de PrPsc. L'existence potentielle d'états intermédiaires a été le sujet des nombreuses études (Apetri and Surewicz, 2002). Des états intermédiaires en solution ont été décrits en présence d'ions métalliques ou en condition de pH non-physiologique (Glockshuber, 2001). Cependant, la pertinence physiologique de ces intermédiaires reste à établir.

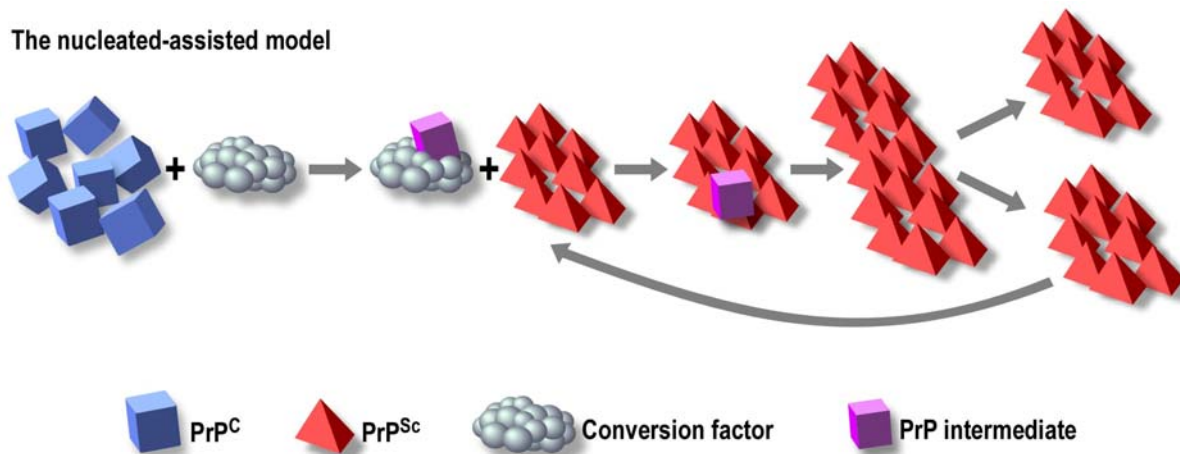


Figure 25 : Modèle de nucléation assisté .

Selon ce modèle la PrP^{Sc} n'existe jamais à l'état monomérique et requiert deux réarrangements structuraux successifs afin de former les oligomères de PrP^{Sc}. La première étape de ce modèle est la formation d'un intermédiaire partiellement non structuré (PrP*) après interaction avec un facteur de conversion endogène. Ce changement structural entraîne l'exposition de séquences hydrophobes au solvant, facilitant ainsi l'interaction avec une autre molécule de PrP*. Cette interaction entraîne des changements structuraux supplémentaires permettant à la protéine d'adopter une conformation en feuillet beta. Si PrP* est présente en quantité suffisante, il est possible de former un oligomère stable contenant un nombre minimal de molécules de la protéine. Cet oligomère stable correspond à la PrP^{Sc}, qui peut à partir de ce moment se comporter comme une molécule infectieuse en recrutant PrP* et en catalysant la conversion. *D'après Soto et al., 2006.*

Longtemps, il a été admis que les mutations au sein de la séquence de la PrP^C pouvaient déstabiliser sa structure globale et donc faciliter sa conversion. La protéine mutante pourrait être moins structurée que la PrP^C sauvage et donc être plus encline à adopter des conformations multiples, dont une d'entre elles pourrait représenter une isoforme « intermédiaire ». L'étape suivante dans le modèle de nucléation assistée serait les réarrangements structuraux subséquents de l'intermédiaire et sa stabilisation par des interactions inter-moléculaires avec d'autres molécules de PrP^{Sc}. La formation de l'oligomère stable minimum serait l'étape limitante pour la formation *de novo* de PrP^{Sc}. Cependant, dans les formes infectieuses d'EST, ce serait l'agent infectieux, correspondant à un oligomère de PrP^{Sc}, qui catalyserait les changements conformationnels de PrP* en l'incorporant dans l'agrégat croissant de PrP^{Sc}. Dans ce modèle il n'y a aucun équilibre entre PrP^C et PrP^{Sc}, et cette dernière isoforme n'existerait qu'en tant qu'oligomère ou polymère de taille supérieure.

C/Modèles transgéniques pour l'étude des EST

1) Relation entre temps d'incubation et expression de la PrPc

Il existe une relation assez étroite entre l'expression de la PrPc et le développement des EST. L'exemple le plus flagrant est le phénotype de résistance des souris *prnp*^{0/0} à la Scrapie. Les souris sauvages inoculées intra-cérébralement avec une souche adaptée de Scrapie murine présentent des signes cliniques au bout de 160 jours et meurent une dizaine de jours plus tard (**Fig.26**). A l'opposé, les souris *prnp*^{0/0} ne présentent aucun symptôme même après un délai de 2 ans post-inoculation, ni aucune pathologie spécifique de la Scrapie à 57 semaines post-infection (Bueler et al., 1993). De plus, chez ces souris transgéniques, aucune accumulation de PrPsc n'a pu être détectée que soit dans le cerveau ou dans la rate. Chez la souris sauvage, les taux d'accumulation de PrPres dans le cerveau ou dans la rate atteignent 8,6 et 6,9 log LD₅₀ unités/mL respectivement à 20 semaines post-infection. Enfin, les souris dépourvues de PrP ne permettent pas la propagation des prions, c'est-à-dire que si le cerveau de ces souris infectées, est réduit en broyat et inoculé à une souris sauvage, cette dernière ne développera aucun signe de Scrapie (Sailer et al., 1994). Le cas des souris hémizygotes *prnp*^{0/+} constitue un cas intéressant. Ces souris qui portent un seul allèle de *prnp* présentent une période d'incubation prolongée en comparaison avec la souris *prnp*^{+/+}, 290 et 170 jours respectivement (**Fig.26 B**). À 140 jours post-inoculation, comme les souris sauvages, les souris hémizygotes accumulent des niveaux élevés d'infectiosité et de PrPsc, mais elles survivent ensuite pendant encore au moins 140 jours sans afficher de symptômes cliniques graves (Bueler et al., 1994).

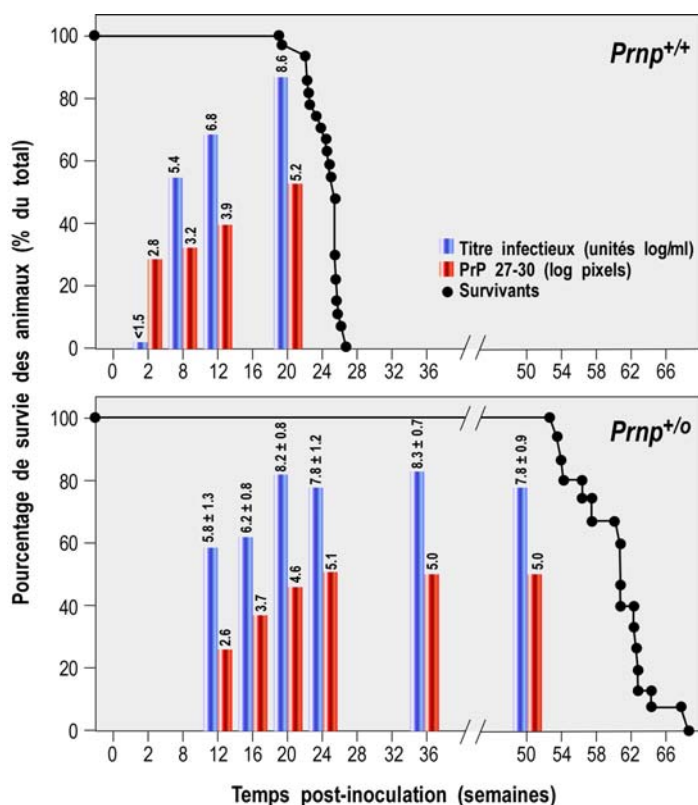


Figure 26 : Corrélation entre la survie, les titres infectieux et les quantités de PrPsc dans les cerveaux des souris inoculées avec la Scrapie

(A) Souris sauvages (B) et souris *Prnp*^{0/+} à différents temps post-inoculation par la Scrapie. Bien que les deux types de souris accumulent de façon similaire des titres infectieux et de la PrPsc à 20 semaines post-infection, la souris sauvage succombe dans les 8 semaines suivantes alors que la souris *Prnp*^{0/+} survie pendant encore au moins 30 semaines sans développer de signes cliniques. D'après Weissmann and Flechsig, 2003.

Si les souris *prnp*^{0/0} sont résistantes à la Scrapie, la réintroduction de transgènes PrP permet de restaurer leur susceptibilité à la Scrapie. Ceci indique que le phénotype de résistance à la Scrapie des souris *prnp*^{0/0} est effectivement lié à l'absence de PrP. Parmi les différents modèles transgéniques de la PrP, les souris *tga20/tga20* constituent un modèle de surexpression de la PrP. Ces souris ont été construites sur fond *prnp*^{0/0}, possèdent environ 60 copies du mini gène *prnp* (gène délété du grand intron) et expriment un taux de PrPc 5 à 10 fois supérieur à celui d'une souris sauvage, avec un profil d'expression tissulaire bien conservé (Fischer et al., 1996). Elles présentent un temps d'incubation exceptionnellement court après infection avec la souche de prions RML : de 61±3 jours au lieu de 149±12 jours chez une souris contrôle (**Fig.27**). Ces observations indiquent clairement qu'il existe une corrélation inverse entre le taux d'expression de la PrP et le temps d'incubation de la maladie.

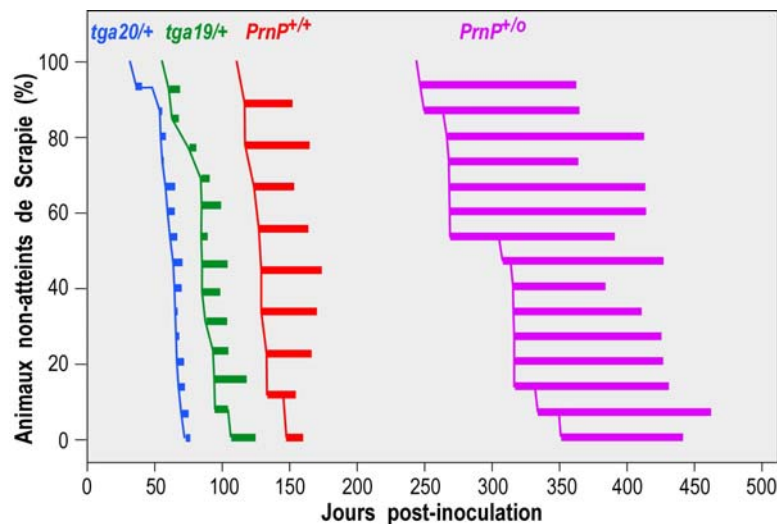


Figure 27 : Temps d'incubation après infection par la souche de Scrapie RML de souris exprimant des taux de PrP variables. Les *prnp*^{0/+} expriment environ la moitié du taux de PrPc de la souris sauvage. Les *tga19/+* et *tga20/+* expriment entre 3-4 et 6-7 fois le taux de PrPc de la souris sauvage, respectivement. Les barres horizontales indiquent pour chacune des souris le temps écoulé entre le diagnostic et le stade terminal de la maladie. D'après Fischer et al., 1996.

Il existe un lien entre l'homologie de la séquence de la PrP et la barrière d'espèce. L'introduction chez la souris, de transgènes de la PrP contenant tout ou partie de la séquence de l'espèce donneuse permet de surmonter dans certains cas la barrière d'espèce. Ainsi, les souris *prnp*^{+/+} chez lesquelles ont été introduits des transgènes de PrP de hamster seront désormais autant susceptibles aux prions dérivés de la souris qu'à ceux du hamster (Prusiner et al., 1990; Scott et al., 1989). Les souris *prnp*^{0/0} contenant des transgènes PrP de hamster sont susceptibles aux prions de hamster mais pas aux prions dérivés de la souris. Dans ce dernier cas, il est intéressant de souligner que la réintroduction d'un allèle PrP de souris entraîne une diminution de la susceptibilité aux prions de hamster (Bueller et al., 1993). Les souris *prnp*^{0/0} contenant des transgènes bovins de la PrP sont aussi susceptibles à l'agent de l'ESB qu'à celui du vMCJ humain

(Scott et al., 1999), ce qui a notamment permis de prouver l'origine commune de l'ESB et du vMCJ. Ces souris « bovinisées » sont également sensibles aux prions de la Scrapie du mouton, ce qui suggère une origine commune entre la Scrapie et l'ESB. De la même façon, les souris *prnp*^{0/0} exprimant des transgènes PrP humains deviennent susceptibles à une infection par des prions humains provenant d'individus atteints de MCJ (Telling et al., 1994).

2) Modèles transgéniques des formes familiales des EST

Plus d'une vingtaine de mutations associées aux formes familiales des EST ont été identifiées dans le gène *PRNP*. Il a été proposé que ces mutations puissent induire une instabilité de la PrP^c qui pourrait être spontanément convertie en son isoforme anormale, la PrP^{sc}. Les études menées sur la stabilité thermo-dynamique de la PrP comportant des mutations du domaine C-terminal ne soutiennent pas le concept d'une déstabilisation de la PrP^c lié aux mutations (Liemann and Glockshuber, 1999; Swietnicki et al., 1998). Les souris transgéniques exprimant des mutants de la PrP associés aux formes familiales humaines n'ont pas développé spontanément de maladie transmissible. Les souris transgéniques surexprimant la PrP^{P101L} (l'équivalent de la mutation humaine PrP^{P102L} associé au syndrome GSS) constitue une exception possible. En effet, ces souris développent une neurodégénérescence vers l'âge de 140 jours, mais les quantités de PrP^{sc} détectées étaient très faibles (Hsiao et al., 1990). La maladie n'est pas transmissible aux souris de type sauvage, mais seulement aux souris transgéniques exprimant une PrP contenant la même mutation mais à des taux plus bas que dans le modèle d'origine (Hsiao et al., 1994). La neurodégénérescence ne s'est développée qu'à un stade tardif de la vie. Il a été suggéré que la différence d'acide aminé constitue une barrière pour la transmission à la souris sauvage. Cependant, le GSS humain lié au P102L peut être transmis à des souris sauvages (Tateishi et al., 1996). Les souris exprimant les PrP T183A ou E199K (l'équivalent des mutations liées aux formes familiales de MCJ) sur fond *prnp*^{0/0} n'ont développé aucun signe pathologique (DeArmond et al., 1997; Telling et al., 1996a). Enfin, l'expression d'une PrP murine contenant neuf insertions des séquences octapeptidiques répétées associées également aux fMCJ entraîne une dégénérescence cérébelleuse progressive et une myopathie (Chiesa et al., 2001). Néanmoins, dans la mesure où cette maladie n'est pas transmissible, elle correspond plus à une « protéinopathie » qu'à une maladie à prions. Ainsi, il n'existe pas de modèles satisfaisants des formes familiales d'EST chez la souris.

3) Délimitation des séquences nécessaires à la réplication

Le traitement des préparations de PrP^{sc} avec la protéinase K entraîne le clivage d'environ 90 résidus en amino-terminal de la protéine mais n'abroge pas l'infectiosité. Pour établir si une PrP^c tronquée en amino-terminal pourrait servir de substrat à la conversion en PrP^{sc}, plusieurs souris transgéniques exprimant des molécules de PrP^c plus ou moins délétées de leur extrémité amino-terminale, ont été générées sur fond *prnp*^{0/0}, puis infectées avec la souche de Scrapie murine RML. Les souris exprimant une PrP délétée entre les positions 32 et 80 (Δ 32-80), ou 32 et 93 (Δ 32-93) ne présentent pas de phénotype particulier, et après inoculation intra-cérébrale avec la Scrapie, ces souris ont développé la maladie, et ont accumulé de la PrP^{sc}, certes tronquée mais toujours protéase-résistante (Fischer et al., 1996; Flechsig et al., 2000; Shmerling et al., 1998) (Fig.28). Les souris exprimant des PrP ayant des délétions plus avancées présentent des phénotypes de neurodégénérescence et meurent prématurément. Ainsi, au moins 90 résidus de la région amino-terminale peuvent être considérés comme superflus dans la réaction de conversion en PrP^{sc}, et l'on retrouve dans cette zone l'intégralité de la région des octapeptides répétés (Flechsig et al., 2000). Ceci est troublant car l'amplification du nombre d'octapeptides répétés est associée à certains cas de MCJ familiales et de GSS. Ces maladies pourraient donc relever d'un processus pathologique différent.

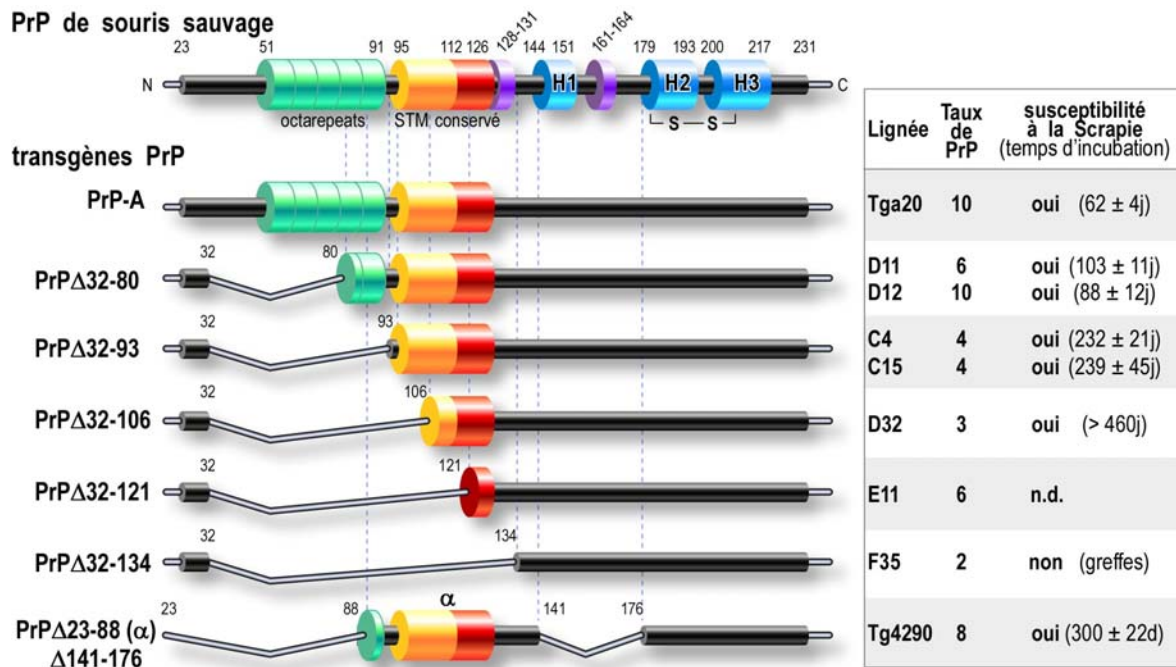


Figure 28 : Susceptibilité à l'infection par la Scrapie de souris *Prnp*^{0/0} exprimant différents transgènes de *Prnp* D'après Weissmann and Flechsig, 2003.

En plus d'une suppression partielle de la queue flexible (23-88), la délétion de la première hélice α (141-176) peut également être effectuée sans que cela n'influence la susceptibilité des souris à développer une EST (**Fig.28**). La PrP résultante, « PrP106 », contient seulement 106 acides aminés, (208 résidus dans la PrP sauvage) et elle peut toujours être convertie en une isoforme PK résistante (Supattapone et al., 1999a).

Enfin plus récemment, il a été montré, à nouveau par transgénèse, qu'une PrP dépourvue de son ancre GPI et sécrétée dans le milieu extracellulaire pouvait également servir de substrat à la conversion (Chesebro et al., 2005). La réaction de conversion ne nécessite donc pas l'attachement de la PrPc à la surface cellulaire.

4) Expression ectopique ou conditionnelle de la PrP

Plusieurs questions concernant la spécificité de certains types cellulaires dans la propagation des prions ont été adressées en générant des souris dans lesquelles l'expression de la PrP est restreinte à un type cellulaire ou à tissu donné. Ceci a été réalisé en plaçant la phase ouverte de lecture de la PrP sous contrôle de promoteurs spécifiques de certains tissus ou organes. Le but est de définir précisément les types cellulaires capables de soutenir la réplication des prions et le rôle éventuel de ces cellules dans la pathogenèse. Une expression de la PrP exclusivement restreinte au niveau des neurones, grâce au couplage de la phase ouverte de lecture de la PrP au promoteur de l'énolase neuronale (NSE), suffit à engendrer, en cas d'infection, une pathologie similaire à celle observée sur des souris sauvages (Race et al., 1995). Ces résultats ne sont pas très surprenants dans la mesure où la PrPc est majoritairement exprimée dans les neurones. Cette étude semble indiquer que l'astroglie n'est pas essentielle à la pathogenèse des EST. Néanmoins, le rétablissement de l'expression spécifique de la PrP au niveau des astrocytes, *via* le promoteur de la GFAP, chez des animaux *prnp*^{0/0}, suffit à restaurer la susceptibilité de ces animaux à une infection par les prions (Raeber et al., 1997). Il semblerait ainsi que les astrocytes soient compétents dans la réplication des prions. De façon intéressante, la neuropathologie observée chez ces souris transgéniques est tout à fait semblable à celle retrouvée dans les souris sauvages infectées, à savoir que l'on constate un effet toxique sur les neurones malgré l'absence de conversion de la PrPsc dans ces cellules.

Une des études les plus élégantes réalisées en matière de transgénèse fut sans conteste celle réalisée par Mallucci et al. Dans cette étude, l'expression de la PrP est inhibée au cours de la période postnatale de façon spécifique au niveau neuronal (Mallucci et al., 2003). Dans ces souris, NFH-Cre/MloxP, doublement transgéniques et générées sur fond *prnp*^{0/0}, la recombinase Cre est placée sous contrôle du promoteur de la NFH (neurofilament heavychain) qui n'est exprimée

qu'à partir de la 10^{ème} semaine post-natal. Cette recombinase permet l'excision des séquences codantes de la PrP contenues dans les transgènes MloxP, et comme la NFH est spécifique des neurones, la PrP cesse d'être exprimée sélectivement dans ces cellules. Ces souris ont été infectées par une souche de Scrapie murine (RML) entre l'âge de 3 et 4 semaines et dès la 10^{ème} semaine, avant la déplétion neuronale de la PrP, ces souris présentent des signes histopathologiques significatifs de la Scrapie. Dans les semaines suivantes, il a été montré que l'arrêt de l'expression de la PrPc endogène dans les neurones, non seulement prévient la mort neuronale, mais entraîne une réversion de la spongiose et arrête la progression de la maladie, et ce en dépit de l'accumulation de quantités importantes de PrPsc et d'une gliose sévère (**Fig.29**). Dernièrement, il a été montré que la déplétion de la PrPc permettait également de réverser les déficits cognitifs et troubles comportementaux associés à la dégénérescence spongiforme précoce de l'hypothalamus (Mallucci et al., 2007). Ces résultats illustrent une fois de plus que la vacuolisation demeure le signe incontestable des EST et que ce processus est intimement lié à la neurotoxicité et aux signes cliniques de la maladie. L'accumulation de PrPsc et la gliose apparaissent comme des signes moins pertinents que la vacuolisation dans la définition des EST.

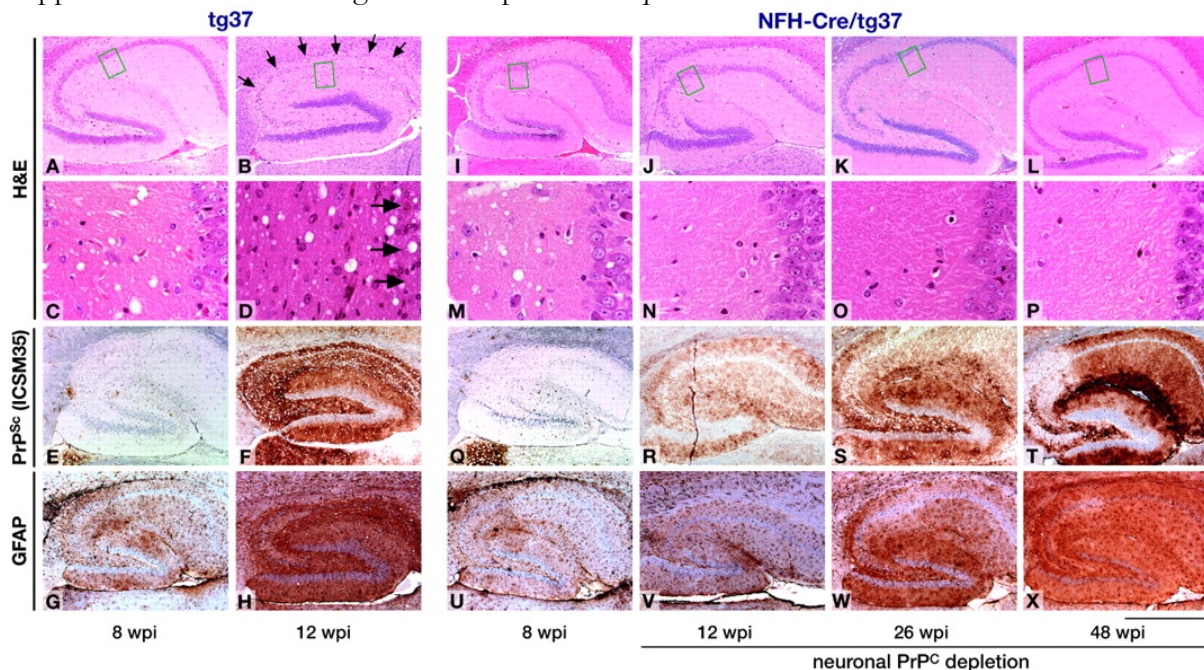


Figure 29 : Prévention de la perte neuronale et disparition de la spongiose précoce chez des souris infectées par la Scrapie après déplétion de la PrPc.

Coupes de tissus fixées illustrant la région hippocampique des souris tg37 et des souris NFH-Cre/tg37, infectées par la Scrapie, à différents temps post-infection. Les coupes sont colorées à l'éosine-hématoxyline (H&E) et immunomarquées pour la détection de l'astrocytose (GFAP) et des dépôts de PrPsc (ICSM35). Les souris tg37 présentent au stade terminal de la maladie une perte neuronale massive dans les neurones CA1 et CA3 (B et D) (flèches) et un rétrécissement global de tout l'hippocampe (B). Aucune perte neuronale n'est observée chez les souris NFH-Cre/tg37 déplétées en PrPc jusqu'à 48 semaines post-infection (J, K et L). La spongiose précoce a été observée sur l'ensemble des souris NFH-Cre/tg37 infectées à 8 semaines post-infection (C et M). En revanche la spongiose n'est plus présente à partir de la 12^{ème} semaine post-infection (N, O et P), malgré la persistance de l'accumulation de PrPsc et de la gliose (R à T et V à X). La barre d'échelle représente 320 μ m, sauf pour les panneaux C, D, et M à P, où elle représente 80 μ m. D'après Mallucci et al., 2003.

Afin de déterminer si les cellules hématopoïétiques ou les tissus du système lympho-réticulaire sont impliqués dans la réplication et la neuroinvasion des prions, de nombreux modèles transgéniques comportant une expression restreinte de la PrP dans différentes cellules du système immunitaire, ont été élaborés. Ces modèles seront abordés en détail dans le chapitre IV.

D/Mécanismes de la neurotoxicité

1) Toxicité directe de la PrP^{Sc} et des formes mutantes de la PrP

Nombreux sont ceux qui ont supposé que la PrP^{Sc} était la cause primaire de la neurodégénérescence. Cette hypothèse est basée principalement sur la corrélation spatio-temporelle qui existe entre l'accumulation de la PrP^{Sc} et le développement des lésions neuropathologiques (DeArmond et al., 1987; Jendroska et al., 1991). L'accumulation de la PrP^{Sc} précède généralement la perte neuronale et l'astrocytose et les structures cérébrales les plus riches en PrP^{Sc} sont généralement plus atteintes que les autres (Williams et al., 1997). La PrP^{Sc} pourrait posséder des propriétés toxiques nouvelles, sans rapport avec la fonction physiologique normale de la PrP^C. Par exemple, les agrégats de PrP^{Sc} pourraient bloquer le transport axonal, interférer dans la fonction synaptique ou induire l'activation des voies apoptotiques.

In vitro, les premières tentatives de démonstration d'une toxicité directe de la PrP^{Sc} ont été réalisées sur des cellules corticales de rats en culture primaire qui présentaient de nombreux signes apoptotiques après incubation avec la PrP^{Sc} (Muller et al., 1993). La neurotoxicité de la PrP^{Sc} est inhibée par des anticorps monoclonaux dirigés contre la PrP, démontrant la spécificité de la réaction de neurotoxicité. Plus récemment, il a été montré que l'incubation de la PrP^{Sc}, purifiée à partir de cerveaux de souris infectées, sur des neuroblastomes N2a, provoque dans ces cellules un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de la caspase 12 (Hetz et al., 2003). Une autre équipe a pu dernièrement confirmer l'effet toxique de la PrP^{Sc} sur les cellules GT-1 et N2a chroniquement infectées par induction de la voie apoptotique *via* la stimulation des caspases 3 et 8 (Kristiansen et al., 2005). Les auteurs suggèrent un mécanisme neurotoxique qui passerait par un dysfonctionnement du complexe ubiquitine-protéasome et la formation d'agrégats intracellulaires de PrP^{Sc}. Néanmoins, ces résultats doivent être interprétés avec vigilance car les préparations de PrP^{Sc} utilisées ne sont jamais totalement pures (Prusiner et al., 1984). Le degré de purification atteint est, dans le meilleur des cas, de 85% et le problème principal reste l'utilisation de détergents pouvant modifier les propriétés intrinsèques des agrégats de PrP^{Sc} au cours des procédures de purification (Hetz et al., 2003).

Afin de contourner ce problème, de nombreux auteurs ont eu recours à l'utilisation de peptides dérivés de la séquence de la PrP et qui partagent des propriétés physico-chimiques

communes avec la PrPsc, pour tenter de modéliser les propriétés potentiellement proapoptotiques de la PrPsc. Le peptide P106-126 est celui qui a fait l'objet des plus nombreuses études (pour revue (Brown, 2002)). Ce dernier, peut comme la PrPsc, s'agréger *in vitro* et former des fibrilles amyloïdes (Tagliavini et al., 1993). Dans ces conditions, il est structuré en feuillet β et résistant à la digestion par la protéinase K (Forloni, 1996). Dans leur ensemble, les résultats ont indiqué une forte cytotoxicité démontrée *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, dépendante de l'état d'agrégation du peptide (Brown et al., 1996; Ettaiche et al., 2000; Forloni et al., 1993). En effet, sous forme soluble, il ne présente aucune toxicité. De plus, la toxicité cellulaire du P106-126 dépend de l'expression de la PrPc. En revanche, les propriétés neurotoxiques du peptide P118-135, qui correspond au domaine transmembranaire putatif et hautement conservé de la PrP, sont totalement indépendantes de l'expression de la PrPc et de son état d'agrégation (Chabry et al., 2003; Pillot et al., 2000). Si l'utilisation de ces modèles présente un grand intérêt dans l'appréhension des bases des mécanismes mises en jeu dans la toxicité de la PrPsc, les résultats obtenus doivent cependant être interprétés avec prudence et ne peuvent être directement extrapolés à la PrPsc.

Récemment, plusieurs études ont soulevé des interrogations sur l'importance de la taille des agrégats de PrPsc pour la neurotoxicité et l'infectiosité. Sous quelle forme la PrPsc est-elle la plus neurotoxique ou la plus infectieuse ? Les notions de neurotoxicité et d'infectiosité vont-elles nécessairement de paires ? Silveira et al. ont montré que les particules au potentiel infectieux le plus élevé seraient des structures agrégées composées de 14 à 28 unités de PrPsc tandis que les larges agrégats seraient nettement moins infectieux (Silveira et al., 2005). Il serait envisageable que la formation d'agrégats soit une stratégie protectrice ayant pour but de séquestrer les oligomères nocifs et non un évènement responsable des effets neurodégénératifs. Une récente étude semble confirmer cette hypothèse (Chesebro et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont créé des souris transgéniques qui expriment une PrP dépourvue de son ancre GPI (PrP GPI-). De façon surprenante, lorsque ces souris ont été inoculées par la souche de Scrapie murine RML, aucun signe clinique de la Scrapie n'a pu être détecté en dépit du fait que ces souris accumulent massivement de la PrPsc protéase-résistante et infectieuse. L'examen histologique des cerveaux des animaux inoculés a montré une accumulation saisissante de dépôts extracellulaires de PrPsc, possédant les caractéristiques de l'amyloïde. Une interprétation possible serait que les formes amyloïdes, fortement polymérisées, de la PrPsc, ne sont pas intrinsèquement toxiques, bien que potentiellement infectieuses. Ainsi, les formes infectieuses et toxiques de la PrP pourraient avoir des caractéristiques biophysiques distinctes. Il serait intéressant de caractériser les propriétés biophysiques de la PrPsc retrouvées dans les cerveaux des souris PrP GPI-, afin de déterminer si

les grands polymères amyloïdes prédominent aux dépens de plus petits oligomères, potentiellement neurotoxiques. Cela pourrait peut-être être réalisé grâce aux méthodes décrites par Silveira et al (Silveira et al., 2005).

De plus, il n'est pas impossible qu'il existe un certain parallèle dans les mécanismes de neurotoxicité des EST et des autres maladies neurodégénératives. Ainsi, certaines études réalisées au cours de ces dernières années, suggèrent que les grands agrégats retrouvés dans diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer et d'autres amyloïdoses, pourraient être relativement inertes et moins impliqués dans la neuropathogenèse de la maladie en comparaison avec de plus petits agrégats (Caughey and Lansbury, 2003; Soto, 2003). Les résultats obtenus sur les souris GPI- souligne également l'importance de l'ancrage à la membrane de la PrPc et suite à réaction de la conversion, de la PrPsc. La réaction de conversion à la membrane neuronale pourrait être responsable des principaux effets neurotoxiques chez les animaux infectés. Un autre mécanisme envisageable pourrait être la perturbation des membranes biologiques par insertion et accumulation de la PrPsc. Bien que la PrPsc soit comme la PrPc, ancrée à la membrane plasmique par son ancre GPI, la PrPsc ne peut être détachée de la surface cellulaire après un traitement à la PI-PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C), enzyme de coupure du groupement GPI. Elle entretient donc avec les membranes biologiques des liens étroits mais non caractérisés à ce jour.

Cependant, il existe un certain nombre de situations où la corrélation entre la neurotoxicité et la présence de PrPsc est faible, voire absente. Il a été constaté dans plusieurs cas de transmissions expérimentales, qu'une neuropathologie significative ou un dysfonctionnement clinique pouvaient se développer malgré une accumulation moindre de PrPsc. A ce titre, plusieurs candidats ont été également proposés comme espèce pathogène mais non infectieuse de la PrP. Par exemple, les formes transmembranaires et cytosoliques de la PrPc (CtmPrP et CytoPrP, respectivement), retrouvées en faible proportion à l'état physiologique, provoquent chacune, lorsqu'elles sont exprimées par des souris transgéniques, une maladie neurodégénérative sans qu'il y ait pour autant accumulation de PrPsc (Ma et al., 2002; Stewart et al., 2005). Ces deux formes peuvent être neurotoxiques probablement parce qu'elles interagissent anormalement avec des membranes ou des protéines cytoplasmiques auxquelles la PrPc n'est normalement pas exposée. Une étude démontre en effet que lorsque l'activité du protéasome est inhibée, la PrP cytoplasmique est co-agrégée avec Bcl-2, ce que les auteurs corrélient avec la toxicité apparente de la PrP cytosolique (Rambold et al., 2006). Cependant la toxicité de la forme cytoplasmique de la PrP est soumise à la controverse (Fioriti et al., 2005; Roucou et al., 2003). Bien que ces formes anormales de la PrP, soient à l'origine de syndrome neurodégénératif chez les souris

transgéniques dans lesquelles elles sont exprimées, il reste à montrer que ces formes CtmPrP et CytoPrP s'accumulent naturellement lors d'une infection par les prions, sachant qu'aucun dysfonctionnement du protéasome n'a jamais pu être démontré chez des animaux infectés par les prions.

Des informations supplémentaires quant à la nature de la PrP toxique ont été obtenues grâce aux souris transgéniques qui expriment des formes mutantes de la PrP associées aux EST familiales. Les souris exprimant une molécule de PrP comportant une insertion d'octapeptide supplémentaire développent spontanément des symptômes neurodégénératifs mortels, parallèlement à l'accumulation d'une forme faiblement protéase-résistante et non infectieuse de la protéine mutante (Chiesa et al., 2001; Chiesa et al., 2003). La caractérisation biochimique de cette forme protéique a montré qu'elle était altérée dans sa conformation et qu'elle était principalement constituée de petites oligomères de PrP, contrairement aux polymères de PrP^{Sc} de tailles supérieures. Il semblerait que les formes toxiques soient moins fortement polymérisées. Des conclusions similaires ont pu être tirées dans une étude où des souris transgéniques expriment une PrP comportant une mutation ponctuelle liée au syndrome GSS (Nazor et al., 2005).

2) Toxicité indirecte de la PrP^{Sc}

La neurotoxicité de la PrP^{Sc} pourrait se manifester également par des voies indirectes. L'accumulation de la PrP^{Sc} ou la réaction de conversion pourrait contribuer à une perte ou une subversion des fonctions physiologiques de la PrP^C ou à l'activation de cellules microgliales.

- Perte ou subversion de fonction de la PrP^C

Une hypothèse alternative permettant d'expliquer la neurodégénérescence associée aux EST serait la perte de l'activité biologique de la PrP^C suite à sa conversion ou à son interaction avec la PrP^{Sc}. En théorie, la perte de n'importe laquelle des fonctions putatives attribuées à la PrP^C serait en mesure d'induire des conséquences pathologiques. Parmi ces fonctions putatives on peut citer une activité d'adhésion cellulaire, de signalisation, de transmission synaptique, et de survie neuronale. La perte de la signalisation de survie *via* la PrP^C et/ou de son activité anti-apoptotique permettrait d'expliquer la mort neuronale. Cependant deux arguments forts viennent contrer cette hypothèse. Premièrement, l'ablation génétique de l'expression de la PrP^C, qu'elle soit effective de façon pré- ou post-natale, a relativement peu de conséquences phénotypiques, et ne permet en aucun cas de reproduire les symptômes typiques des EST (Bueler et al., 1992; Mallucci et al., 2002; Manson et al., 1994). Ainsi, la perte de fonction de PrP^C *per se*, ne peut expliquer la neurodégénérescence des EST. Mais il est possible qu'un mécanisme de perte de fonction aggrave

la pathologie initialement provoquée par les mécanismes de conversion ou l'accumulation de la PrP^{sc}. Par exemple, une activité cytoprotectrice de la PrPc qui est facultative en condition normale peut devenir essentielle en cas de maladie en raison du stress subi à l'échelle cellulaire ou de l'organisme. Deuxièmement, la perte de fonction de la PrPc comme mécanisme pathologique semble également être incompatible avec le mode dominant de la transmission des formes familiales des EST. A cet égard, il serait tout de même envisageable que la PrP^{sc} ou la PrPc mutée séquestre la PrPc de type sauvage dans des agrégats et que cette dernière de ce fait, ne puisse avoir une activité fonctionnelle (Horiuchi et al., 2000). Ceci aurait pour conséquence de produire un effet dominant-négatif.

Une considération qui plaide plutôt en faveur d'une perte de fonction dans certaines formes familiales d'EST est la conséquence des mutations de la PrPc sur sa stabilité thermodynamique et ses propriétés biochimiques. Certaines mutations déstabilisent nettement la structure de la protéine, favorisant son repliement anormal et la formation d'agrégats de type PrP^{sc}, d'autres pas (Liemann and Glockshuber, 1999; Swietnicki et al., 1998). Il est difficile d'expliquer la pathogénicité de ces mutants par l'accumulation d'agrégats toxiques de protéine. Il semble plus probable, du moins dans ce contexte, que ces protéines soient déficientes pour une certaine fonction normalement exercée par la PrPc sauvage. Conformément à cette proposition, il a été démontré qu'une mutation de la PrP comportant une insertion d'octapeptide altère partiellement l'activité cytoprotectrice de la protéine dans un modèle de levure ainsi que dans un modèle de souris transgénique (Li and Harris, 2005; Li et al., 2007b).

Une autre conclusion que l'on peut tirer à partir de l'étude réalisée par Chesebro et al. est l'implication de l'ancre GPI de la PrPc dans les réponses cellulaires mises en jeu lors d'infections par les prions (Chesebro et al., 2005). Dans cette optique, la PrPc servirait de transducteur du signal neurotoxique induit par la PrP^{sc}, et l'absence de la PrPc à la membrane permettrait de prévenir l'initiation de ce signal. Cette hypothèse est également en accord avec le fait que *in vivo* les neurones de cerveaux de souris, en l'absence d'expression de la PrPc, sont résistants aux effets toxiques de la PrP^{sc}, que celle-ci soit amené par des greffes de tissus cérébraux ou par les astrocytes environnants (Brandner et al., 1996; Mallucci et al., 2003).

Une autre hypothèse plausible pour la pathogenèse des EST serait la subversion de la fonction neuroprotectrice normale de la PrPc. Dans un tel mécanisme, l'interaction de la PrPc avec la PrP^{sc} provoquerait un changement de la signalisation induite par la PrPc. Après interaction avec la PrP^{sc}, la PrPc induirait une signalisation neurotoxique au lieu d'une signalisation neuroprotectrice. Il existe en effet un certain nombre de situations expérimentales dans lesquelles l'expression de PrPc sensibilise les neurones aux effets toxiques liés à

l'accumulation de la PrPsc. Premièrement, les neurones *prnp*^{0/0} sont résistants aux effets toxiques de la PrPsc environnante, que celle-ci provienne de greffons de tissus cérébraux infectés ou d'astrocytes voisins accumulant des quantités massives de PrPsc (Brandner et al., 1996; Mallucci et al., 2003). Deuxièmement, les neurones en culture primaire *prnp*^{0/0} sont résistants à l'apoptose induite par exposition au peptide synthétique PrP106-126, employé comme modèle de la PrPres (Brown et al., 1994). Troisièmement, les souris infectées exprimant une version GPI- de la PrPc développent une pathologie minimale en dépit de l'accumulation de nombreuses plaques amyloïdes PrPsc positives (Chesebro et al., 2005). Une des conclusions que l'on peut tirer à partir de cette étude concerne l'implication de l'ancrage à la membrane de la PrPc dans les réponses cellulaires mises en jeu lors d'infections par les prions. Il serait envisageable que la PrPc serve de transducteur d'un signal neurotoxique induit par la PrPsc, et l'absence de la PrPc à la membrane permette de prévenir l'initiation de ce signal. Comment l'activité neuroprotectrice physiologique de la PrPc pourrait-elle être détournée et produire un effet neurotoxique ? Il est vraisemblable que ceci nécessite une interaction physique entre la PrPsc et la PrPc. Une possibilité est que la PrPsc induise l'agrégation de la PrPc à la surface cellulaire, produisant de ce fait un signal neurotoxique plutôt qu'un signal neuroprotecteur. Conformément à ce modèle, il a été montré *in vivo* que le cross-linking de la PrPc par des anticorps anti-PrP induit l'apoptose des neurones du SNC (Solfrosi et al., 2004).

Alternativement, la PrPsc pourrait aussi se lier à la PrPc et bloquer des régions d'interaction spécifiques de la PrPc, changeant de ce fait les propriétés de signalisation de cette dernière. Un élément de soutien à ce dernier mécanisme est apporté par les souris transgéniques (PrP Δ 105-125 et Δ 94-134) qui expriment une PrP ayant une délétion dans son domaine central, hautement conservé (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007a). La neurotoxicité de la PrP Δ 105-125 observée chez ces animaux suggère un modèle dans lequel les résidus 105 à 125 constituent un site de liaison critique dans l'interaction entre la PrPc et son récepteur putatif (appelé Lprp). Cette interaction entraînerait la transduction de signaux neuroprotecteurs ou neurotoxiques. La liaison de la PrPc à Lprp entraîne normalement un signal neuroprotecteur, mais la suppression du domaine 105-125 de la PrPc provoque une modification de cette interaction de telle manière qu'un signal neurotoxique est produit. L'équipe de David Harris propose que la PrPsc exogène, en se liant à la PrPc, perturbe l'interaction entre Lprp et le domaine 105-125 de PrPc, reproduisant ainsi un effet neurotoxique équivalent à la suppression des résidus 105-125. Un phénomène semblable pourrait se produire avec le peptide synthétique PrP106-126, dont la toxicité sur les neurones est dépendante de l'expression de la PrPc. Dans ce scénario, les voies

neurotoxiques activées par la PrPsc et le peptide PrP106-126 seraient les mêmes que celles activées par les mutants de délétion PrP Δ 105-125 et la PrP Δ 94-134.

- Recrutement et activation des cellules microgliales

Bien que les EST ne soient pas considérées comme des maladies neuro-inflammatoires, de nombreuses données de la littérature suggèrent un rôle actif des cellules microgliales dans l'établissement des dommages cérébraux (Dheen et al., 2007). La présence de cellules microgliales activées à proximité des dépôts de PrPsc est un dénominateur commun dans les cerveaux atteints d'EST et l'activation microgliale et l'accumulation de PrPsc sont spatialement corrélées et précèdent la mort neuronale (Williams et al., 1997). *In vitro*, la présence de cellules microgliales est indispensable à la neurotoxicité induite par le peptide P106-126 sur des cultures primaires de neurones (Brown et al., 1997a). Chez la souris, les taux d'ARNm de certaines chemokines et de leurs récepteurs sont augmentés très tôt après l'infection : c'est notamment le cas de la chemokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cells Expressed and Secreted) et de son récepteur CCR-5 (Lee et al., 2005). L'augmentation de la cytokine TNF α a également été décrite dans les cerveaux d'individus atteints de MCJ (Williams et al., 1997b). Sécrétées par de nombreux types cellulaires, les chemokines jouent un rôle prépondérant dans la migration des leucocytes. Les données bibliographiques concernant le rôle des chemokines et de leurs récepteurs dans les maladies neurodégénératives sont encore fragmentaires.

Concernant l'attraction de la microglie autour des dépôts amyloïdes dans les EST, il a été montré *in vivo* que des injections intra-vitréales de PrPsc provoquaient une infiltration et une activation des cellules microgliales rétiniennes, de façon dépendante du récepteur CCR-5 (Marella and Chabry, 2004). Les aspects quantitatifs et cinétiques de cette migration induite par la PrPsc, ont été caractérisés *in vitro* en utilisant des tests de chemo-attraction en chambre de Boyden (Fig.30).

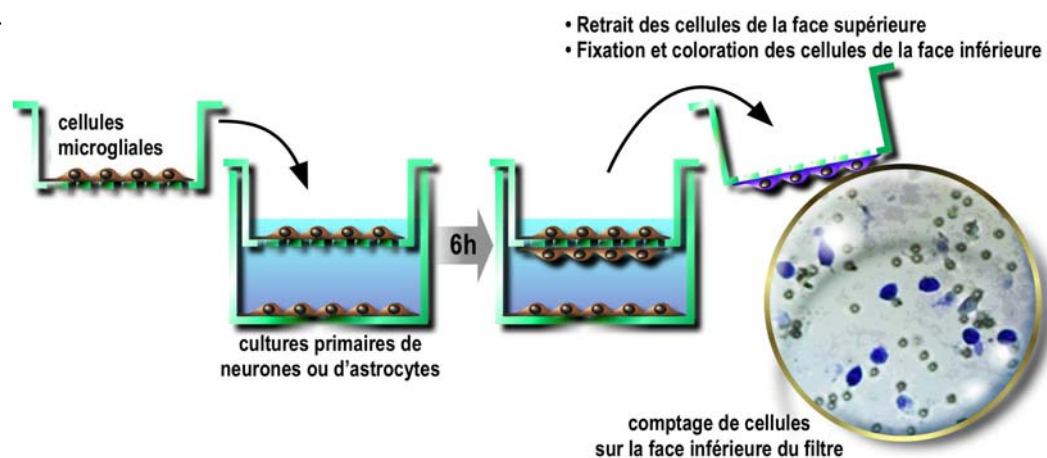


Figure 30 : Test de migration en chambre de Boyden

Grâce à ce modèle, il a été montré que la PrP^{Sc} n'a pas de pouvoir chémo-attractant intrinsèque. En effet, l'incubation de la PrP^{Sc} seule, en absence de cellule neuronale dans la chambre inférieure, n'induit pas de migration de la microglie. En revanche, la migration des cellules microgliales est stimulée lors de l'incubation de PrP^{Sc} sur des neurones corticaux ou des astrocytes en culture primaire. La cinétique et l'amplitude de la chémo-attraction sont directement proportionnelles à la quantité de PrP^{Sc} incubée. La chémo-attraction microgliale est indépendante de l'expression de la PrP^C.

L'incubation de la PrP^{Sc} sur des neurones et des astrocytes stimule la synthèse des messagers de certaines chemokines et plus particulièrement des messagers de RANTES pour les neurones et MIP1 β pour les astrocytes, qui activent toutes deux le même récepteur CCR-5. Plus récemment, il a été démontré que la voie des MAP kinases était activée dans les neurones peu de temps après exposition à la PrP^{Sc}, entraînant ainsi l'expression d'Egr-1 (early growth factor 1), facteur de transcription fortement lié à l'augmentation d'expression de RANTES (Marella et al., 2005). La voie des MAP kinases serait ainsi impliquée dans la régulation de l'expression de molécules chémoattractantes par les neurones après exposition à la PrP^{Sc}. Un modèle récapitulatif est proposé ci-dessous (Fig.31).

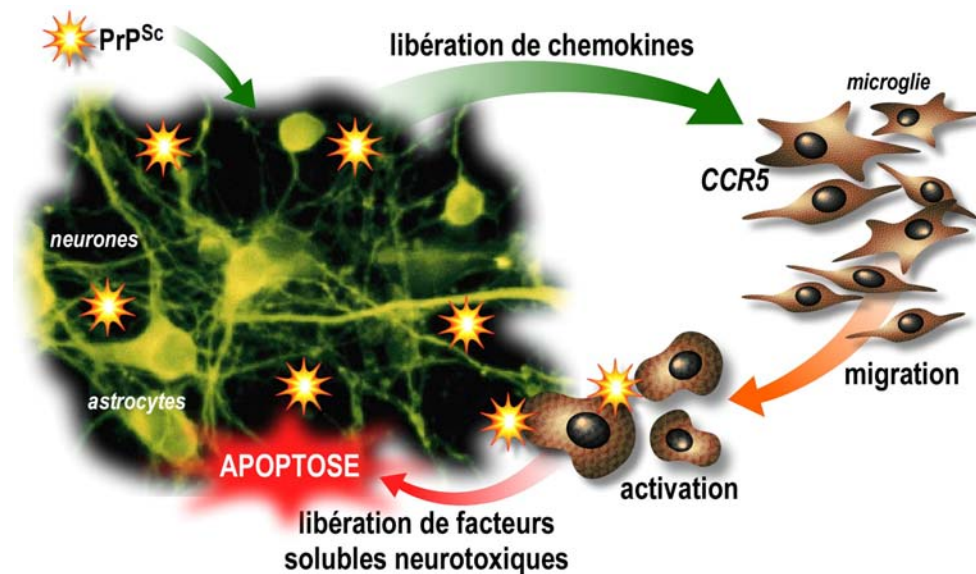


Figure 31 : Modèle d'attraction des cellules microgliales dans les EST

Quelles sont les fonctions remplies par les cellules microgliales ayant migrées à proximité des cellules nerveuses en contact avec la PrP^{Sc} ? Plusieurs hypothèses non exclusives, peuvent être émises :

- la microglie participe à l'élimination des agrégats protéiques par phagocytose.
- la microglie devient un site de répllication de l'agent infectieux et participe à sa dissémination dans l'ensemble du cerveau voire de l'organisme.

- entrant en état d'activation, la microglie synthétise des facteurs cytotoxiques solubles qui participent à la mort neuronale.

En effet, l'activation de la microglie provoque généralement la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1, IL-6 ou le $TNF\alpha$ (Peyrin et al., 1999) et la production de NO et de ROS (Marella et al., 2004) (Mander and Brown, 2005) qui peuvent contribuer ou accélérer les processus de mort neuronale (Milhavet and Lehmann, 2002). Par ailleurs des souris transgéniques invalidées pour le gène codant le récepteur de l'IL-1 présentent un allongement de la période d'accumulation et une cinétique d'accumulation de la PrPsc ralentie (Schultz et al., 2004). A l'inverse, des souris n'exprimant pas la cytokine pro-inflammatoire IL-10 ont une période d'incubation plus courte que celle des souris sauvages (Thackray et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère une implication forte de la microglie dans la mort neuronale *via* la libération de facteurs solubles neurotoxiques. La PrPsc serait indirectement responsable de cette neurotoxicité puisqu'elle serait à l'origine de l'induction dans les neurones d'une voie de signalisation impliquée dans la production de molécules chémo-attractantes ayant pour conséquence la migration et l'activation de la microglie à proximité du site d'infection.

E/ Modèles *in vitro* : propagation des prions et étude de la neurotoxicité dans les systèmes cellulaires

Les cultures cellulaires représentent des modèles expérimentaux utiles dans l'étude des EST. Elles permettent la réplication stable et persistante de la PrPsc ainsi que de l'infectiosité sur plusieurs passages. Les modèles de culture cellulaires permissifs à la réplication des prions ne sont pas très nombreux. Les neuroblastomes de souris (N2a) constituent le modèle le plus couramment utilisé et il correspond à un modèle de transmission homologue permettant de promouvoir la propagation de souches de Scrapie murine. Plus récemment, des modèles hétérologues, sensibles aux formes naturelles d'EST, ont également été développés. Ces modèles présentent plusieurs avantages évidents comprenant : (i) la capacité d'analyser, aux niveaux moléculaires et cellulaires, les propriétés biologiques de la PrPc et de la PrPsc ; (ii) la possibilité de déterminer la nature de l'agent infectieux et des facteurs régissant sa réplication ; et (iii) le criblage de molécules à valeur thérapeutique potentielle.

1) Les différents modèles de culture cellulaire permissifs aux prions

L'approche la plus directe pour propager des prions *ex vivo* consiste à mettre en contact des fractions infectieuses, comme des homogénats de cerveaux d'animaux infectés, avec une culture cellulaire et de vérifier la réplication de la PrPsc au cours des passages successifs (Race et

al., 1987). Avant la découverte de la PrP^{sc}, le succès de la transmission des prions à la culture était évalué par la présence de l'infectiosité : les extraits cellulaires étaient inoculés à des animaux afin de vérifier si ces derniers développaient une EST. Après démonstration faite du lien étroit entre la production de PrP^{sc} et la propagation des prions, il a été démontré, par des expériences de marquages métaboliques, que les cultures infectées étaient capables de produire de nouvelles molécules de PrP^{sc} (Caughey et al., 1989). Les lignées les plus connues ont été récapitulées dans le **tableau 4**. Il est important de souligner que les premiers résultats, obtenus par dilution et sous-clonage des cellules infectées N2a, ont indiqué que seulement 1% des cellules étaient infectées (Race, 1991). Dans des modèles plus efficaces, comme dans le cas de N2a surexprimant la PrP^c, ce taux peut atteindre les 30% (Nishida et al., 2000). Outre l'accumulation de la PrP^{sc}, l'infectiosité présente dans la culture est également une question importante. L'ensemble des données obtenues sur différentes lignées permissives ont indiqué que les cultures peuvent accumuler autant d'unités infectieuses par mg de protéine que les cerveaux d'animaux infectés (Vilette et al., 2001). En outre, l'infectiosité a également été détectée dans le milieu de culture (Nishida et al., 2000; Race, 1991; Race et al., 1987).

Nom de lignée	Espèce d'origine	Tissus d'origine ou type cellulaire	Souche d'EST	Références
Lignées neuronales				
N2a	Souris	neuroblastome	Chandler	(Butler et al., 1988; Race et al., 1987)
c-1300	Souris	neuroblastome	Chandler	(Race et al., 1987)
N1E-115	Souris	neuroblastome	Chandler	(Markovits et al., 1983; Race et al., 1987)
N2a#58	Souris	neuroblastome	22L./Chandler/139A	(Nishida et al., 2000)
GT1	Souris	Cellule neurale hypothalamique	22L./Chandler/139A	(Nishida et al., 2000; Schatzl et al., 1997)
HaB	Hamster	Cerveau	Souche de hamster	(Taraboulos et al., 1990)
MSC-80	Souris	Cellules de Schwann	Chandler	(Follet et al., 2002)
Lignées non neuronales				
SMB	Souris	Cellules du cerveau d'origine mésodermique	Chandler	(Birkett et al., 2001; Clarke and Haig, 1970)
Fibroblastes L	Souris	fibroblaste	Chandler	(Clarke and Millson, 1976)
L 23	Souris	Non spécifié	Compton ou C-506	(Cherednichenko Yu et al., 1985)
PC12	Rat	phéochromocytome	139A/ME7	(Rubenstein et al., 1984)
Cellules gliales	Rat	Ganglion Gasserian	Chandler	(Roikhel et al., 1987)
RK-13 (Rov9)	Lapin	Epithélium de rein	Scrapie naturelle	(Vilette et al., 2001)

Tableau 4 : Récapitulatif des différentes lignées chroniquement infectées par la PrP^{sc}

Les modèles expérimentaux de propagation des prions en culture peuvent être classés en différentes catégories selon les origines respectives de l'inoculum et de la culture cellulaire. Les

modèles de cultures homologues ont été conçus afin d'éviter le phénomène de barrière d'espèce qui diminue l'efficacité de la propagation des prions. Dans ces modèles, la PrPsc de l'inoculum est issue de la même espèce que la PrPc exprimée par les cellules cultivées. La majorité des modèles ont été développés dans des cellules neuronales qui sont *in vivo* la cible principale des prions. La première tentative d'établissement d'un modèle neuronal homologue a été réalisée dès 1970 (Clarke and Haig, 1970), puis poursuivie avec succès par les groupes de Chesebro et de Prusiner en employant principalement la lignée de neuroblastomes de souris, N2a (Butler et al., 1988; Race et al., 1987). Ces cellules, qui permettent la réplication de la souche RML, constitue actuellement le modèle le plus couramment décrit et utilisé. Étonnamment, une fois infectées, ces cellules ne montrent pas de changement phénotypique ou métabolique évident (Butler et al., 1988). Certains auteurs ont néanmoins décrit une augmentation des taux de catécholamine et une diminution des taux de sérotonine et de noradrénaline libres dans les cultures infectées de N2a (Markovits et al., 1983). En outre, les cellules N2a infectées ont montré des changements dans leurs réponses associées à la bradykinine et dans la fluidité membranaire, bien que ces anomalies ne semblent pas affecter la croissance ou la viabilité cellulaire (Kristensson et al., 1993; Wong et al., 1996). D'autres auteurs ont décrit des différences morphologiques ainsi qu'un taux accru de prolifération cellulaire dans les cellules infectées, mais ces résultats sont très contestés (Borchelt et al., 1990). Il est envisageable que les changements décrits, bien que mineurs, puissent découler non pas d'un effet propre de l'infection mais plutôt de sélections clonales.

La lignée de neuroblastomes N2a a pu être efficacement infectée par différentes souches de Scrapie : la lignée N2a#58, qui sur-exprime la PrPc de souris, peut être aisément infectée par les souches Chandler, 139A et 22L (Nishida et al., 2000). Le taux de PrPc ne joue pas réellement dans la permissivité d'un type cellulaire à une infection par les prions. Toutefois, une fois la cellule infectée, il existe une corrélation directe entre le taux de PrPc exprimée et les quantités de PrPsc accumulée. La transfection de siRNA encodant pour les codons 392-410 du gène *prnp* entraîne une réduction significative des taux de PrPsc dans les cultures infectées avec un IC50 de 100nM (Daude et al., 2003). La lignée de cellule hypothalamique GT1 représente également un modèle fiable et assez répandu en termes de réplication des prions *ex vivo*. Comme les N2a, les GT1 peuvent également supporter la réplication de prions de souches différentes (22L, Chandler, 139A) (Nishida et al., 2000). Les cellules nerveuses du système nerveux périphérique, telles que des cellules de Schwann, peuvent également soutenir la propagation des prions en culture (Follet et al., 2002). Ces modèles peuvent être utiles dans l'étude des étapes périphériques de l'invasion par les prions.

L'ensemble des études réalisées ont permis de tirer plusieurs conclusions importantes concernant la transmission des prions dans les modèles homologues : (i) seules quelques souches peuvent être répliquées dans une lignée cellulaire donnée ; (ii) seules quelques cellules d'une culture sont effectivement infectées et le sous-clonage peut améliorer le taux d'infection ; (iii) la propagation des prions n'induit pas de changements majeurs dans le phénotype des cultures ; (iv) la quantité de PrP^{sc} accumulée est directement proportionnelle à la quantité de PrP^c exprimée et la permissivité des cellules à l'infection ne dépend pas du taux de PrP^c exprimé.

Dans les modèles de culture hétérologue, l'inoculum infectieux provient d'une espèce différente de la PrP^c exprimée par la lignée cellulaire. En 1984, Rubenstein et al. montrent pour la première fois que des cellules de phéochromocytome de rat, PC12, peuvent être aisément infectées par des prions de souris (Rubenstein et al., 1984) si ces cellules sont préalablement différenciées en neurones par un traitement au NGF. Il s'agissait de la première démonstration que la barrière d'espèces pouvait être surmontée dans une culture cellulaire.

Jusqu'à récemment une des constantes des lignées cellulaires capables de propager les prions était que seules les souches d'EST expérimentalement adaptées aux rongeurs pouvaient être transmises *ex vivo*. Dernièrement, Vilette et al. ont développé un nouveau modèle hétérologue pour la tremblante du mouton. Ce modèle a pu être obtenu par l'expression stable du gène ovin de la PrP dans une lignée de cellule épithéliale de lapin (RK13) (Vilette et al., 2001). Il convient cependant de préciser que ce modèle constitue un cas particulier. En effet, les cellules de la lignée RK13 n'expriment pas la PrP de façon endogène et sont résistantes à l'infection. Les cellules Roy, dérivées de cette lignée, ont été transfectées de façon stable par un construit codant pour la PrP ovine. En fait, dans ce modèle, la source de l'inoculum et la PrP exprimée sont de la même origine, même s'il s'agit d'une lignée de lapin.

Les modèles cellulaires dérivés d'animaux infectés constituent également une approche originale dans l'établissement de modèle *ex vivo* de propagation des prions. Cette approche a été réussie pour la lignée cellulaire SMB qui est dérivée du cerveau d'une souris affectée par la tremblante (Clarke and Haig, 1970). Elle a également été réussie après immortalisation de cellules dérivées de souris transgéniques exprimant une PrP ovine et atteintes de la tremblante du mouton. Les lignées dérivées de souris transgéniques ovinisée, bovinisée ou humanisée construites sur fond *prnp*^{0/0} peuvent être des outils prometteurs car l'ablation du gène *prnp* permet d'éviter des interactions concurrentielles entre PrP d'espèces différentes (Telling et al., 1995). L'utilisation de lignées neuronales dérivées de souris *prnp*^{0/0} et transfectées avec un gène *prnp* humain ou bovin pourrait peut-être aider à établir des modèles cellulaires de BSE ou MCJ.

2) Intérêts et utilisation de ces modèles

Les cultures cellulaires chroniquement infectées par les prions représentent un modèle utile dans la compréhension des événements cellulaires et moléculaires menant à la formation de la PrP^{Sc}. Les diverses études menées sur des cellules infectées ont principalement permis de mieux comprendre la biologie cellulaire de la PrP^{Sc}. Il a en effet pu être démontré dans ces cellules que la PrP^C était le précurseur de la PrP^{Sc} et que la voie d'endocytose empruntée par la PrP^C était essentielle dans la génération de l'isoforme anormale (Caughey et al., 1989; Caughey and Raymond, 1991). Il a aussi été montré que la PrP^{Sc} semble avoir une demi-vie plus longue que la PrP^C et qu'elle s'accumulerait à l'intérieur de la cellule dans le compartiment lysosomal (Taraboulos et al., 1990). Par ailleurs, ces systèmes ont permis l'étude des événements associés aux phénomènes de conversion. Les modèles cellulaires ont en effet permis d'étudier les sites potentiels de la conversion. Deux compartiments cellulaires ont été principalement envisagés : la membrane plasmique et le compartiment endolysosomal. Le blocage de l'adressage de la PrP^C vers la membrane plasmique (Gilch et al., 2001), le relargage de la PrP^C de la surface cellulaire (Marella et al., 2004) et l'internalisation de la PrP^C inhibent la formation de la PrP^{Sc} (Supattapone et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la PrP^C et la PrP^{Sc} interagissent au niveau de la membrane plasmique. Cette interaction pourrait s'établir au niveau des rafts : comme la PrP^C, la PrP^{Sc} est localisée dans les rafts lorsqu'elle est isolée à partir de cellules chroniquement infectées (Baron et al., 2002; Taraboulos et al., 1992; Taraboulos et al., 1995). Les travaux de Baron et al. démontrent que l'efficacité de la conversion est augmentée si les deux isoformes de la PrP sont insérées par leurs ancrés GPI dans des membranes contiguës (Baron and Caughey, 2003). Ces structures lipidiques pourraient participer au rapprochement des deux isoformes de la PrP et/ou favoriser l'internalisation de la PrP^C et de la PrP^{Sc}. La conversion pourrait effectivement avoir lieu dans le compartiment endolysosomal, qui constitue un environnement physico-chimique favorable à la conversion (Borchelt et al., 1992). La PrP^{Sc} a été détectée dans les lysosomes des cultures infectées et les protéines lysosomiales pourraient participer au clivage de la PrP^{Sc} dans sa région amino-terminale (Caughey et al., 1991a; McKinley et al., 1991).

Un des aspects importants dans l'étude de ces cultures chroniquement infectées était la recherche des conséquences pathologiques possibles de l'infection et la détermination des effets neurotoxiques potentiels de l'accumulation de la PrP^{Sc} dans ces cellules. Or, il s'est avéré que dans la plupart des modèles établis, l'infection par les prions n'avait que peu ou pas d'incidence sur la viabilité ou le phénotype cellulaire contrairement à la toxicité massive observée dans les neurones des individus atteints d'EST. Ainsi ces lignées ne permettent malheureusement pas l'étude des effets neurotoxiques associés aux prions. Cependant, dans les cellules PC12

différenciées, la réplication de la PrP^{sc} entraîne un changement du métabolisme des catécholamines. Dans les cellules GT1 également, un phénotype pathologique a été constaté, avec une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans les cultures infectées (Schatzl et al., 1997). Mais l'exemple le plus prometteur est certainement le modèle de culture primaire de neurones permissifs et sensibles aux prions développé par l'équipe d'Hubert Laude en 2004. Dans ce modèle, l'accumulation de la PrP^{sc} entraîne la mort cellulaire et il constitue une avancée importante puisqu'il s'avère pertinent dans l'étude des mécanismes de neurotoxicité des prions (Cronier et al., 2004).

Enfin, les cultures infectées ont été aussi extensivement utilisées dans le but de découvrir des inhibiteurs potentiels de la formation de PrP^{sc}, et elles constituent souvent la première étape de la recherche de molécules anti-prion. La plupart de ces études ont été effectuées sur les cellules de neuroblastomes chroniquement infectées (ScN2a). De nombreux composés sont capables de diminuer la quantité de PrP^{sc} produite dans ces cellules, même si peu de ces composés sont utilisables *in vivo*. L'étude *in vitro* permet cependant de tenter de décortiquer les mécanismes d'inhibition de l'accumulation de PrP^{sc}.

En résumé, les modèles de cultures cellulaires chroniquement infectés ont permis d'élucider des points importants concernant la biogénèse de la PrP^{sc} en termes de conversion, de localisations subcellulaires, de conséquences physiopathologiques de son accumulation. Ils contribuent également au criblage et à l'étude des composés thérapeutiques potentiels et au développement de nouvelles stratégies dans la recherche de marqueurs diagnostiques spécifiques des EST. Ils sont une alternative simple et rapide aux tests d'infection d'animaux.

F/Approches thérapeutiques des EST

1) Stratégies thérapeutiques connues

Plusieurs stratégies différentes ont été envisagées dans la recherche de traitements potentiels des EST. Les cibles visées sont soit la PrP^c, soit la PrP^{sc}, soit le processus de conversion entre ces deux isoformes. Parmi ces différentes stratégies, on peut citer :

- Stabilisation de la structure de la PrP^c afin d'empêcher sa conversion en PrP^{sc}
- Inhibition de la synthèse de la PrP
- Inhibition du(es) récepteur(s) putatifs de la PrP
- Interférence dans la liaison de la PrP^{sc} à la PrP^c
- Inhibition de la formation de l'isoforme anormale de la PrP
- Destruction des agrégats de PrP^{sc} préformés

Empêcher l'accumulation de la PrPsc reste l'approche la plus extensivement abordée, même si l'ensemble des mécanismes de neurotoxicité de la PrPsc ne sont pas encore totalement compris. Un grand nombre de traitements expérimentaux ont été étudiés ces 30 dernières années, néanmoins, peu d'entre eux ont pu faire l'objet d'essais cliniques souvent en raison d'une toxicité intrinsèque trop importante des molécules identifiées ou en raison de leur faible taux de pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique. Dans le meilleur des cas, un allongement assez significatif du temps de survie a pu être constaté mais uniquement lorsque le traitement était administré autour de la période de l'infection. Or chez l'Homme, les EST ne sont souvent détectées qu'à un stade avancé de la maladie, à savoir au moment de l'apparition des symptômes. Ainsi, les EST demeurent à ce jour des maladies incurables.

L'efficacité anti-prion des différentes molécules candidates a pu être testée sur 3 types de modèles expérimentaux de propagation des prions :

- Les modèles animaux, avec traitement pré- ou post- inoculation des animaux infectés
- Les modèles cellulaires, avec exposition de l'agent thérapeutique dans le milieu de culture des cellules chroniquement infectées
- Les modèles de conversion *in vitro* acellulaires, avec ajout de l'agent thérapeutique dans le milieu de la réaction de conversion.

Par ailleurs, lors des expérimentations *in vivo*, l'efficacité d'une drogue peut être testée de deux façons différentes : (i) l'inoculum peut être préincubé avec la drogue avant infection afin d'évaluer l'effet sur la déstabilisation des agrégats de PrPsc préformés, ou (ii) la drogue est utilisée comme traitement après inoculation de l'animal.

a) Les composés poly-anioniques

- Hétéropolyanion-2.3

Le composé antiviral hétéropolyanion-23 (ou HPA-23 : ammonium 5 tungsto-2-antimoniate) a été initialement testé contre la Scrapie à l'époque où les EST étaient envisagés comme « des virus lents » (Kimberlin and Walker, 1979). Le HPA-23 retarde le début d'apparition des signes cliniques, lorsqu'il est administré une dizaine de jours après une infection périphérique chez les souris et les hamsters (Kimberlin and Walker, 1983) mais il n'a aucun effet sur le titre d'infectiosité de l'inoculum s'il est préincubé avec celui-ci (Kimberlin and Walker, 1986b). Les effets du traitement HPA-23 sont dépendants de la souche de prion. L'efficacité du HPA-23 en tant qu'agent anti-prion est attribuée à sa structure polyanionique plutôt qu'à son activité anti-virale à large spectre.

- Les glycosaminoglycans et leurs dérivés synthétiques
 - Les GAGs endogènes

Les glycosaminoglycans (GAGs) possèdent une architecture commune et sont constitués de polymères linéaires d'unités disaccharidiques répétées, comprenant un sucre aminé et au moins un groupe négativement chargé (sulfate ou carboxylate). Le protéoglycane endogène, héparan sulfate, est intimement associé aux dépôts de PrP^{sc} dans les EST (Snow et al., 1989) et également aux éléments protéiques d'autres dépôts amyloïdes (pour revue voir (Diaz-Nido et al., 2002)). De plus, il a été montré que l'héparan sulfate pouvait directement servir de récepteur pour la PrP^{sc}, constituant ainsi un « portail d'entrée » dans la cellule (Horonchik et al., 2005). L'héparan sulfate et l'héparine diminuent l'accumulation de PrP^{sc} dans les cultures cellulaires infectées (Caughey et al., 1994; Caughey and Raymond, 1993; Gabizon et al., 1993). Cependant, l'héparan sulfate, stimule la conversion de la PrP^c en formes protéase-résistantes dans les systèmes acellulaires (Wong et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les glycanes sulfatés ont un effet direct sur la conversion de la PrP^c, et que selon les circonstances ils peuvent agir comme des cofacteurs ou des inhibiteurs de la conversion. Le mode d'action thérapeutique des GAGs dans les cellules pourrait passer par une inhibition compétitive de l'interaction entre les molécules de GAGs endogènes et la PrP^c et/ou la PrP^{sc}, tandis que dans les systèmes acellulaires les glycanes sulfatés serviraient de cofacteurs de la conversion (Wong et al., 2001).

- Dextran sulfate (DS)

Le dextran sulfate, qui provoque un affaiblissement à court terme du système lymphoréticulaire (LRS), a été testé comme agent anti-prion après démonstration de la participation du LRS dans la pathogenèse des prions (Ehlers and Diringer, 1984). Par conséquent, le DS est surtout efficace dans les souches de prion qui se répliquent dans le LRS avant le SNC. Le DS de poids moléculaire de 500 kDa (DS500) entraîne une diminution des taux de PrP^{sc} dans les cellules infectées (Caughey and Raymond, 1993) ainsi qu'une diminution de la PrP^c présente à la surface des cellules non infectées (Shyng et al., 1995). Le DS500 retarde le début d'apparition de la maladie après administration d'une dose unique autour de la période infection chez la souris lorsque l'infection est faite par voie i.p. (Farquhar and Dickinson, 1986) et chez les hamsters il est efficace après infection par voies i.p. et i.c. (Ladogana et al., 1992). Il y a une réduction significative du titre infectieux et de l'accumulation de PrP^{sc} dans la rate pendant la période de traitement au DS500 (Kimberlin and Walker, 1986b) (Beringue et al., 2000a). La toxicité du DS500 constitue néanmoins un inconvénient majeur. Chez les souris, une mortalité de 10% est rapportée pour des animaux traités avec des doses multiples sur une période de 4 semaines

(Adjou et al., 2003). Le DS est plus efficace que les GAGs endogènes dans la prévention de l'accumulation de PrPsc dans les cellules infectées mais également dans la stimulation de la réaction de conversion *in vitro*. Les dextran non-sulfatés n'empêchent pas l'accumulation de PrPsc dans les cellules infectées (Caughey and Raymond, 1993), ce qui suggère l'importance de la sulfatation de ces molécules dans leur activité anti-prion.

- Les mimétiques des héparan sulfate

Les molécules mimant l'héparan (HM), développées initialement pour leur propriétés cicatrisantes, ont été étudiées suite à la découverte de l'efficacité du DS et d'autres glycanes sulfatés comme agents anti-prion. Les HMs sont synthétisés à partir de polymères de dextran par modification chimique des groupes hydroxyles par des groupes carboxyméthyliques, de sulfate, ou de benzylamide (Adjou et al., 2003; Schonberger et al., 2003). Les molécules HM2602 et HM5004 montrent une efficacité similaire à celui du DS500 dans la réduction de l'accumulation de PrPsc dans les cellules chroniquement infectées mais seul le HM2606 est efficace *in vivo*, entraînant une augmentation de 14% du temps d'incubation chez des hamsters infectés par la Scrapie ainsi qu'une réduction significative des taux spléniques de PrPsc chez les souris infectées (Adjou et al., 2003). Il existe une corrélation proportionnelle entre le degré de substitution des HMs par des groupes sulfatés ou hydrophobes et l'efficacité anti-prion de ces molécules (Schonberger et al., 2003).

- Pentosan polysulfate (PPS)

Le PPS qui possède des activités anti-coagulante et anti-inflammatoire, a obtenu un permis vétérinaire au Royaume-Uni pour le traitement de l'ostéoarthrite chez le chien. Dans le cadre des EST, il a été décrit que le PPS entraîne une diminution de l'accumulation de PrPsc dans des cellules infectées (Birkett et al., 2001; Caughey et al., 1994; Caughey and Raymond, 1993). Toutefois, dans les systèmes de conversion acellulaire, le PPS stimulerait la formation de la PrPsc (Wong et al., 2001). *In vivo*, le PPS provoque un retard dans l'apparition de la maladie après administration d'une dose unique autour de la période d'infection par i.p. chez la souris (Diringer and Ehlers, 1991; Farquhar et al., 1999) et il est efficace chez les hamsters aussi bien après infection par voie i.p. que par voie i.c. (Ladogana et al., 1992). Il a également été montré que le PPS administré par voie i.c.v. entraînait une augmentation de la période d'incubation chez des souris infectées par voie i.c. (Doh-ura et al., 2004). Ce traitement a été administré à l'aide d'une pompe osmotique et d'une canule intraventriculaire insérée dans l'hémisphère contra-latéral de celui utilisé pour l'inoculation. L'hémisphère traité présente des changements pathologiques moins prononcés ainsi qu'un nombre réduit de dépôts de PrPsc. Il existe une corrélation inverse

entre la durée du traitement et la prolongation de la période d'incubation. Ces résultats ont conduit à la mise en place d'essais cliniques chez deux patients atteints du variant de la MCJ (Todd et al., 2005; Whittle et al., 2006). Le PPS a été administré sur une période de 5 mois par perfusion chronique en intracérébroventriculaire à raison de 11µg/jour/kg. Toutefois, aucune action thérapeutique n'a pu être mise en évidence et les deux patients sont décédés sans présenter un allongement significatif du temps de survie par rapport aux patients non traités.

- Le rouge Congo (RC) et ses analogues

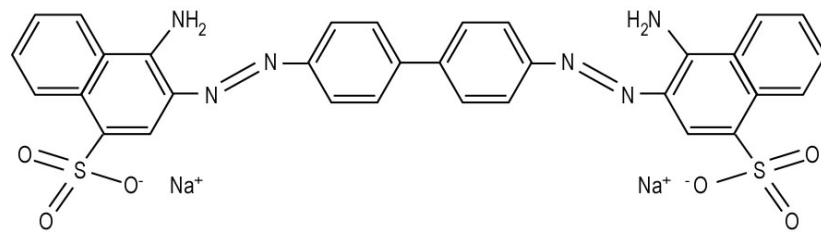


Figure 32 : Structure chimique du rouge Congo

Le RC est un colorant histopathologique couramment utilisé pour marquer les dépôts amyloïdes contenant la PrP (**Fig.32**). Le traitement des cellules chroniquement infectées avec du RC entraîne une diminution de la PrPsc, avec un IC50 compris entre le nanomolaire et le micromolaire, (Caspi et al., 1998; Caughey et al., 1993; Caughey and Race, 1992; Milhavet et al., 2000). Les neuroblastomes N2a et GT1 peuvent même être totalement débarrassés de PrPsc après un traitement avec 1µg/mL de RC (Mange et al., 2000b). Dans les systèmes de conversion acellulaires, le RC entraîne une diminution de la formation de la PrPres avec un IC50 de 8µM (Demaimay et al., 1998; Kirby et al., 2003); même s'il a également été constaté qu'à des concentrations inférieures à 0,1µM le RC stimulait la formation de PrPres. Deux études *in vivo* indiquent qu'un traitement à base de RC retarde le début de la maladie chez les hamsters suite à une administration continue commençant autour de la période d'infection (Ingrosso et al., 1995; Poli et al., 2004), bien qu'il n'y ait aucun effet sur la progression clinique de la maladie. Une autre étude indique une augmentation passagère des taux spléniques de PrPsc après traitement au RC de souris infectées par voie périphérique (Beringue et al., 2000a).

Bien que le RC soit une petite molécule, il peut s'agréger de façon importante et imiter les polyanions sulfatés de taille supérieure (Priola and Caughey, 1994). Il peut donc y avoir une similitude mécanistique avec les composés polyanioniques sulfatés. Le RC, comme les GAGs, provoque une diminution de la PrPc à la surface des cellules non infectées (Shyng et al., 1995). Le RC fait compétition à l'héparine dans sa liaison à la PrPc (Caughey et al., 1994) mais il se lie également à la PrPsc. Par sa liaison à la PrPsc, il la stabilise et de ce fait il pourrait ralentir le

processus d'amyloïdogénèse dans les cultures cellulaires et dans les homogénats de cerveaux (Caspi et al., 1998). Toutefois, le RC demeure une substance toxique, incapable de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) (Klunk et al., 1998).

- La Suramine

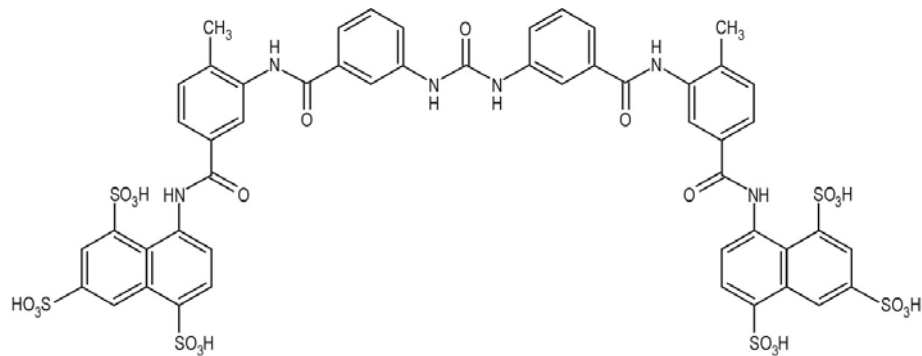


Figure 33 : Structure chimique de la Suramine

La suramine (ou urée naphthyle polysulfonée) a été initialement développée pour traiter la trypanosomiase. Elle présente par ailleurs une homologie structurale avec le RC (**Fig.33**). Une augmentation modeste du temps d'incubation a été constatée chez des hamsters traités par deux ou trois doses de suramine autour de la période d'inoculation par i.p. (Ladogana et al., 1992). Ce résultat a été reproduit chez les souris traitées par une dose unique autour de la période d'infection par i.p. (Gilch et al., 2001). La suramine entraîne une baisse des niveaux de PrPsc dans les cellules infectées (Doh-Ura et al., 2000; Gabizon et al., 1993), une baisse des taux de PrPc de surface, causant ainsi une agrégation intracellulaire de la PrP même dans les cellules non infectées (Gilch et al., 2001). La PrPc n'étant plus présente à la membrane, elle ne peut plus être convertie.

- Les oligonucléotides phosphorothioates

Quatre séries d'oligonucléotides dégénérés simple brin ont été étudiés dans différents modèles de propagation des prions (Kocisko et al., 2006b) après plusieurs études indiquant l'interaction possible des acides nucléiques avec la conversion et l'agrégation de la PrP *in vitro* (Cordeiro et al., 2001; Deleault et al., 2005). Seuls les oligonucléotides phosphorothioates sont actifs dans des modèles de cellules infectées, avec des IC50 autour de 20 nM, les autres oligonucléotides ayant un IC50 compris entre 15-90µM. L'activité d'inhibition d'accumulation de PrPsc de ces oligonucléotides est fortement dépendante de leurs tailles (les oligomères de taille supérieures à 17 bases étant beaucoup plus efficaces que les petits oligomères) mais indépendante de la composition des bases. Il a été montré que ces oligonucléotides peuvent se lier aux PrP recombinantes de souris ou de hamster et font compétition à la liaison du DS500 et du PPS. Ceci

suggère que l'action de ces nucléotides ne passe pas par une interaction avec la PrPsc. *In vivo*, des souris infectées et traitées avec ces oligonucléotides (1 à 10mg/kg) ont un temps de survie allongé d'un facteur 3 lorsqu'elles sont inoculées par voie i.p. (Kocisko et al., 2006b). De plus, le prétraitement de l'inoculum avec les oligonucléotides entraîne une diminution du titre infectieux de l'inoculum. En comparaison avec le PPS, ces randomères présentent un avantage clinique supérieur car ils possèdent une activité anti-coagulante bien moins importante à doses équivalentes.

b) Les composés polycationiques

En plus des composés polyanioniques, de nombreuses classes de composés polycationiques, dont certains constituants lipidiques des milieux de transfection, ont été identifiés en tant qu'agents anti-prions potentiels (Solassol et al., 2004; Supattapone et al., 1999b; Supattapone et al., 2001; Yudovin-Farber et al., 2005).

- Les polyamines dendritiques

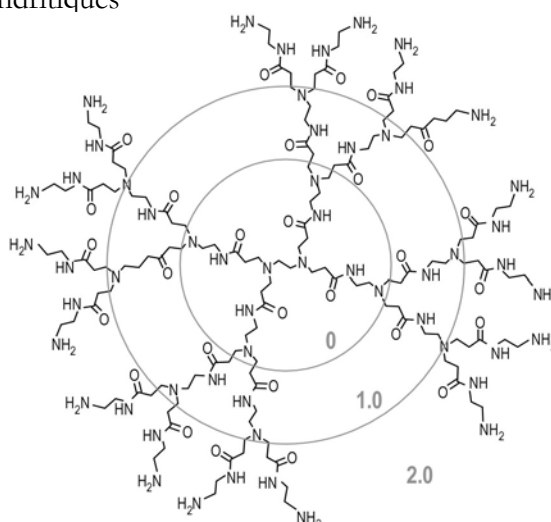


Figure 34 : Structure chimique d'un polymère dendritique de polyamidoamide de génération 2

Par une découverte accidentelle, il a été montré que l'exposition des cellules ScN2a au SuperFect entraînait une diminution des agrégats de PrPsc pré-existants et empêchait la formation de nouveaux agrégats de PrPsc avec un IC50 de l'ordre du nanomolaire (Supattapone et al., 1999b). Les composés responsables de cet effet ont été identifiés : il s'agissait des polymères dendritiques de polypropylèneimine (PPI), de polyéthylèneimine et de polyamidoamide de génération 4.0. Il existe une corrélation forte entre le degré d'embranchement, la quantité des groupements d'amine primaire et l'efficacité anti-prion de ces molécules.

Les cellules ScN2a traitées avec le PPI de génération 4.0 n'accumulent plus de PrPsc et ne sont plus infectieuses (Supattapone et al., 2001). L'exposition *in vitro* des prions de souche RML au PPI à pH 4 entraîne une désagrégation et une diminution de la teneur en feuillet β ainsi qu'une sensibilité accrue à une digestion par la PK. Compte tenu de leur localisation lysosomale *in cellulo* et de leur efficacité d'action maximale à pH acide *in vitro*, il a été proposé que les polyamines branchés agissent au niveau des lysosomes. De plus, l'effet anti-prion des polyamines peut être bloqué par la chloroquine, qui est un agent de rupture du lysosome (Supattapone et al., 1999b).

- Les autres polyamines cationiques

En raison du grand nombre d'études qui suggèrent l'importance des radeaux lipidiques des membranes cellulaires dans la réaction de conversion (Klein et al., 1998b; Taraboulos et al., 1995), l'effet de plusieurs réactifs de transfection lipidiques, capables de s'associer aux membranes, a été examiné sur la formation de PrPsc dans les cellules ScN2a (Winklhofer and Tatzelt, 2000). Le traitement avec le lipo-polyamine polycationique DOSPA a provoqué une diminution des taux de PrPsc dans les cellules en éliminant la PrPsc préexistante et en bloquant la formation *de novo* de PrPsc. Le traitement de ces cellules avec cette molécule ne modifie pas l'intégrité des microdomaines riches en cholestérol et en sphingolipide. Selon les auteurs, l'association de DOSPA à la membrane plasmique est essentielle pour son activité anti-prion.

D'autres composés polycationiques ont aussi été testés sur les cellules ScN2a, notamment des composés possédant des oligo-amines conjuguées avec du dextran oxydé ou avec d'autres polymères de sucre (Yudovin-Farber et al., 2005). Ces composés s'apparentent aux polyamines cationiques ainsi qu'aux mimétiques de l'héparine. Diverses combinaisons de polysaccharides et d'oligoamines ont été étudiées, et les résultats indiquent que les composants les plus actifs sont le dextran et la spermine, respectivement. La combinaison dextran-spermine entraîne l'élimination de toute PrPsc détectable dans les cellules ScN2a, au bout de 4 jours de traitement à 3nM.

Ni les polyamines dendritiques ni les polyamines cationiques n'affectent la production de PrPc. Leur mécanisme d'action passerait en partie par la stimulation des voies cellulaires normales de la dégradation des protéines, ce qui permettrait également la dégradation de la PrPsc (Supattapone et al., 1999b).

- c) Les composés tétrapyrroliques

Les composés tétrapyrroliques sont des effecteurs connus du changement conformationnel des protéines. Une variété de tétrapyrroles, dont les porphyrines et les phtalocyanines (**Fig.34**), ont été étudiées par Caughey et al. en tant qu'anti-prion potentiel sur les

cellules ScN2a. Il a été montré que ces molécules provoquent une diminution des taux de PrPres *in cellulo* mais aussi qu'elles interfèrent dans la propagation de la PrPsc dans les systèmes de conversion acellulaire avec une IC50 submicromolaire (Caughey et al., 1998).

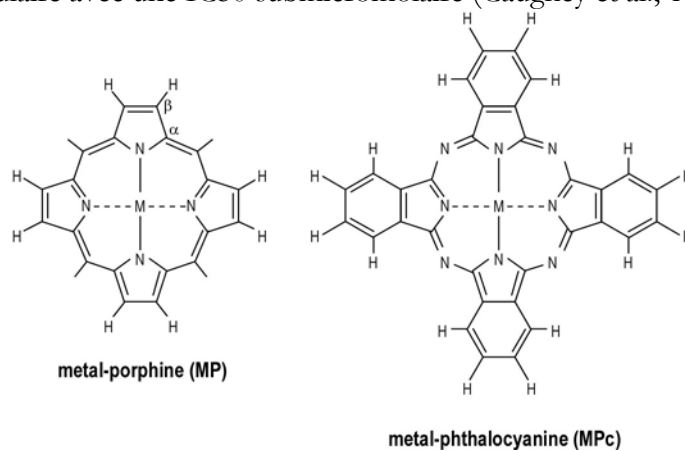


Figure 34 : Structure chimique des porphyrines et phthalocyanines métalliques

Les molécules les plus efficaces ont été testées *in vivo* (Priola et al., 2003; Priola et al., 2000). Un retard dans le déclenchement de la maladie a été constaté suite à de multiples administrations du traitement au cours du premier mois après une infection i.p., mais aucun effet significatif n'est observé après une infection i.c. Le pré-traitement des inoculums de prion avec le PcTS (phthalocyanine tétrasulfonate) entraîne également une augmentation significative de la période d'incubation. L'activité anti-prion des tétrapyrroles se mettrait en place dans les tissus périphériques lors de l'étape initiale de l'infection ou agit directement sur la PrPsc de l'inoculum en diminuant l'infectiosité.

Plus récemment, deux autres porphyrines (TSP et TAP) complexées à des ions métalliques divalents ont été testés chez la souris (Kocisko et al., 2006). Le traitement prophylactique à base de Fe-TAP chez la souris infectée par voie i.p. entraîne un allongement du temps de survie d'un facteur 4. Cependant, le Fe-TAP est inefficace si le traitement est administré au delà de 50 jours post-infection.

d) Les antibiotiques polyéniques

L'amphotéricine B (AmB, **Fig.35**) a été identifiée comme agent thérapeutique potentiel dans le traitement de la Scrapie dans les années 80 (Amyx et al., 1984). L'AmB est un antibiotique polyénique fongique dérivé du *Streptomyces nodosus*, qui agit en s'intercalant et en rompant les membranes cellulaires. Dans les cellules mammifères, il interagit avec le cholestérol et change la composition lipidique des membranes par des processus de peroxydation et d'endocytose.

Dans des culture cellulaires, l'AmB diminue la PK-résistance d'une PrP mutante (Mange et al., 2000a) et entraîne une diminution des taux de PrPsc dans les cellules neuronales infectées. Cette diminution n'est cependant pas maintenue après arrêt du traitement (Mange et al., 2000b). La Filipine, qui est un antibiotique polyénique de la famille de l'amphotéricine B, peut également réduire l'accumulation de PrPsc dans les cellules ScN2a avec un IC50 de 2µM (Marella et al., 2002). Son mécanisme d'action passe par la déstabilisation des membranes biologiques et la libération des protéines ancrées par un GPI, dont la PrP, dans le milieu de culture.

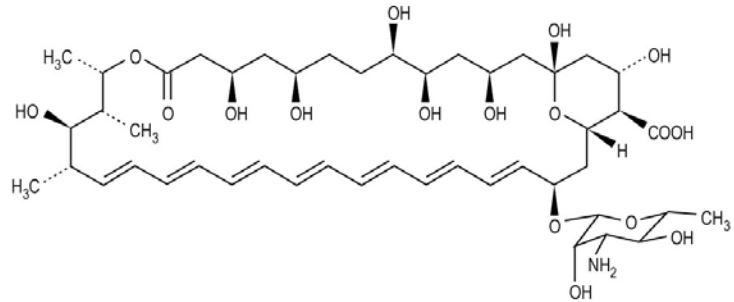


Figure 35 : Structure de l'amphotéricine B

Un traitement à base d'amphotéricine B retarde le début de la maladie chez les hamsters infectés par la souche de Scrapie 263K, aussi bien chez les animaux infectés par voie i.p. que par voie i.c. (McKenzie et al., 1994; Pocchiari et al., 1987; Xi et al., 1992). De façon remarquable, chez les souris infectées par voie i.c., le traitement est efficace même s'il est administré à un stade relativement tardif de la maladie où il y a déjà une accumulation significative de PrPsc dans le cerveau (Demaimay et al., 1994; Demaimay et al., 1997). Ces résultats ont également été reproduits chez le Hamster (Adjou et al., 2000) et suggèrent que l'AmB inhibe la propagation des prions dans les tissus cérébraux. En raison de la toxicité de l'AmB, certaines équipes ont testé l'efficacité anti-prion de molécules dérivées de l'AmB, pouvant être administrées à des doses supérieures telles que le MS-8209 ou la mépartricine. Néanmoins, ces molécules se sont avérées moins efficace que l'AmB (Adjou et al., 1995; Pocchiari et al., 1989).

e) Les composés tétracycliques

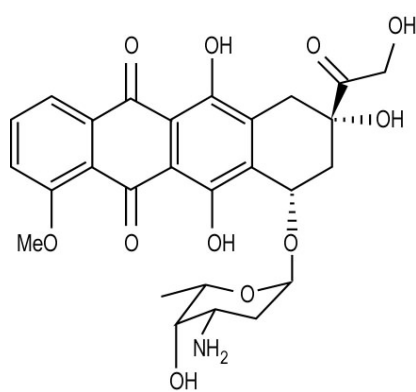


Figure 36 : Structure de l'anthracycline

L'anthracycline 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicine (IDOX) est un médicament anticancéreux dont on a découvert les propriétés anti-amyloïdogéniques lors d'un essai clinique sur des patients atteints de cancer présentant des complications avec des amyloïdoses (Gianni et al., 1995). Cette molécule (**Fig.36**) améliore la résorption des fibrilles, et peut également se lier *in vitro* à une variété de fibres amyloïdes naturelles (Merlini et al., 1995).

L'IDOX a été testé dans chez le hamster mais en raison de sa cytotoxicité élevée et de sa pénétration limitée à travers la barrière hémato-encéphalique, il a été co-administré avec l'inoculum infectieux. Ce traitement retarde le début d'apparition de la maladie et les signes histopathologiques principaux sont absents dans les premiers temps de la maladie (Tagliavini et al., 1997). Suite à cette découverte, d'autres antibiotiques tétracycliques ont été étudiés par la même équipe. La tétracycline et la doxycycline contiennent, comme l'IDOX, le RC ou les composés tétrapyroliques, un noyau hydrophobe entouré de substitués hydrophiles mais ils ont également des propriétés pharmacocinétiques et cytotoxiques améliorées. Ces deux antibiotiques sont efficaces lorsqu'ils sont préincubés avec l'inoculum avant l'infection par voie i.c. et entraînent un retard du développement des signes cliniques en réduisant le titre infectieux initial de l'inoculum (Forloni et al., 2002). La tétracycline réduit la formation de PrPres dans les essais de réplication PMCA et réduit également la quantité de PrPres détectable dans les homogénats de cerveaux infectés (Barret et al., 2003; Forloni et al., 2002; Tagliavini et al., 2000). Ces résultats suggèrent que ces composés auraient plus de potentiel en tant qu'agent de décontamination qu'en tant qu'agents thérapeutiques.

f) Les composés tricycliques

Il a été montré que le lysosome était un compartiment cellulaire potentiel du lieu de conversion de la PrPc en PrPsc. C'est pourquoi certaines équipes ont étudié les effets de divers facteurs lysosomotropiques, dont la quinacrine et la chloroquine en tant qu'agent anti-prion (Doh-Ura et al., 2000). Ces deux drogues sont utilisées dans le traitement de la malaria. La quinacrine s'est avérée être un inhibiteur efficace de la propagation de PrPsc dans les cellules infectées, avec un IC50 de 0,4 μ M. Plus tard l'équipe de Prusiner a étudié une batterie de composés tricycliques, ayant déjà obtenu l'autorisation de mise sur le marché, sur des cellules infectées (Korth et al., 2001). Les composés les plus efficaces incluent une variété de composés appartenant aux familles des acridines et des phénothiazines, dont la quinacrine (IC50 0.3 μ M) et la chlorpromazine (IC50 3 μ M). La plupart des études réalisées dans les systèmes de conversion acellulaires indiquent que la quinacrine n'a aucun effet sur la conversion de la PrPc (Doh-Ura et al., 2000; Kirby et al., 2003). *In vivo*, le traitement avec la quinacrine n'a aucun effet sur le temps d'incubation de la maladie chez les animaux infectés par voie i.c. (Collins et al., 2002; Doh-ura et al., 2004). La chlorpromazine, qui est moins efficace que la quinacrine dans les cellules infectées, entraîne un allongement du temps d'incubation chez les souris infectées par voie i.c. mais pas chez celles infectées par voie i.p. (Roikhel et al., 1984). Suite au succès des acridines *in cellulo* (Korth et al., 2001), un ensemble de bis-acridines a été développé et testé par le même groupe.

Sur une vingtaine de molécules testées, trois présentent une efficacité améliorée d'un facteur 10 (IC50 0,03 μ M) par rapport à la quinacrine (May et al., 2003). Cependant, ces composés n'ont pas été testés *in vivo*.

Une autre étude s'est intéressée à des composés qui sont apparentés à la quinacrine, mais pas aux composés tricycliques (Murakami-Kubo et al., 2004). Deux familles de composés contenant un cycle quinoline (quinine et biquinoline) ont été testées *in vitro* et *in vivo*. Même si elles font preuve d'une certaine efficacité *in vitro*, *in vivo* ces molécules, et notamment la drogue anti-malariale méfloquine, n'entraînent pas un allongement du temps de survie statistiquement significatif (Kocisko and Caughey, 2006).

g) Les peptides "β-sheet breaker"

L'utilisation de peptides « β sheet breaker » dans des modèles de la maladie d'Alzheimer (Soto et al., 1998), ont encouragé la conception de peptides similaires, capables d'interférer dans la réaction de conversion de la protéine prion (Soto et al., 2000). Un peptide « β sheet breaker » consiste en une séquence spécifique de la protéine cible dans laquelle des résidus supplémentaires de proline ont été insérés. La proline est un imino acide incapable de prendre la conformation requise par une structure ordonnée en feuillet β et sa présence, dans une séquence d'acides aminés empêche la formation de feuillet β dans ce peptide. Le peptide iPrP13 conçu par Soto et al., s'il est préincubé avec l'inoculum avant l'infection *i.c.*, entraîne une réduction de la période d'incubation des souris infectées et une diminution de la PrPres dans des cellules CHO exprimant un mutant de la PrP (Soto et al., 2000). En revanche, aucune diminution des taux de PrPsc n'a été constaté dans les cellules ScN2a chroniquement infectées et traitées avec le peptide iPrP13 (Oishi et al., 2003).

h) L'immunothérapie

- Immunisation active par la PrP ou les peptides de la PrP avant infection

Plusieurs groupes ont rapporté les effets bénéfiques, dans l'ensemble assez modestes, de l'immunisation active des souris avant infection par la Scrapie, par des peptides dérivés de la protéine prion ou par la protéine elle-même. Une prolongation d'environ 10 % du temps d'incubation est constaté chez des souris immunisées avec une protéine prion recombinante murine (résidus 23-230) mais uniquement chez les animaux immunisés avant l'infection (Sigurdsson et al., 2002). Il existe une corrélation entre le titre d'anticorps et l'allongement du temps d'incubation mais aucune différence histopathologique n'a pu être observée entre les animaux traités et les témoins au stade terminal de la maladie. En revanche, l'immunisation active avec le peptide 105-125 augmente sensiblement la période d'incubation des souris infectées par

voie orale (Schwarz et al., 2003). L'étude la plus probante est peut-être celle réalisée par Goni et al., où la vaccination orale à l'aide de *Salmonella typhimurium* exprimant une PrP murine permet un allongement significatif du temps d'incubation et une diminution de 70% de l'incidence de la maladie, chez des souris vaccinées avant une infection orale (Goni et al., 2005). Aucun signe histopathologique n'a pu être détecté chez les animaux asymptomatiques sacrifiés à 500 jours post-infection et il existe une corrélation claire entre les taux d'IgA, d'IgG et le temps de survie.

- Immunisation passive avec les anticorps monoclonaux

Deux équipes ont décrit des temps d'incubation prolongés suite à une immunisation passive chez la souris infectée. Les animaux infectés par la Scrapie par voie périphérique demeurent asymptomatiques jusqu'à 500 jours post-infection suite à l'administration d'anticorps anti-PrP ICSM 18 ou ICSM 35 par voie périphérique, reconnaissant les épitopes 144-152 et 94-105 respectivement (White et al., 2003). L'anticorps est administré à forte dose deux fois par semaine, dans le mois qui suit l'infection, pendant la phase d'accumulation splénique de PrPsc. Les conséquences du traitement sont une diminution de la PrPsc splénique à 60 j.p.i. et l'absence de PrPsc détectable dans le cerveau à 250 j.p.i. Ce traitement à base d'anticorps est néanmoins inefficace en cas d'infection intracérébrale. En apparence contradiction avec ces résultats, une autre équipe rapporte que le traitement de souris infectées par les anticorps monoclonaux 8B4 (épitope 34-52), 8H4 (épitope 175-185) ou 8F9 (épitope 205-233) n'a soit pas d'effet ou dans le meilleur des cas, il n'entraîne qu'un allongement de 10% du temps d'incubation (Sigurdsson et al., 2003). Il est cependant important de souligner que dans cette étude les concentrations d'anticorps utilisées sont 100 fois inférieures par rapport à l'étude de White et al., et que les épitopes ciblés ne sont pas les mêmes. L'utilisation de ces anticorps a été récemment proposée comme approche thérapeutique (Aguzzi et al., 2004).

- Expression transgénique 6H4 μ

L'anticorps anti-PrP 6H4 (épitope 144-152) inhibe l'accumulation de la PrPsc dans les cellules chroniquement infectées (Enari et al., 2001). L'expression transgénique de la chaîne μ de l'anticorps 6H4 a pour conséquence chez les souris hémizygotés, la présence de titre élevé d'anticorps anti-PrP et une prévention totale de la pathogenèse de la Scrapie après infection i.p. (Heppner et al., 2001b). Les taux de PrPc dans le cerveau et la rate, que ce soit avant ou après inoculation, sont les mêmes que ceux des souris contrôles, et l'expression transgénique des chaînes μ n'affecte pas les réponses des cellules B. La résistance aux prions de ces souris n'est donc pas liée à la diminution de l'expression de la PrPc ou à une immunosuppression.

2) Les cannabinoïdes : molécules anti-prions ?

a) Introduction aux cannabinoïdes

Les préparations à base de *Cannabis Sativa*, également connue sous le nom de marijuana, sont utilisées depuis des siècles à des fins médicales et récréatives. Dans les années 60, le constituant actif principal de la plante *Cannabis sativa*, le Δ^9 -tétrahydrocannabinol, (Δ^9 -THC), a été purifié et sa structure caractérisée (Mechoulam and Gaoni, 1965).

Le Δ^9 -THC est responsable des effets psychotropes associés à la consommation de cette plante. La découverte d'un système endogène de cannabinoïdes constitués d'au moins deux récepteurs (CB1 et CB2) et de deux ligands endogènes (anandamide (AEA), 2-arachidonoyl glycérol (2-AG)) a permis de mieux comprendre les effets du Δ^9 -THC sur l'organisme (Martin et al., 1999). Le système des endocannabinoïdes semble être impliqué dans le contrôle du mouvement, de l'appétit et la formation de la mémoire (Piomelli et al., 2000).



Après de nombreuses années d'investigation sur la marijuana et les cannabinoïdes en général, c'est vers la fin des années 80 que la présence d'un récepteur dans le cerveau a été décrite (Devane et al., 1988). Par la suite, il a été montré que ce récepteur, nommé CB1, appartenait à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, et que son activation entraînait l'inhibition de l'AMP cyclique (AMPC) et une inhibition des canaux calciques (Howlett et al., 1988; Matsuda et al., 1990; Pertwee, 1997). Les cannabinoïdes agissent donc *via* deux récepteurs CB1 et CB2, tous deux couplés aux protéines G (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Les récepteurs CB1 sont principalement localisés dans le SNC, même s'ils sont également retrouvés dans quelques tissus périphériques (Pertwee, 1997; Pertwee, 1998). Les récepteurs CB2 sont particulièrement présents dans les tissus du système immunitaire et dans les cellules microgliales du système nerveux central.

Les agonistes endogènes principaux des récepteurs des cannabinoïdes sont l'arachidonoyl ethanolamide (AEA), aussi appelé anandamide, et le 2-arachidonoyl glycérol (2-AG) (Devane et al., 1992; Stella et al., 1997). Les endocannabinoïdes sont des composés chimiques dérivés de l'acide arachidonique, qui sont libérés à la demande par un mécanisme dépendant de récepteurs. Ils agissent comme des messagers de signalisation rétrograde dans les synapses GABAergiques et glutamatergiques et comme des modulateurs de la transmission post-synaptique en interagissant avec d'autres neurotransmetteurs, dont la norépinéphrine et la dopamine (Miller and Walker,

1995). Les endocannabinoïdes entrent dans la cellule par un système spécifique et sont dégradés par deux enzymes bien-caractérisées, la FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) et la monoacylglycerol lipase. L'anandamide qui se lie normalement aux récepteurs CB1 et CB2, est également un agoniste du récepteur de la vanilloïde (TRPV1)(Smart et al., 2000; Zygmunt et al., 1999). Cependant, la classification actuelle des récepteurs des cannabinoïdes est probablement incomplète compte-tenu des nombreuses études qui décrivent des réponses induites par différents cannabinoïdes sur une variété de tissus n'exprimant pas les récepteurs CB1 et CB2 (Jarai et al., 1999; Zygmunt et al., 2002).

La découverte du système endocannabinoïdique a encouragé le développement d'agonistes, d'antagonistes et d'agonistes inverses spécifiques des récepteurs CB1 et CB2, afin de les utiliser potentiellement dans le traitement de certaines pathologies motrices et neurologiques. Il a ainsi été montré que l'activation des récepteurs des cannabinoïdes protège les neurones de l'hippocampe et les cellules granulaires du cervelet de l'excitotoxicité (Hampson and Grimaldi, 2001; Shen and Thayer, 1998; Skaper et al., 1996) ainsi que de l'hypoxie et de la privation de glucose (Nagayama et al., 1999). *In vivo*, les cannabinoïdes permettent de minimiser la perte des neurones hippocampiques et de réduire le volume de l'infarct après une ischémie cérébrale (Nagayama et al., 1999) ou un traumatisme crânien sévère (Panikashvili et al., 2001). Il semblerait également que les cannabinoïdes jouent un rôle important dans la maladie d'Alzheimer. Dans une étude récente, Ramirez et al. ont montré que les plaques séniles des patients contiennent les récepteurs CB1 et CB2 ainsi que des marqueurs d'activation microgliale. *In vivo*, l'administration intracérébroventriculaire du cannabinoïde synthétique WIN55,212-2 permet de prévenir l'activation microgliale, le déficit cognitif et la perte neuronale *via* un mécanisme dépendant de CB2 (Ramirez et al., 2005). Une autre étude avait déjà souligné l'implication du récepteur CB2 dans l'attraction microgliale et montré l'augmentation massive de l'expression du cannabinoïde endogène 2-AG dans les neurones ayant subi un stress cellulaire important (Walter et al., 2003). Enfin, dans un modèle murin de la Sclérose en plaque, un traitement à base de cannabinoïdes synthétiques entraîne une amélioration significative des troubles neurologiques et une réduction de l'inflammation avec diminution de l'activation microgliale et du nombre de lymphocytes T CD4+ infiltrés dans la moëlle épinière (Arevalo-Martin et al., 2003).

Parallèlement, les études sur *Cannabis Sativa* se sont intensifiées et à ce jour, plus de 66 terpenophénols structurellement proches de THC ont été extraits et purifiés à partir de cette plante. Ces molécules appartiennent toutes à la famille des cannabinoïdes et ont été classifiées en fonction de leur structure chimique en plusieurs catégories. On retrouve notamment des dérivés des molécules suivantes : Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, cannabinoïl, cannabigerol, cannabidiol, etc...Parmi

ces phytocannabinoïdes, le cannabidiol (CBD), présente un intérêt particulier : malgré une structure très proche du Δ^9 -THC (**Fig.37**), le CBD ne possède pas de propriétés psycho-actives car il présente une affinité très médiocre pour les récepteurs CB1 et CB2. Le THC, quant à lui, possède une affinité comprise entre 10 et 30nM pour ces mêmes récepteurs.

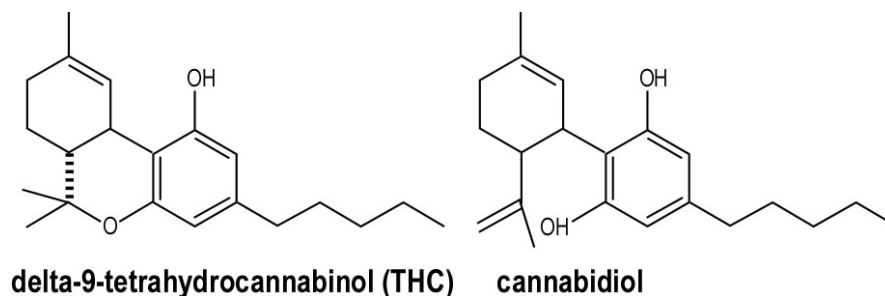


Figure 37 : Structure chimique du Δ^9 -THC et du CBD

Ces deux molécules ont fait l'objet de nombreuses études cliniques et aujourd'hui il semble admis qu'elles présentent un intérêt thérapeutique évident (Russo and Guy, 2006). Cependant, jusqu'à récemment le Δ^9 -THC n'était officiellement prescrit qu'aux patients atteints de cancer ou du SIDA et souffrant de nausées et d'amaigrissement. En effet, le THC possède une activité antiémétique et stimule l'appétit de façon plus efficace que d'autres antiémétiques connus tels que metoclopramide (Poster et al., 1981). Le THC présente également d'autres propriétés qui peuvent être utiles sur le plan médical, notamment des effets analgésiques, myorelaxants et anti-inflammatoires. Parmi les effets indésirables, on peut citer la somnolence, la perte de mémoire à court terme et une certaine euphorie. Néanmoins, si le dosage est bien ajusté, les effets bénéfiques seraient supérieurs aux effets indésirables.

Le CBD ne présente pas d'effets secondaires et présente un profil toxicologique très satisfaisant (Mechoulam et al., 2002). Sur le plan thérapeutique, le CBD possède notamment des activités anti-psychotiques (Zuardi et al., 1995), anti-oxydantes (Hampson et al., 2000) et anti-inflammatoires (Malfait et al., 2000) significatives. Les principaux effets connus de ces deux molécules ont été résumés dans le **Tableau 5**.

Effets	THC	CBD	Références
Système gastrointestinal			
Appétit	+	-	(Pertwee. et al., 2000)
Ralentissement du tractus gastrointestinal	++	+	(Pertwee et al., 2000)
Système immunitaire			
Immunomodulateur	+	+	(Malfait et al., 2000; Srivastava et al., 1998)
Anti-inflammatoire	+	+	(Hampson et al., 1998; Steffens et al., 2005)
Système cardiovasculaire			
Bradycardie	-	+	(Weil et al., 1968)
Tachycardie	+	-	(Karniol et al., 1974)
Hypertension	+	-	(Weil et al., 1968)
Hypotension	-	+	(Batkai et al., 2004)
Système nerveux central			
Anticonvulsant	+	++	(Carlini and Cunha, 1981; Wallace et al., 2002)
Myorelaxant	++	+	(Russo and Guy, 2006)
Antinociceptif	++	+	(Pertwee, 2001)
Antipsychotique	-	++	(Moreira and Guimaraes, 2005; Zuardi et al., 1995)
Antioxydant neuroprotecteur	+	++	(Hampson et al., 1998)
Agitation (maladie d'Alzheimer)	+	-	(Volicer et al., 1997)
Réduction de tics (syndrome Gilles de la Tourette)	+	?	(Muller-Vahl et al., 2003)
Traitement de la migraine	+	+	(Russo, 2004)
Dépression bipolaire	+	?	(Grinspoon and Bakalar, 1998)
Symptômes parkinsoniens	+	+	(Venderova et al., 2004)(Lasters-Becker et al., 2004)
Sclérose en plaque	+	+	(Zajicek et al., 2003)
Sclérose latérale amyotrophique	+	+	(Raman et al., 2004)
Effet anti-cancérogène	+	+	(Massi et al., 2004; Sanchez et al., 1998)

Tableau 5 : Principaux effets connus du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) et du cannabidiol (CBD).

Les effets du THC sont essentiellement attribués à son interaction avec le récepteur CB1. En effet, ses effets anti-analgésiques, anti-émétiques, anti-spasmodiques, ainsi que son effet sur l'appétit et la motilité intestinale peuvent être inhibés par des antagonistes synthétiques sélectifs du récepteurs CB1, tel que le SR141617A (Pertwee, 2000; Pertwee, 2001a; Pertwee, 2001b; Pertwee, 2002; Piomelli et al., 2000). Concernant les effets immunomodulateurs du THC, les deux récepteurs CB1 et CB2 ont été mis en causes. Si les récepteurs CB2 sont exclusivement

présents dans les cellules immunitaires, les récepteurs CB1 y sont également exprimés, bien qu'en quantité moindre par rapport au SNC. L'effet inhibiteur du THC dans l'apprêtement des antigènes par les macrophages est inhibé sélectivement par un inhibiteur sélectif du récepteur CB2 (SR144528) (McCoy et al., 1995; McCoy et al., 1999). En revanche, les deux types de récepteurs CB1 et CB2 sont impliqués dans l'inhibition de l'activité des cellules NK par le THC, responsable de la diminution de production de certaines cytokines par ces cellules dont l'IFN- γ (Massi et al., 2000).

L'existence d'antagonistes ou d'agonistes inverses spécifiques des récepteurs CB1 et CB2 ont permis de mettre à jour les mécanismes d'actions du THC. A l'échelle moléculaire, l'activation de ces récepteurs couplés aux protéines $G_{i/o}$ entraîne l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase ainsi qu'une augmentation de l'activité des MAPkinases. La protéine $G_{i\alpha}$ est responsable de l'inhibition de la production d'AMPc et conduit à une diminution de la phosphorylation de la PKA. Les dimères $\beta\gamma$ des protéines G seraient impliqués dans la régulation de l'activité de certains canaux ioniques, conduisant à l'activation de canaux potassiques et à l'inhibition de canaux calciques dépendants du voltage, et également dans l'activation de la PI3Kinase, qui à son tour déclencherait l'activation de la voie des MAPkinases. L'ensemble de ces voies médiées par les protéines $G_{i/o}$ sont bloquées par l'action de la pertussis toxine. Une autre voie liée à l'activation des récepteurs CB1 a été décrite dans les astrocytes. Le THC est capable dans ces cellules d'augmenter le métabolisme du glucose et la synthèse du glycogène. Cette activité est totalement inhibée par le SR141617A mais est insensible à l'action du PTX (Guzman et al., 2001; Guzman and Sanchez, 1999). La liaison du THC sur le CB1 conduirait par activation de la sphingomyélinase à la libération de céramide et à l'activation de la voie MAPkinases par phosphorylation de Raf-1 (Sanchez et al., 2001).

Les mécanismes d'action du CBD demeurent beaucoup plus obscures en comparaison avec la molécule de THC. Le CBD possède en effet une affinité très médiocre pour les récepteurs CB1 et CB2, et aucun récepteur de haute affinité n'a été mis à jour pour cette molécule. De plus, il n'existe aucun antagoniste capable de bloquer les effets du CBD. Toutefois, il a été montré que le CBD pouvait se comporter comme un agoniste des récepteurs vanilloïde de type 1 (VR1), récepteur de la capsaïcine (Bisogno et al., 2001). Le CBD permet de stimuler ces récepteurs avec un IC₅₀ de 3,5 μ M, entraînant une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire avec un effet maximal similaire à l'efficacité de la capsaïcine. Dans cette même étude, il a été montré que le CBD pouvait inhiber la capture de l'anandamide dans les cellules RBL-2H3. Le CBD pourrait ainsi stimuler le système endocannabinoïde de façon indirecte. Plus récemment, Carrier et al. ont montré que les effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires du CBD,

comme la diminution de sécrétion de $TNF\alpha$ induite par un traitement au LPS chez la souris, pouvaient être lié à l'inhibition du transporteur nucléotidique (ENT1) et par voie de conséquence à la stimulation de la voie de signalisation de l'adénosine (Carrier, 2006). Dans ce modèle, l'effet anti-inflammatoire du CBD est aboli chez la souris délétée du gène codant pour le récepteur A2A. Enfin, il est également possible que l'action du cannabidiol passe par des récepteurs non encore identifiés. Plusieurs études préliminaires suggèrent l'existence d'autres récepteurs cannabinoïdes, comme le récepteur sensible au cannabidiol anormal (abn-CBD) dont l'existence a été montré dans l'endothélium vasculaire (Jari et al., 1999) ou comme le récepteur orphelin GPR55 capable de lier certains agonistes connus des récepteurs CB1/CB2 comme CP55940, mais incapable de lier l'agoniste WIN55212 (Baker et al., 2006).

Grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et neuroprotectrices, le THC et le CBD constituent des molécules prometteuses dans le traitement de maladies neurodégénératives telles que la Sclérose latérale amyotrophique ou la Sclérose en plaque. Plusieurs essais cliniques ont d'ailleurs été menés sur des patients atteints de Sclérose en plaque, avec un traitement à base de *Sativex*. Il s'agit d'un médicament développé par la société GW Pharmaceuticals à base d'extraits de Cannabis qui contient un mélange de THC et de CBD. Les résultats de ces études sont assez encourageants avec une nette amélioration des troubles moteurs chez la plupart des patients et des effets indésirables limités (Vaney et al., 2004; Wade et al., 2004). Malgré un ensemble d'études précliniques encourageantes, les résultats ne sont pas encore suffisamment étayés et satisfaisants pour pouvoir recommander l'utilisation systématique des cannabinoïdes en cas de troubles neurologiques à caractère inflammatoire. Néanmoins, ils peuvent être de la plus grande utilité dans le traitement des maladies dégénératives pour lesquelles il n'existe aucun traitement efficace à l'heure actuelle.

b) Inhibition de l'accumulation de PrP^{Sc} par le cannabidiol (Article 2)

La conversion de la PrP^C en son isoforme anormale PrP^{Sc} demeure l'évènement clé des EST. Non seulement, les dépôts de PrP^{Sc} sont intimement liés aux signes histopathologiques mais il semble aujourd'hui évident que la PrP^{Sc} et l'agent infectieux ne font qu'un. Aucun traitement n'étant actuellement disponible, la recherche de composés capables de limiter la formation de PrP^{Sc} constitue donc une stratégie thérapeutique prometteuse. Certaines molécules cycliques à chaînes aromatiques hydrophobes, comme le rouge congo ou les porphyrines, inhibent l'accumulation de PrP^{Sc} *in vitro* ou dans des cellules infectées. Néanmoins, peu de ces composés ont fait l'objet d'essais thérapeutiques en raison de leur forte toxicité et de leur incapacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). Afin de tester de nouvelles

molécules «anti-prions», nous nous sommes ainsi intéressés à des molécules cycliques possédant des propriétés particulières comme la capacité à cibler le SNC et une faible toxicité reconnue. Parmi les composés répondant à ces critères de sélection, les cannabinoïdes se sont révélés des candidats intéressants. Nous venons de voir que ces molécules possèdent notamment des propriétés neuroprotectrices, anti-oxydantes et anti-inflammatoires et qu'elles semblent avoir un effet bénéfique dans des modèles de Sclérose en plaque et de la maladie d'Alzheimer. De plus, certaines de ces molécules, dont le THC et le CBD, ont déjà reçu l'autorisation de mise sur le marché même s'ils ne sont prescrits que dans des contextes bien précis (Howlett et al., 2002).

Afin de réaliser une première sélection nous avons utilisé deux modèles cellulaires bien établis, les neuroblastomes chroniquement infectés par la souche de scrapie murine Chandler (ScN2a) et la lignée de cellules épithéliales Rov9 chroniquement infectées par la Scrapie naturelle du mouton (ScRov9). Trois groupes de cannabinoïdes ont été testés *in cellulo* : (i) les deux principaux endocannabinoïdes (AEA et 2-AG), (ii) les phytocannabinoïdes THC et CBD, (iii) et enfin les cannabinoïdes synthétiques non métabolisables 2-méthylarachidonoyl-2'-fluoroéthylamide (MAFE), R(+)-methanandamide (RMA). Bien que le THC se soit montré très efficace dans la réduction d'accumulation de PrPsc dans les ScRov9, il s'est avéré totalement inactif dans les ScN2a. Nous avons montré que la seule molécule capable d'inhiber efficacement l'accumulation de la PrPsc dans les deux types cellulaires était le CBD. Cet effet est dépendant de la dose, avec une efficacité maximale à 5 μ M, et dépend du nombre de passages des cellules.

Nous avons ensuite confirmé l'effet inhibiteur du CBD sur la formation de PrPsc *in vivo* dans les cerveaux de souris infectées à 40 jours post-infection. Les souris ont été inoculées avec la souche de Scrapie murine 139A car cette souche présente un temps d'incubation plus court et moins variable que d'autres souches après infection i.p.. De façon étonnante, si l'effet inhibiteur du CBD est flagrant dans le cerveau, il est quasi-nul dans la rate. Ceci laisse supposer que l'effet du CBD est spécifique de certains types cellulaires, dont les neurones, et exclut définitivement l'implication potentielle des récepteurs de type CB2 qui sont fortement exprimés dans le système immunitaire. Toutefois l'implication des récepteurs CB1 et CB2 dans le mécanisme d'inhibition de l'accumulation de PrPsc était de toute façon peu probable en raison de la faible affinité du CBD pour ces deux récepteurs (de l'ordre du micromolaire). L'effet constaté dans le cerveau est donc certainement indépendant du CB1.

Forts de ces résultats, nous avons décidé de mener à terme les études *in vivo* afin de tester l'efficacité du CBD sur le temps de survie des souris infectées. Pour cela, deux lignées de souris ont été infectées : d'une part les souris sauvages C57Bl/6 et d'autre part la lignée transgénique tga20. Les souris tga20 sont un modèle de surexpression de la PrPc et par conséquent présentent

des temps d'incubation nettement plus courts que celui de souris sauvages. Bien que l'effet soit plus prononcé sur les souris sauvages, le traitement à base de CBD a permis d'allonger de façon significative le temps de survie dans les deux lignées infectées. De façon intéressante, des effets plus significatifs chez les souris sauvages ont été obtenus en administrant le CBD soit à une dose de 20mg/kg, 3 fois par semaine, pendant 12 semaines, soit à une dose de 60mg/kg, 3 fois par semaine, pendant 4 semaines, après infection. L'allongement du temps de survie obtenu est similaire dans les deux cas, soit une quantité totale de CBD de 720 mg dans les deux cas. L'effet du CBD est donc dépendant du dosage et de la durée du traitement. Ce traitement n'a cependant pas empêché la mort des animaux. Néanmoins, le CBD étant une molécule peu toxique, des dosages supérieurs pourraient être envisagés. De plus, l'efficacité de cette molécule dans un modèle d'infection tel que les souris tga20 est un élément très encourageant. Il s'agit en effet d'une situation extrême car ces souris accumulent des quantités massives de PrP^{sc} et ont un temps de survie de seulement 90 jours après infection. Enfin, le CBD est efficace dans l'allongement du temps de survie chez des souris sauvages lorsque le traitement est administré un mois après infection, mais pas 3 mois après celle-ci. Quand l'infection a atteint le SNC, le traitement devient inefficace.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont rapporté différents effets du CBD. Cette molécule a fait l'objet d'essais cliniques dans diverses maladies dont l'épilepsie, la maladie de Huntington ou la Sclérose en plaque. Néanmoins, ses mécanismes d'actions demeurent totalement inconnus. Nous avons tenté de comprendre les mécanismes régissant l'effet inhibiteur de l'accumulation de PrP^{sc} du CBD en testant sa capacité à déstabiliser les agrégats préformés de PrP^{sc} et sa capacité à interférer dans la réaction de conversion elle-même. Nos résultats indiquent que le CBD n'interagit ni avec la PrP^{sc}, ni avec la PrP^c, ni avec la réaction de conversion.

Les taux de PrP^{sc} accumulés sont fortement dépendants des taux de PrP^c exprimés, que ce soit dans les modèles cellulaires ou les modèles animaux. Le CBD pourrait diminuer l'expression de la PrP^c, modifier son trafic ou sa localisation intracellulaire. Par des expériences de Western-blot, de microscopie confocale et de cytomètre de flux nous avons démontré que le CBD n'entraîne aucune modification du taux d'expression de PrP^c, ni modification de sa distribution cellulaire. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus *in vivo* chez les souris infectées et traitées par le CBD, qui ne présentent aucune modification de l'expression de la PrP^c dans la rate ou le cerveau.

Des études précédentes menées au laboratoire ont permis d'établir que l'exposition de PrP^{sc} sur des neurones en culture primaire provoque le recrutement des cellules microgliales. Ces

cellules sont responsables au moins en partie, dans de nombreuses affections neurodégénératives dont les EST, de la mort neuronale par la libération de facteurs solubles cytotoxiques (Dheen et al., 2007). Par ailleurs, il a précédemment été montré que le CBD pouvait intervenir dans la régulation de la migration microgliale. Ceci nous a conduit à tester l'effet du CBD sur l'attraction microgliale induite par l'exposition de PrPsc sur les neurones. Nous avons ainsi établi par test en chambre de Boyden, que le CBD inhibait de façon très significative l'attraction microgliale. De plus, le CBD diminue très significativement la mort des neurones en culture primaire par la PrPsc. Ces résultats suggèrent que l'effet décrit *in vivo* sur le temps de survie pourrait être attribué à ses propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices décrites précédemment.

En résumé, le CBD, cannabinoïde non psycho-actif extrait de *Cannabis Sativa*, pourrait être un outil thérapeutique prometteur dans le contexte des EST car il combine plusieurs caractéristiques cruciales. En effet, cette molécule peut franchir aisément la BHE, présente une faible toxicité et pas d'effets indésirables. Dans le cadre plus spécifique des EST, nous avons montré que le CBD possède des activités « anti-prions », anti-inflammatoires et neuroprotectrices et surtout qu'il permet un allongement significatif du temps de survie de souris infectées. Cette étude constitue une première démonstration de l'efficacité d'un cannabinoïde dans le traitement des EST. La mise en place d'essais thérapeutiques ne devrait pas être exclue, même si les dosages et les voies d'administration mériteraient d'être mieux définis. De plus, le CBD est déjà commercialisé sous le nom de Sativex où il est combiné avec la molécule THC. Nous avons montré que le THC était efficace dans la prévention de l'accumulation de PrPsc dans les ScRov9. Ainsi, la combinaison de ces deux molécules pourrait avoir des effets additionnels et le Sativex pourrait également faire l'objet d'études dans le traitement des EST. Toutefois, le manque de connaissance sur les mécanismes d'action du CBD pourrait freiner la mise en place d'essais cliniques chez des patients atteints.

ARTICLE 2

“NONPSYCHOACTIVE CANNABIDIOL PREVENTS PRION ACCUMULATION AND PROTECTS NEURONS AGAINST PRION TOXICITY”

Sevda Dirikoc, Suzette A. Priola, Mathieu Marella, Nicole Zsürger, and Joëlle Chabry

Publié dans *Journal of Neuroscience* (2007)

Nonpsychoactive Cannabidiol Prevents Prion Accumulation and Protects Neurons against Prion Toxicity

Sevda Dirikoc,¹ Suzette A. Priola,² Mathieu Marella,³ Nicole Zsürger,¹ and Joëlle Chabry¹

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 6097, Centre National de la Recherche Scientifique, 06560 Valbonne, France,

²Laboratory of Persistent Viral Diseases, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana 59840, and ³Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037

Prion diseases are transmissible neurodegenerative disorders characterized by the accumulation in the CNS of the protease-resistant prion protein (PrPres), a structurally misfolded isoform of its physiological counterpart PrPsen. Both neuropathogenesis and prion infectivity are related to PrPres formation. Here, we report that the nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol (CBD) inhibited PrPres accumulation in both mouse and sheep scrapie-infected cells, whereas other structurally related cannabinoid analogs were either weak inhibitors or noninhibitory. Moreover, after intraperitoneal infection with murine scrapie, peripheral injection of CBD limited cerebral accumulation of PrPres and significantly increased the survival time of infected mice. Mechanistically, CBD did not appear to inhibit PrPres accumulation via direct interactions with PrP, destabilization of PrPres aggregates, or alteration of the expression level or subcellular localization of PrPsen. However, CBD did inhibit the neurotoxic effects of PrPres and affected PrPres-induced microglial cell migration in a concentration-dependent manner. Our results suggest that CBD may protect neurons against the multiple molecular and cellular factors involved in the different steps of the neurodegenerative process, which takes place during prion infection. When combined with its ability to target the brain and its lack of toxic side effects, CBD may represent a promising new anti-prion drug.

Key words: prion; cannabinoid; neuroprotection; scrapie-infected mice; cell-free conversion; microglia

Introduction

Scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy in cattle, and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans belong to a group of fatal neurodegenerative disorders called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases. No therapeutic treatments against TSEs are currently available. The urgent need to find effective anti-prion therapies has been strengthened by the emergence of variant CJD (vCJD) caused by contaminated beef consumption and the fact that vCJD can be transmitted via blood transfusion (Llewellyn et al., 2004). A critical event in TSE pathogenesis is the conversion of the normal protease-sensitive host prion protein (PrPsen) to an aggregated and protease-resistant form, PrPres. Both PrP isoforms are required for infection and pathogenesis (Sailer et al., 1994). Although PrPres has been recovered in various tissues such as spleen, tonsils, and muscles, tissue damage is most severe in the CNS of the prion-affected host. Intraneuronal vacuolization, severe neuronal cell death, microglia activation, and astrogliosis are the main hallmarks of TSEs. In affected brains, the amount and

location of PrPres deposits are clearly linked to histopathological lesions. Thus, the presence of PrPres is considered indicative of TSE disease.

One possible approach to TSE therapy is the inhibition of PrPres formation in the CNS. A wealth of experimental data indicates that cyclic compounds are capable of inhibiting PrPres formation *in vitro* (Caughey et al., 1998). Nevertheless, no compounds have been identified that have a therapeutic benefit after infection has reached the CNS. One possibility is that the blood–brain barrier (BBB) restricts the access of many potential anti-TSE inhibitors (Priola et al., 2000). Therefore, in searching for compounds that could be used in the treatment of prion diseases, we focused on cyclic molecules exhibiting particular properties such as the ability to cross easily the BBB, weak toxicity, and few side effects. Cannabinoids possess all of these characteristics, making them of interest as potential anti-prion drugs. Moreover, cannabinoids are neuroprotectant in a wide variety of *in vitro* and *in vivo* models of neuronal injury including neurodegenerative disorders (Lastres-Becker et al., 2005). These effects have been ascribed, among others, to antioxidant properties, NMDA antagonism, decrease in glutamate release, and blockade of microglia migration and activation (Mechoulam et al., 2002).

This background prompted us to assay a series of cannabinoid derivatives for their ability to prevent PrPres accumulation in two well established scrapie-infected cell models. We report that cannabidiol (CBD), a nonpsychoactive component of *Cannabis sativa*, inhibited PrPres formation in cells and exhibited neuroprotective activity against PrPres-induced neurotoxicity. Moreover,

Received Feb. 20, 2006; revised May 24, 2007; accepted June 13, 2007.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche “Neuroscience” (2006). We are grateful to Drs. S. Lehmann and D. Vilette for providing us with the scrapie-infected cells, N2asc⁺ and Rov9sc⁺, respectively. We thank Dr. J. Grassi for generous gifts of anti-PrP antibodies and Dr. C. Weissmann for Prnp^{0/0} mice. We especially thank Dr. P. Robson (GW Pharmaceuticals, Wiltshire, UK) for providing us with cannabidiol.

Correspondence should be addressed to Dr. Joëlle Chabry, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 6097, Université de Nice-Sophia Antipolis, Centre National de la Recherche Scientifique, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. E-mail chabry@ipmc.cnrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1942-07.2007

Copyright © 2007 Society for Neuroscience 0270-6474/07/279537-08\$15.00/0

CBD increased survival times and inhibited PrPres accumulation in the brains of scrapie-infected mice. Based on an *in vitro* conversion assay, we demonstrated that the involved mechanisms are more complicated than direct interactions between CBD and PrPres and/or PrPsen, thus defining a new class of anti-TSE compounds. Given that a number of clinical trials have underscored the potential of cannabinoids as antiemetics and analgesics as well as in the treatment of multiple sclerosis, epilepsy, and glaucoma (Ben Amar, 2006), cannabinoids would be available for immediate TSE clinical trials.

Materials and Methods

Materials. An Opti-MEM, RPMI 1640, Neurobasal, B27, G418, and penicillin–streptomycin (P/S) mixture was purchased from Invitrogen (San Diego, CA). L-Glutamine, fetal calf serum (FCS), and PBS were from BioWhittaker (Verriers, Belgium). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). All the cannabinoids were purchased from Sigma (St. Louis, MO), except CBD was from GW Pharmaceuticals (Wiltshire, UK), dissolved at 10^{-2} M in ethanol, and stored at -20°C until use.

Cell cultures. N11 microglia were grown in RPMI 1640 containing 10% FCS and P/S. Epithelial cells (Rov9) chronically infected with natural sheep scrapie (Rov9sc⁺) were grown in DMEM supplemented with 10% FCS, P/S, and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline. Neuroblastoma cells chronically infected with the murine Chandler strain (N2asc⁺) were grown in Opti-MEM supplemented with 10% FCS, P/S, and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418. PrPres-cured neuroblastoma cells (N2asc⁻) were obtained by treatment with Congo red (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for several passages.

Assay for PrP-res accumulation from N2asc⁺ and Rov9sc⁺ cultures. N2asc⁺ and Rov9sc⁺ cells were seeded at 10% confluent density in the appropriate medium and treated with the indicated concentration of drugs for 4 d (passage 1). Control experiments were performed in the presence of ethanol alone; the amount of ethanol was fixed to 1% in all conditions. Cultures were split every 4 d at a 1:4 dilution and incubated in the presence of the drug for the indicated number of passages. Confluent cultures were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 5 mM EDTA) and centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min. For detection of PrPsen, one-tenth of a postnuclear supernatant was mixed with the denaturing loading buffer. For detection of PrPres, lysates were digested with 20 μg of proteinase K (PK) per milligram of total protein for 30 min at 37°C before centrifugation at $20,000 \times g$ for 90 min. Pellets were resuspended in denaturing loading buffer, boiled, and loaded onto a 12% polyacrylamide gel. Mouse and sheep PrPres were assayed with the SAF83 or SAF70 monoclonal antibodies, respectively. Blots were developed using an enhanced chemiluminescence system (ECL; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) with a LAS3000 detector (Fuji, Tokyo, Japan). To correct for any loading artifact, blots with non-PK-digested proteins were reprobated with the anti-Erk antibody. Densitometry analyses were performed with NIH Image software on the PK-digested immunopositive band corresponding to the glycosylated PrP form, and results were expressed as a percentage of control levels.

In vivo CBD treatments. Tga20 mice, which overexpress murine PrP, and C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with 100 μl of a 2% homogenate prepared from the brains of terminally ill 139A scrapie-

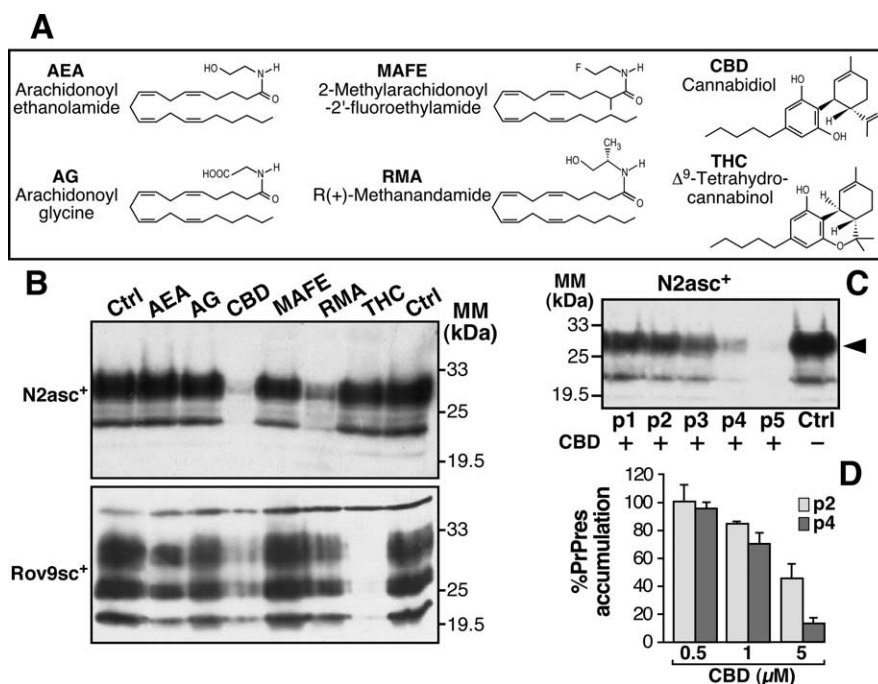


Figure 1. Effects of CBD and cannabinoid analogs on PrPres accumulation in mouse- and sheep-infected cell models. **A**, Names, abbreviations, and structures of cannabinoid derivatives used in the current study. **B**, N2asc⁺ (top) and Rov9sc⁺ (bottom) cells were treated with 5 μM of each tested drug or with ethanol alone (Ctrl). Cell cultures were passaged four consecutive times. **C**, N2asc⁺ treated with 5 μM of CBD for the indicated number of passages (p1–p5). Cultures were homogenized in lysis buffer, PK digested, and subjected to Western blotting. PK-digested mouse or sheep PrPres was assayed with SAF83 (**B**, top, **C**) and SAF70 (**B**, bottom) antibodies, respectively. Immunoblots (**B**, **C**) are representative of typical experiments. Densitometry analyses were performed on the PK-digested immunopositive band indicated by the arrowhead, and are results expressed as a percentage of control levels. **D**, Dose–response of CBD on the PrPres amount at the second (p2, light gray) and fourth (p4, dark gray) passages of N2asc⁺. The data represent the mean of four independent experiments \pm SD. MM, Molecular mass.

infected C57BL/6 mice. As a negative control, Prnp^{0/0} mice were infected under the same experimental conditions. Mice were treated intraperitoneally three times per week for the indicated period of time with 200 μl of 20 or 60 mg/kg CBD diluted 1:1:2 in an ethanol/cremophor/NaCl 0.9% mixture. A control group of scrapie-infected animals was treated only with the vehicle mixture. To evaluate the toxicity of CBD, scrapie-free mice were treated with the higher CBD dose (i.e., 60 mg/kg) three times per week for 12 weeks. As indicated, treatments began on the day of scrapie inoculation ($t = 0$) or 30 and 120 d postinoculation (dpi). Animals were monitored every 2 d, and the onset of clinical scrapie was defined when mice showed at least three of the following signs: ataxia, kyphosis, generalized tremor, swaying gait, tail stiffness.

Metabolic labeling of PrPsen. Mouse PrP expressing the epitope to the monoclonal antibody 3F4 but without the glycosylphosphatidylinositol membrane [Mo3F4(GPI^{NEG})] has been described previously (Priola et al., 2001). Mo3F4(GPI^{NEG}) was expressed in mouse fibroblast cells, and a single cell clone expressing high levels of Mo3F4(GPI^{NEG}) PrP, Mo3F4(GPI^{NEG})-F3, was derived. Mo3F4(GPI^{NEG})-F3 cells were metabolically labeled with 1 mCi of Tran³⁵S methionine/cysteine (Perkin-Elmer, Wellesley, MA), and Mo3F4(GPI^{NEG}) PrP-sen was immunoprecipitated with the 3F4 antibody as described previously (Kocisko et al., 1994).

Cell-free conversion assay. Enriched PrPres isolated from the brains of mice infected with the Chandler scrapie strain was partially unfolded in 2.5 M guanidine hydrochloride for 1 h at 37°C . For each conversion reaction, 100 ng of unfolded PrPres was mixed with 10,000 cpm (~ 1 ng) of radiolabeled and immunoprecipitated Mo3F4(GPI^{NEG}) PrPsen. Cannabinoids freshly diluted in ethanol were added to the conversion reaction to the indicated final concentration. Because ethanol alone can inhibit PrPres formation (S. A. Priola, unpublished data), the final amount of ethanol for all reactions, including the “no inhibitor” and “no PrPres” controls, was kept constant at 2.5% of the total reaction volume. This

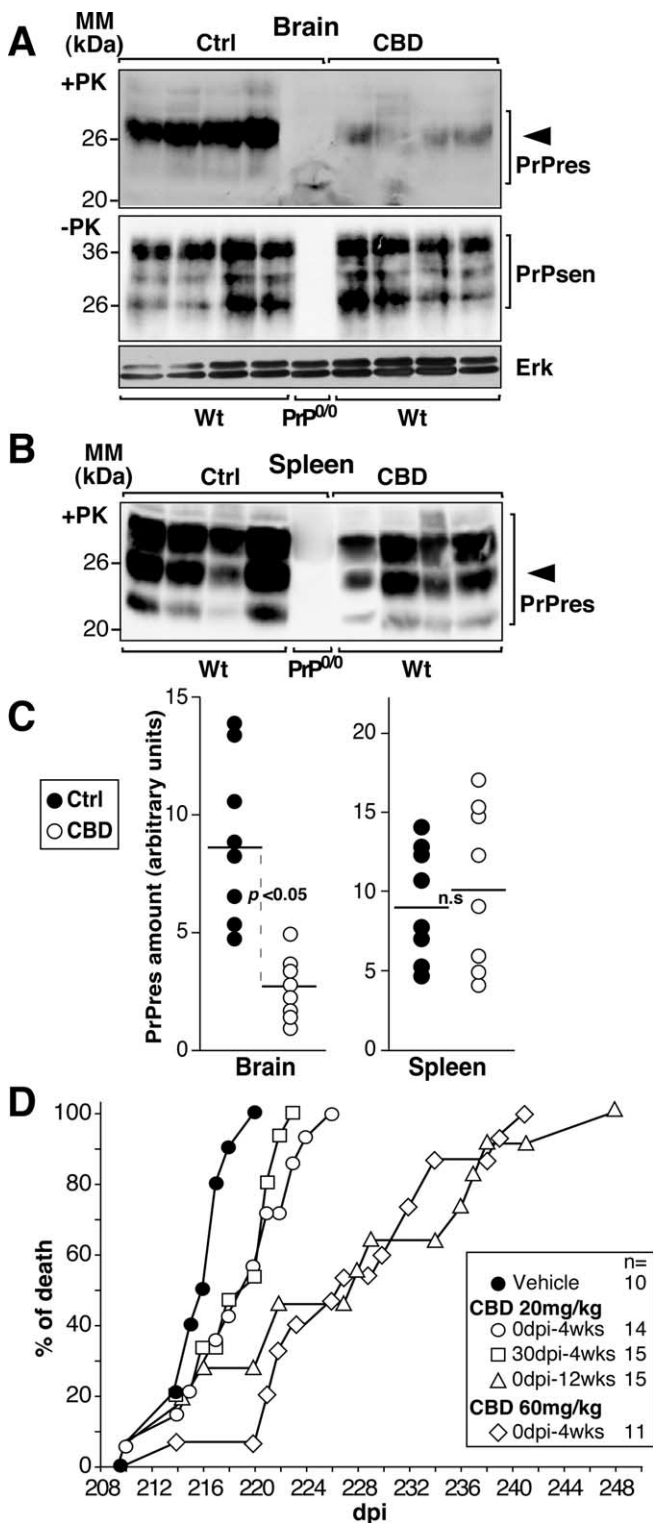


Figure 2. CBD prevents cerebral PrPres formation and prolongs prion disease incubation time in scrapie strain-infected mice. **A, B**, Western blot analyses performed on brain (**A**) or spleen (**B**) homogenates of scrapie-infected C57BL/6 wild-type (Wt) or PrP^{0/0} mice treated three times per week intraperitoneally for 3 weeks with 20 mg/kg CBD; the control (Ctrl) group of animals ($n = 8$) was treated with the vehicle alone. The treatments began the day of scrapie infection. Forty days after infection, mice were killed, and tissues were homogenized in lysis buffer. Detection of PrPsen or Erk (**A**, middle and bottom) and PrPres (**A**, top, **B**) were performed on undigested and PK-treated lysates, respectively. Four hundred micrograms (**A**, top, **B**) and 25 μ g (**A**, middle and bottom) of total proteins were loaded per lane. Densitometry analysis was performed on the band indicated by the arrowhead, and the amount of PrP was calculated as follows: mean intensity/surface \times correction factor for load as expressed in arbitrary units. MM,

amount of ethanol has a minimal effect on PrPres formation (Priola, unpublished data). Reactions with and without inhibitor were incubated in reaction buffer (0.75 M guanidine hydrochloride, 1.25% Sarkosyl, 5 mM cetyl pyridinium chloride, and 50 mM sodium citrate buffer, pH 6.0) for 2 d at 37°C. One-tenth of the reaction was methanol precipitated and used to assay the amount of total radiolabeled PrP. To determine the amount of radiolabeled PrPres formed, the remainder of the reaction was digested with 12 μ g/ml PK for 1 h at 37°C. Proteolysis was stopped by the addition of 10 mM Pefabloc and 400 ng of bovine thyroglobulin, and proteins were methanol precipitated. Radiolabeled products were analyzed by SDS-PAGE and quantified using the Storm phosphorimager system (Amersham Biosciences).

Flow cytometry analysis. N2a cells were cultured in the presence of 5 μ M CBD or with ethanol alone and trypsinated and resuspended in PBS, pH 7.4, supplemented with 0.1% BSA and 0.1% Na₃N. Alternatively, cells were fixed in Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and permeabilized in Perm Buffer III (BD Biosciences) according manufacturer recommendations. Intact or permeabilized cells were incubated with anti-PrP SAF83 antibody (1:200) in PBS–0.1% BSA for 30 min at room temperature and incubated with Alexa488-conjugated secondary antibody (1:400). Flow cytometry analysis was performed on a FACS-Calibur and the CELLQuest software. Cells were gated according to size and scatter to eliminate dead cells and debris from analysis. Experiments were repeated three times for consistency.

Confocal laser microscopy. N2a cells were cultured for four passages in the presence of 5 μ M CBD or with ethanol alone and transferred to glass coverslips. For cell-surface PrPsen detection, coverslips were washed twice with cold PBS and fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. After 20 min in PBS–5% BSA, each coverslip was incubated for 30 min in PBS–5% BSA containing the anti-PrP antibody SAF83 (1:200). Where indicated, the incubation with primary antibodies was done on permeabilized cells (i.e., in PBS–5% BSA supplemented with 0.1% Triton X-100). Cells were rinsed three times in PBS and incubated with the appropriate conjugated secondary antibodies (1:200) in PBS–5% BSA. Coverslips were mounted on glass slides with Fluoprep (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) containing 1 μ g/ml DAPI (diamidino-4’,6-phénylindol-2 dichlorhydrate) to stain nuclei. Cells were observed under a Leica (Nussloch, Germany) laser-scanning confocal microscope (SP5) equipped with a DM-IRBE inverted microscope and an argon–krypton laser. Images were acquired as single transcellular optical sections and averaged over at least four scans per frame.

Scrapie and scrapie-free homogenate preparation. N2asc⁺ homogenates (hgtsc⁺), used as a source of PrPres, were obtained in detergent-free conditions (Marella and Chabry, 2004). The preparation was up to 75% PrPres with a final concentration of \sim 20 μ g/ μ l. N2asc[–] homogenates (hgtsc[–]) from uninfected cells were PrPres free and were used as negative controls.

Neurotoxicity assay on primary cultures of neurons. Cortical neurons from embryonic day 14 mice were prepared as described previously (Marella and Chabry, 2004). Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well in 96-well tissue-plastic dishes. Neurons were grown in Neurobasal medium supplemented with B27 and 10 μ M cytosine β -D-arabino-furanoside to prevent glial growth. Cultures used after 6–8 d of differentiation were 95% neurons. Cultures were incubated with the indicated concentration of drug or ethanol alone before the addition of 5 or 10 μ l of hgtsc[–] or hgtsc⁺ (\approx 1 and 2 ng/ml PrPres, respectively). After overnight incubation, microglia were added to neurons at the ratio 1:10.

Molecular mass. **C**, Each dot represents the normalized PrPres content of a single vehicle-treated (Ctrl; ●) or CBD-treated (○) wild-type mouse. The dark line is the mean value. **D**, Days to death of infected C57BL/6 mice treated with the vehicle alone (●) or with CBD at the indicated concentration (open symbols). The starting point in days postinfection (dpi) and the duration of the treatment in weeks (wks) are indicated. Individual data points represent the percentage of dead mice out of the total number of mice infected for each group. Multiple mice may be represented by a single data point. The legend is shown on the right, and the number of mice is indicated. Significance (p) was evaluated using the nonparametric Mann–Whitney test. Differences were considered significant for p values < 0.05 . n.s., Not significant.

Table 1. CBD treatment of 139A scrapie strain-infected Tga20 mice

Treatment	Mice (scrapie sick/total)	Mean incubation time to illness (days \pm SD)	Delay (days)	Significance <i>p</i> value (Mann–Whitney test)	Mean incubation time to death (days \pm SD)	Delay (days)	Significance <i>p</i> value (Mann–Whitney test)
Vehicle only	10/10	85.3 \pm 2.7	NA	NA	88.6 \pm 1.7	NA	NA
CBD (60 mg/kg) starting at 0 dpi	9/9	91.0 \pm 4.5	5.7	0.021	94.0 \pm 4.3	5.4	0.022
CBD (60 mg/kg) starting at 30 dpi	10/10	87.0 \pm 2.2	1.7	NS	90.2 \pm 2.5	1.6	NS

NA, Not applicable; NS, not significant.

Neuronal viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium (MTS) method (AqueousOne; Promega, Madison, WI).

Microglia migration assay. The cell migration assay was performed as described previously (Marella et al., 2005). Briefly, neurons (5×10^5 cells/well) plated in 24 wells were incubated with PBS, hgtsc⁻, or hgtsc⁺ (≈ 0.2 ng/ml PrPres) in the absence or presence of CBD for 24 h at 37°C. N11 microglia were added to the top of a Boyden's chamber (5×10^4 cells/200 μ l) and allowed to migrate through polyester filters for 6 h. Cultures were then fixed with 3% paraformaldehyde and stained with crystal violet, and the cells were counted (five random fields per filter) under an inverted microscope.

Results

Effects of cannabinoid derivatives on PrPres accumulation in mouse and sheep scrapie-infected cells

We screened a series of cannabinoid derivatives for their ability to prevent PrPres accumulation in scrapie-infected cells (Fig. 1*A*). The chosen cannabinoid derivatives belonged to three different groups: endocannabinoids [arachidonoyl ethanolamide (AEA), arachidonoylglycine (AG)], natural components of *C. sativa* [Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), CBD], and synthetic nonmetabolized molecules [2-methylarachidonoyl-2'-fluoroethylamide (MAFE), *R*(+)-methanandamide (RMA)]. We used two well established scrapie-infected cell models, namely neuroblastoma cells chronically infected with the Chandler murine strain of scrapie (N2asc⁺) (Nishida et al., 2000) and epithelial cells infected with natural sheep scrapie (Rov9sc⁺) (Vilette et al., 2001). N2asc⁺ and Rov9sc⁺ cells were treated continuously with 5 μ M of each tested drug over four passages of the cells. In N2asc⁺ and Rov9sc⁺ cells, the level of PrPres accumulation was drastically reduced in the presence of CBD as estimated by Western blot analysis (Fig. 1*B*). THC was also able to reduce the level of PrPres, but only in sheep Rov9sc⁺ cells (Fig. 1*B*, bottom). In both scrapie-infected cell types, RMA induced a slight decrease in the PrPres content compared with the untreated control, whereas AEA, AG, and MAFE had no effect (Fig. 1*B*).

To assay the effect of CBD on PrPres accumulation over time, Chandler-infected N2asc⁺ were treated with 5 μ M CBD for five consecutive passages, and the PrPres level was analyzed for each passage. From the second passage, the amount of PrPres was significantly reduced in cells treated with 5 μ M CBD. Over the course of successive passages, the PrPres amount decreased progressively until it was barely detectable by the fifth passage (Fig. 1*C*). The reduction in PrPres accumulation was dependent on both the number of passages of treated cells and the CBD concentration (Fig. 1*D*). Similar effects of CBD were observed on N2asc⁺ infected with another murine scrapie strain named 22L (data not shown). In summary, CBD is a unique cannabinoid derivative able to strongly prevent PrPres formation, regardless of scrapie strain, in both mouse and sheep scrapie-infected cells.

CBD reduces the cerebral accumulation of PrPres and prolongs the survival time of scrapie-infected mice

We next addressed whether or not CBD could affect *in vivo* PrPres accumulation. This was investigated by inoculating mice

with the 139A murine scrapie strain, followed by treatment with 20 mg/kg CBD. Forty days after infection, mice were killed, and Western blot analysis was performed on brain and spleen, the crucial organs involved in TSE pathology, to detect and quantify the amount of PrPres (Fig. 2). As expected, no PrP immunoreactivity was detected in the brain or spleen of infected *Prnp*^{0/0} mice (Fig. 2) because they fail to accumulate PrPres and are known to be resistant to prion infection (Büeler et al., 1993). In the brains of CBD-treated mice, PrPres was barely detectable, whereas substantial amounts of PrPres were present in the brain of presymptomatic untreated control mice (Fig. 2*A*, top). Measurement of the amount of PrPsen in brain lysates revealed no significant change between control and CBD-treated mice, suggesting that CBD did not affect the level of PrPsen expression *in vivo* (Fig. 2*A*, middle). Surprisingly, no significant difference in PrPres accumulation was observed in spleen homogenates from control and CBD-treated animals (Fig. 1*B*). Quantification of the Western blot data confirmed that the amount of cerebral PrPres accumulation was significantly different in CBD-treated animals compared with control animals ($p < 0.05$, Mann–Whitney test) (Fig. 1*C*), whereas no significant difference was detected in the spleen.

To determine whether CBD could affect prion disease *in vivo*, we infected wild-type mice (Fig. 1*D*) by intraperitoneal inoculation with a high dose of 139A murine scrapie strain. This strain was chosen because its incubation period after peripheral inoculation is shorter and less variable than other strains (Carp et al., 1997). Starting on the day of infection (0 dpi) and continuing three times per week over a 4 week period, mice were treated with 20 mg/kg CBD. Treatment with CBD significantly increased the survival time of the infected wild-type mice compared with the vehicle-treated group ($p = 0.02$, Mann–Whitney test). Treatment over a longer period of time (up to 12 weeks) or treatment with a higher dose of CBD (60 mg/kg over 4 weeks) also led to a significant increase in the survival time of infected mice ($p = 0.003$ and 0.0003 , respectively). To determine whether CBD also inhibited prion disease progression during the later stages of infection, we began treatment of infected mice at either 30 or 120 dpi. When 20 mg/kg CBD treatment was initiated at 30 dpi, the survival time of mice was significantly increased compared with the vehicle-treated group ($p = 0.03$). However, no significant difference was observed when CBD treatment was started at 120 dpi (data not shown). Overall, CBD delayed prion disease onset in scrapie-infected mice in a time- and concentration-dependent manner.

Because of their high level of PrP expression, Tga20 mice have shorter incubation times than wild-type mice and thus were used as a rapid assay for testing inhibition of scrapie disease (Table 1). As above, Tga20 mice were infected intraperitoneally with the 139A scrapie strain and treated with 60 mg/kg CBD intraperitoneally three times per week over 4 weeks. When treatment was applied starting the day of infection, CBD significantly delayed both the appearance of clinical signs of the disease (delay, 5.7 d; $p = 0.021$) and death (delay, 5.4 d; $p = 0.022$) compared with the vehicle-treated group. When CBD treatment started at 30 dpi

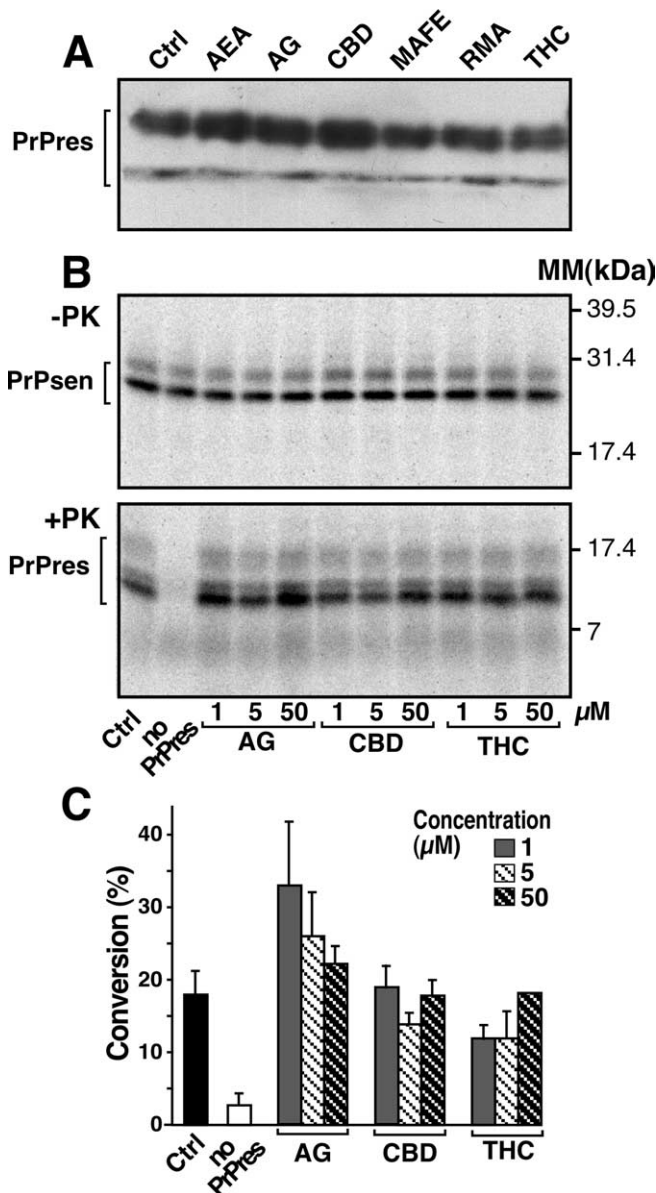


Figure 3. Cannabinoid derivatives do not interfere with sedimentation and cell-free formation of PrPres. **A**, PK-digested N2asc⁺ lysates were incubated in the presence of ethanol (Ctrl) or 10 μM of the indicated cannabinoid for 48 h at 4°C and prepared for Western blotting. **B**, Cell-free formation of PrPres using ³⁵S-Mo3F4(GPI^{NEG}) PrPsen and PrPres derived from mice infected with the mouse Chandler scrapie strain, the parent strain of 139A. An autoradiograph of an SDS-PAGE gel from a representative experiment is shown. The top panel (–PK) shows the total amount of ³⁵S-PrP in the reaction, whereas the bottom panel (+PK) shows the amount of ³⁵S-Mo3F4(GPI^{NEG})PrPres generated. The amount of inhibitor present in each reaction is indicated, and molecular mass (MM) markers are shown on the right. The brackets indicate the protein bands that were quantified for the data in **C**. **C**, Quantification of the amount of ³⁵S-PrPres formed in the presence of different concentrations of cannabinoid derivatives. Error bars represent the SEM for *n* = 3. For each individual sample, percentage conversion = amount of ³⁵S-Mo3F4(GPI^{NEG})PrPres/amount of total ³⁵S-PrP(10) × 100. Using a one-way ANOVA with Dunnett's post-test, there was no significant difference between the positive control (no inhibitor) reaction and reactions containing 50 μM of inhibitor (*p* > 0.05), whereas the control and "no PrPres" groups were significantly different (*p* < 0.01).

(approximately one-third of the incubation time), no significant delay in the progression of the disease was observed. During the time course of these experiments, no significant side effects were seen in noninfected, CBD-treated mice (data not shown). In summary, our data demonstrate that, when applied the day of

infection or as late as 1 month after infection, CBD slows down PrPres accumulation in the brains of prion-infected mice and delays the onset of terminal prion disease.

CBD does not interfere with PrPres *in vitro*

Scrapie-infected mice treated with CBD had significantly lower levels of PrPres accumulation in the brain (Fig. 2A), whereas scrapie-infected cells exposed to CBD had significantly decreased levels of PrPres (Fig. 1). These data suggested that CBD could exert its anti-scrapie effect *in vivo* either by destabilizing pre-existing PrPres aggregates or by preventing PrPres formation. We first tested the capacity of cannabinoids to destabilize PrPres aggregates *in vitro* by assaying the change in sedimentation properties of PrPres in the presence of cannabinoids (Fig. 3A). PK-digested homogenates prepared from N2asc⁺ were incubated with 10 μM of each compound for 2 d. At the end of the incubation time, the homogenates were assayed for PrPres by Western blotting. No difference in the amount of PrPres was observed in cannabinoid-treated N2asc⁺ homogenates versus untreated homogenates (Fig. 3A).

Next, the ability of CBD to directly inhibit PrPres formation was tested in a cell-free assay (Kocisko et al., 1994). AG, CBD, and THC were added in increasing concentrations to a reaction mixture containing PrPres derived from Chandler scrapie-infected mice and ³⁵S-Mo3F4(GPI^{NEG}) PrPsen, a protein known to efficiently convert to PrPres *in vitro* (Priola et al., 2001). The amount of ³⁵S-Mo3F4(GPI^{NEG})PrPres generated was then determined. A representative reaction is shown in Figure 3B. The addition of up to 50 μM CBD did not appear to significantly decrease the amount of ³⁵S-Mo3F4(GPI^{NEG})PrPres formed compared either with reactions with no inhibitor added or with reactions containing AG and THC, which have no anti-scrapie properties (Fig. 3C). These results suggest that, mechanistically, CBD does not decrease PrPres formation via direct interactions with either PrPsen or PrPres.

CBD has no influence on the expression level and subcellular location of PrPsen

It is well established that the relative level of PrPres production correlates with the level of PrPsen expression (Daude et al., 2003). Thus, we analyzed the level of PrPsen in N2a cells treated with AG, CBD, or THC over four passages. None of the tested cannabinoids, even CBD, was able to modify the PrPsen expression level (Fig. 4A). If PrPsen trafficking to the outlet plasma membrane is blocked, PrPres formation is inhibited (Gilch et al., 2001). To examine the possibility that CBD could change the subcellular distribution of PrPsen and thus affect PrPres formation, cell-surface and intracellular PrPsen was observed on unpermeabilized and permeabilized N2a cells, respectively, using both fluorescence-activated cell sorting and confocal microscopy techniques. Cells treated with CBD for two and four passages expressed the same amount of surface-bound and intracellular PrPsen as AG-treated cells (Fig. 4B). Confocal microscopy observation confirmed that CBD treatment had no significant influence on the plasma membrane expression of PrPsen compared with AG (Fig. 4C, top panels) or vehicle alone (data not shown). As well, no differences in PrPsen-positive intracellular compartments could be detected in the presence of CBD (Fig. 4B,C, bottom panels). Thus, CBD appears to have little or no influence on the expression level and cell trafficking of PrPsen.

Neurotoxicity and microglial cell migration induced by PrPres are hampered by CBD

Because some cannabinoids have been shown to exert neuroprotective effects after various experimental brain injuries, it was of interest to test the neuroprotective properties of CBD against PrPres-induced neuronal cell death in primary neuronal cell culture (Fig. 5). Neurons exposed to $hgts^{+}$ for 2 d were clearly damaged as reflected by the disappearance of normal cell bodies and the presence of fragmented neurites compared with neurons exposed to the PrPres-free N2asc⁻ homogenate ($hgts^{-}$). The addition of CBD appeared to decrease PrPres-induced neurotoxicity because the number and morphology of the neurons was similar to that observed in cells exposed to $hgts^{-}$ (Fig. 5A). Neuronal viability was also monitored by measuring the reduction in mitochondrial activity using the MTS assay. CBD treatment resulted in a concentration-dependent increase in the number of viable neurons for both concentrations of $hgts^{+}$ tested (Fig. 5B).

We previously demonstrated that neurons trigger microglial cell migration in response to PrPres exposure (Marella and Chabry, 2004). Because CBD has been shown to regulate microglia migration (Walter et al., 2003), it was of interest to determine whether or not CBD could affect this PrPres-induced chemotactic mechanism. The migration of N11 microglia toward a chamber containing neurons incubated with PBS, $hgts^{-}$ or $hgts^{+}$ was monitored in the presence of increasing concentrations of CBD (Fig. 5C). $Hgts^{+}$ -exposed neurons induced an increase in the number of migrating microglia compared with $hgts^{-}$ and PBS-exposed neurons. Importantly, no effect on the basal migration rate of microglial cells was observed with CBD alone, indicating that CBD by itself does not have *in vitro* chemotactic properties (Fig. 5C). Thus, CBD was able to impair PrPres-induced microglial cell migration in a concentration-dependent manner.

Discussion

Although the etiology of prion diseases remains uncertain, there is no doubt that pathogenesis is directly related to the formation of PrPres in the brains of TSE-affected patients and animals. Here, we demonstrate that CBD increases the survival time of scrapie-infected mice, most likely by preventing cerebral accumulation of PrPres. Given that CBD inhibited PrPres accumulation in cells infected with both murine and sheep scrapie strains, it is likely that it will be effective against different TSE agents in different species.

The mechanism by which CBD inhibits PrPres formation remains unclear. However, we were able to establish clearly that CBD does not modify the cellular trafficking and processing of PrPsen in neuroblastoma cells. Moreover, CBD does not appear to exert its anti-prion activity through the destabilization of pre-existing PrPres aggregates. PrPres can assume a variety of abnormal aggregated states with different particle sizes, conformations, and membrane interactions (Caughey and Lansbury, 2003). In

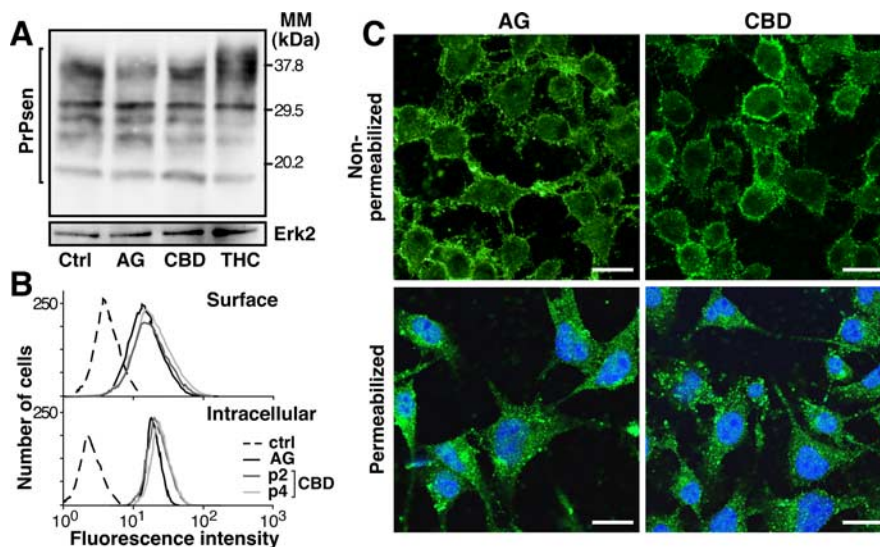


Figure 4. CBD does not affect either the level of PrPsen expression or its subcellular location. **A**, N2asc⁺ cells were treated for four consecutive passages with 5 μ M of the indicated cannabinoids or ethanol alone (Ctrl). Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting using the anti-PrP antibody SAF83. Equal loading of proteins was confirmed by reprobing the same blot with anti-Erk2 antibody. MM, Molecular mass. **B**, Flow cytometry analysis performed on intact (top) or permeabilized (bottom) N2a cells treated with 5 μ M AG or CBD for two (p2) or four (p4) passages of the cells. Surface-bound and intracellular PrPsen was revealed with monoclonal antibody SAF83 as described in Materials and Methods. The dashed line represents the fluorescence intensity measured when cells were incubated with the Alexa488-conjugated secondary antibody alone. **C**, Confocal microscopy images performed on unpermeabilized (top) or permeabilized (bottom) N2a cells treated with 5 μ M of AG or CBD as indicated. Surface-bound and intracellular PrP (green) was revealed with monoclonal antibody SAF83 and Alexa488-conjugated secondary antibody. Identical photomultiplier values and parameters of the laser-scanning confocal microscope were used for all pictures. Nuclei were stained by DAPI (diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate) and appear in blue. Scale bars, 20 μ m. **A–C** are representative experiments.

some cases, the low level of PrPres amyloid fibrils and/or plaques recovered in TSE-affected brains is not easily reconcilable with the dogma that large aggregates are responsible for neurodegeneration (Westaway et al., 1994; Chesebro et al., 2005). In fact, it is conceivable that the formation of large fibrils may be a way to sequester small neurotoxic entities in an inactivated and inert form. Thus, the precise nature of the PrPres moieties leading to neuronal malfunction and death during TSE pathogenesis remains uncertain. Growing evidence supports the idea that small PrPres oligomers and/or protofibrils may account for both the massive amount of neuronal cell death and infectivity of TSEs (Chiesa and Harris, 2001). Consequently, destabilization of large aggregates of PrPres leading to small oligomer formation could be more harmful than beneficial. In this context, the inability of CBD to break up PrPres aggregates in smaller pieces could actually be an advantage.

Compounds with cyclic structures containing hydrophobic aromatic chains or rings such as Congo red (Caughey and Race, 1992), quinacrine (Doh-Ura et al., 2000), and cyclic tetrapyrroles (Caughey et al., 1998) have been shown to decrease PrPres formation *in vitro*. These molecules bind strongly to PrP isoforms and hamper the changes in protein conformation required for PrPres formation. Based on the structural analogy, we hypothesized that CBD might act directly as an inhibitor of the conversion reaction by binding to PrPsen, PrPres, or both. Unexpectedly, we demonstrated that CBD does not inhibit PrPres formation in a cell-free assay in which the primary components are PrPsen and PrPres. It is therefore unlikely that CBD binds PrP isoforms. Rather, CBD may exert its anti-prion properties indirectly via more complicated cellular mechanisms that may be cell-type specific. The fact that inhibition of PrPres accumulation

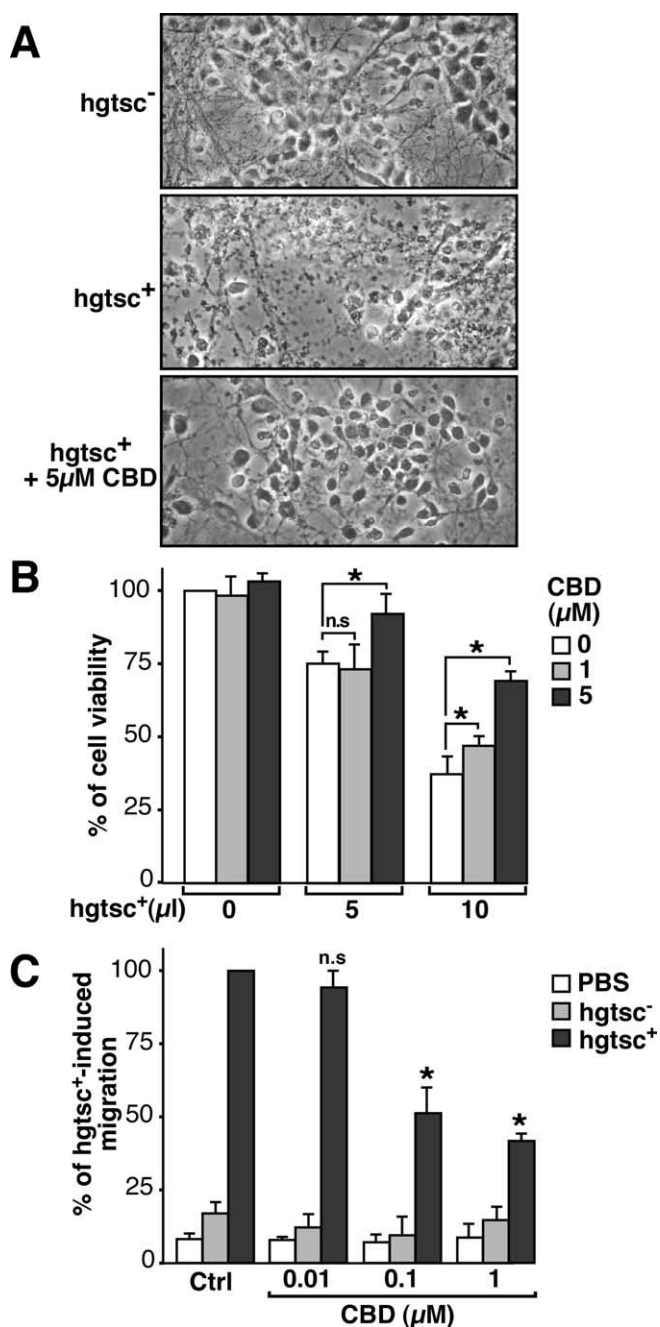


Figure 5. CBD prevents PrPres-induced neurotoxicity and microglial cell migration. **A**, Phase-contrast micrographs of representative microscopic fields. Primary cultures of neurons were incubated with 10 μ l of hgts⁻ or hgts⁺ alone or in the presence of 5 μ M CBD for 48 h at 37°C. Magnification, 25 \times . **B**, Neuronal viability was determined as a function of the concentration of hgts⁺ incubated on neurons in the absence (white) or presence of 1 μ M CBD (light gray) or 5 μ M CBD (dark gray). The data are expressed as the percentage of viable neurons compared with untreated neurons and are the mean of three independent experiments with triplicate samples \pm SD. **C**, Neurons were incubated with 5 μ l of PBS, hgts⁻, or hgts⁺ for 24 h in the absence (Ctrl) or presence of the indicated concentrations of CBD. Histograms represent the means of two independent experiments \pm SD with triplicate samples. Results are expressed as a percentage of the migration observed after exposure to 5 μ l of hgts⁺. Statistically significant differences were obtained between CBD-treated and untreated neurons exposed to hgts⁺ (* p < 0.01 using the unpaired Student's t test; n.s., Not significant).

by CBD in scrapie-infected cells is slow, requiring passage of the cells several times in the presence of the drug to see an effect, is consistent with this idea. Moreover, the idea of a mechanism of inhibition common to some cell types but not others is supported

by the finding that CBD prevents PrPres formation in the brain, but not the spleen, of scrapie-infected mice. Alternatively, CBD may also hamper neuroinvasion from the periphery to the CNS. In this instance, because of its high lipophilicity, CBD could interact with neuronal cell membranes leading to membrane modifications unfavorable to PrPres formation. Indeed, compounds that decrease the membrane cholesterol level, such as lovastatin (Taraboulos et al., 1995), have been shown to inhibit PrPres formation in scrapie-infected cells.

Several lines of evidence support the idea that reactive microglial cells could be, at least in part, responsible for the observed brain pathology in TSEs and other neurological disorders (Brown, 2001). The presence of reactive microglial cells adjacent to PrPres deposits is almost universally observed in TSE-affected brains (Guiroy et al., 1994). Moreover, PrPres aggregation and microglia activation occur concomitantly and precede neuronal cell death (Giese et al., 1998) and clinical signs of the disease (Betmouni et al., 1996). We previously demonstrated that neurons exposed to PrPres trigger the recruitment of microglia to the vicinity of the PrPres deposits. Once in direct contact with PrPres, reactive microglial cells would release diffusible neurotoxic factors, such as nitric oxide, that could lead to cell death (Marella and Chabry, 2004). Interestingly, it has recently been shown that cannabinoids prevent Alzheimer's disease pathology via the blockade of microglial activation (Ramirez et al., 2005). Similarly, we demonstrated here that CBD protected neurons against PrPres toxicity and prevented PrPres-induced microglial cell migration. Thus, CBD may modulate glial cell function, leading to a reduction in the inflammatory response that usually accompanies neurodegeneration.

Another aspect of CBD-based treatment may be related to the NMDA receptor antagonism properties of CBD (Grundy et al., 2001). PrPres may activate either directly or indirectly the NMDA receptor channel, resulting in sustained intraneuronal calcium elevation and ultimately neuronal death (Brown et al., 1997). Indeed, NMDA receptor antagonists such as memantine and MK-801 [(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5,10-imine maleate] display cytoprotective effects against PrPres-induced neuronal cell death (Müller et al., 1993). Together, our results suggest that CBD has the properties necessary to protect neurons against the multiple molecular and cellular factors involved in the different steps of the neurodegenerative processes that take place during TSE infection.

Overall, CBD is a promising therapeutic drug against the TSEs because it combines several crucial characteristics. It has a low toxicity and lack of psychotropic side effects as well as *in vivo* neuroprotective, anti-inflammatory, and anti-PrPres properties. Because CBD easily crosses the BBB, it also has the potential to be effective after prion infection has reached the CNS. Finally, prolonged treatments with CBD do not induce tolerance, a phenomenon frequently observed with THC. Additional investigations should be performed to define the optimal dose, route, frequency, and duration of the *in vivo* CBD treatment necessary to prevent TSE infection in different scrapie-infected animal models.

References

- Ben Amar M (2006) Cannabinoids in medicine: a review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 105:1–25.
- Betmouni S, Perry VH, Gordon JL (1996) Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74:1–5.
- Brown DR (2001) Microglia and prion disease. *Microsc Res Tech* 54:71–80.

- Brown DR, Herms JW, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997) PrP and beta-amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *Eur J Neurosci* 9:1162–1169.
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339–1347.
- Carp RI, Meeker H, Sersen E (1997) Scrapie strains retain their distinctive characteristics following passages of homogenates from different brain regions and spleen. *J Gen Virol* 78:283–290.
- Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267–298.
- Caughey B, Race RE (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by Congo red. *J Neurochem* 59:768–771.
- Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B (1998) Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12117–12122.
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308:1435–1439.
- Chiesa R, Harris DA (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis* 8:743–763.
- Daude N, Marella M, Chabry J (2003) Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci* 116:2775–2779.
- Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 74:4894–4897.
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8:449–457.
- Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Lucassen R, Spielhauer C, Muranyi W, Riesner D, Tatzelt J, Schatzl HM (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J* 20:3957–3966.
- Grundy RI, Rabuffetti M, Beltramo M (2001) Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 24:29–51.
- Guiroy DC, Wakayama I, Liberski PP, Gajdusek DC (1994) Relationship of microglia and scrapie amyloid-immunoreactive plaques in kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 87:526–530.
- Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370:471–474.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity *in vivo and in vitro*: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 19:96–107.
- Llewellyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363:417–421.
- Marella M, Chabry J (2004) Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24:620–627.
- Marella M, Gaggioli C, Batoz M, Deckert M, Tartare-Deckert S, Chabry J (2005) Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem* 280:1529–1534.
- Mechoulam R, Panikashvili D, Shohami E (2002) Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med* 8:58–61.
- Müller WEG, Ushijima H, Schröder HC, Forrest JMS, Schatton WFH, Rytik PG, Heffner-Lauc M (1993) Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 246:261–267.
- Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milharet O, Lehmann S (2000) Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* 74:320–325.
- Priola SA, Raines A, Caughey WS (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* 287:1503–1506.
- Priola SA, Chabry J, Chan K (2001) Efficient conversion of normal prion protein (PrP) by abnormal hamster PrP is determined by homology at amino acid residue 155. *J Virol* 75:4673–4680.
- Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25:1904–1913.
- Sailer A, Bueler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C (1994) No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77:967–968.
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avraham D, Laszlo L, Prusiner SB (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129:121–132.
- Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H (2001) Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4055–4059.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23:1398–1405.
- Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang S-L, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76:117–129.

c) Mécanismes d'actions potentiels du CBD dans les neuroblastomes infectés

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'action du CBD, nous avons tenté d'explorer différentes voies de signalisation pouvant être activées suite à l'incubation du CBD sur les neuroblastomes chroniquement infectés. Nous nous sommes principalement intéressés à la voie des MAPkinases car il a été montré dans une étude récente que l'inhibition de cette voie permettait de réduire l'accumulation de PrPres dans les cellules GT-1 chroniquement infectées par la souche de Scrapie murine RML (Nordstrom et al., 2005). L'inhibition durable du taux de PrPsc a été constatée indépendamment après traitement avec 3 inhibiteurs différents de la cascade de signalisation MEK/ERK1/2 (PD098059, UO126, et SL327). Par ailleurs, plusieurs études ont indiqué une activité inhibitrice du CBD sur la voie des MAPkinases et en particulier sur l'activité de la phospho-protéine p38 (El-Remessy et al., 2006; Esposito et al., 2006). Selon Esposito et al., le CBD protège les cellules PC12 de la toxicité du peptide A β en inhibant p38.

Nous avons donc décidé dans un premier temps, de suivre l'évolution de l'état d'activation des protéines ERK1/2 au cours de passages succesifs sur les ScN2a traités par 5 μ M de CBD. Nous avons traité en parallèle les cellules avec d'autres cannabinoïdes à la même concentration, comme le 2-AG ou le THC, sans effet inhibiteur sur l'accumulation de PrPsc. De façon surprenante, nos résultats ont indiqué une activation par phosphorylation des protéines ERK1/2 exclusivement dans les cellules traitées avec le CBD (**Fig. 38, A**) et cette activation est de plus en plus soutenue au fil des passages (**Fig. 38, B**).

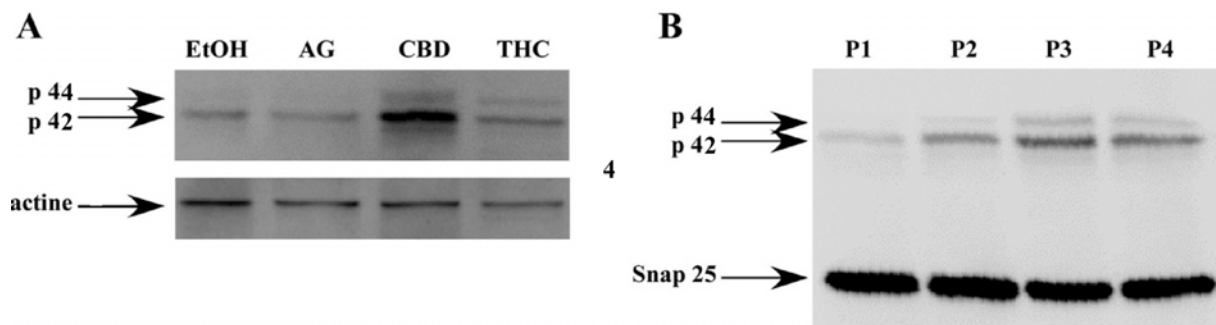


Figure 38 : Activation de ERK (p44/42) dans les neuroblastomes traités par le cannabidiol. (A) Les ScN2a sont traités sur 3 passages par 5 μ M de 2-AG, de CBD ou de THC ou par l'éthanol. Après lyse des cellules, 200 μ g de protéines totales ont été déposées dans chaque puits et séparées par migration sur gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide. Après transfert des protéines sur membrane de PVDF, la détection de ERK phosphorylé a été effectuée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, ref. 9106) dilué au 1/1000^{ème}. Après révélation, la membrane a été déshybridée et incubée avec un anticorps polyclonal dirigé contre la β actine dilué au 1/1000^{ème} (Cell signalling, ref. 4967). (B) Les ScN2a sont traités pendant 4 passages par 5 μ M de CBD et à chaque passage une partie des cellules traitées ont été lysées. 150 μ g de protéines totales ont été déposées dans chaque puit. La charge des protéines a été vérifiée par révélation de la protéine SNAP25. La description complète du protocole de Western-blot est disponible dans la section matériel et méthode dans la publication Dirikoc et al., 2007.

Nos résultats semblent en contradiction avec ceux décrits dans l'étude de Nordstrom et al., puisque les cellules ScN2a traitées par le CBD présentent une augmentation de la phosphorylation de ERK en association avec une diminution de l'expression de PrPsc. Toutefois, les modèles cellulaires ainsi que les souches de Scrapie utilisés sont différents. Les cellules GT-1 sont une lignée hypothalamique issue du SNC alors que les neuroblastomes sont issues du système nerveux périphérique. De plus, l'activité du CBD peut être variable selon les tissus considérés. Ainsi, il a été décrit que le CBD pouvait stimuler la relaxation des muscles lisses vasculaires en stimulant la phosphorylation de ERK (Su and Vo, 2007).

La voie de signalisation des MAPkinases est impliquée dans la croissance cellulaire. L'activation de cette voie peut entraîner une prolifération et/ou une différenciation cellulaire. La régulation temporelle de l'activation de ERK joue souvent un rôle clé dans l'orientation vers la prolifération ou la différenciation (pour revue (Chambard et al., 2007)). Des expériences menées sur la lignée PC12 illustre bien la différence entre une activation transitoire et soutenue de ERK (Dikic et al., 1994; Traverse et al., 1994). La stimulation de ces cellules par le NGF (nerve growth factor) entraîne l'arrêt de leur prolifération et une différenciation neuronale tandis qu'une stimulation par l'insuline ou par l'EGF (epidermal growth factor) augmente la prolifération cellulaire. Le NGF induit une activation soutenue de ERK alors que l'insuline ou l'EGF induisent une activation transitoire. Nous avons donc dans un deuxième temps étudié l'influence du traitement par le CBD sur la croissance et la morphologie des neuroblastomes (**Fig. 39**).

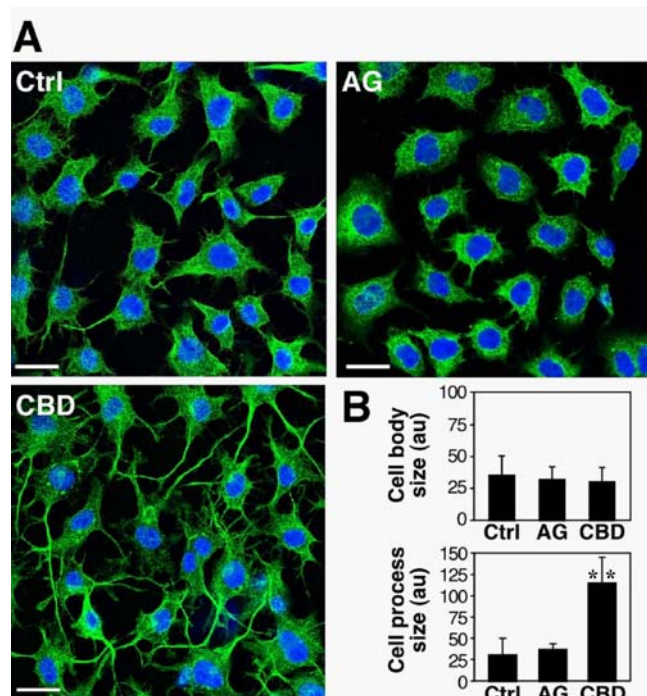


Figure 39 : Influence du cannabidiol sur la morphologie cellulaire des neuroblastomes. (A) Analyse en microscopie confocale de ScN2a traitées sur 3 passages avec 5µM de CBD, de 2-AG ou avec 5µL d'éthanol. La morphologie cellulaire est visualisée grâce au marquage de la β tubuline (en vert). Brièvement, après fixation en PBS-PAF 2%, les cellules sont perméabilisées en PBS-Triton 0,1% , puis sont marqués avec l'anticorps monoclonal anti- β tubuline (concentration 2,5 µg/mL Becton Dickinson, clone 5H1,) puis avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au FITC (Molecular probes, référence A-11001, concentration finale 5µg/mL). Le colorant DAPI, rajouté dans le liquide de montage (Mowiol) permet de visualiser les noyaux (bleu). (B) La taille des corps cellulaires et des prolongements dendritiques a été évalué par analyse sur des images sur le logiciel NeuronJ. Ces résultats représentent les moyennes obtenues sur 3 expériences répétées (** $p < 0,01$ selon le test de student). Barre d'échelle 50µm.

Nos résultats indiquent que le CBD provoque une différenciation des neuroblastomes avec une augmentation significative de la taille des prolongements dendritiques. Cet effet de différenciation, comme pour l'activation de ERK, s'accroît au cours du temps et il est clairement mis en évidence par microscopie confocale à partir du 3^{ème} passage (**Fig. 39**). Les cellules traitées par l'éthanol ou par le 2-AG ne présentent pas de modification morphologique. Nous avons également constaté un ralentissement de la croissance cellulaire (résultats non montrés). Il est possible donc que le CBD, par une activation soutenue et prolongée de ERK, oriente les neuroblastomes vers une voie de différenciation.

La dernière étape de ce travail consistait à faire le lien entre la stimulation de la voie des MAPkinases par le CBD et son activité inhibitrice sur l'accumulation de PrPsc. Pour cela, nous avons cultivé les ScN2a traitées par le CBD, en présence ou en absence d'un inhibiteur spécifique de la voie des MAPkinases : le PD98059. Nous avons d'abord vérifié qu'en présence du PD98059, l'activation de ERK par le CBD est totalement inhibée. Néanmoins, l'effet inhibiteur du CBD sur l'accumulation de PrPsc n'est nullement influencé par le PD98059 et donc indépendant de l'inhibition de la voie des MAPkinases (**Fig. 40**).

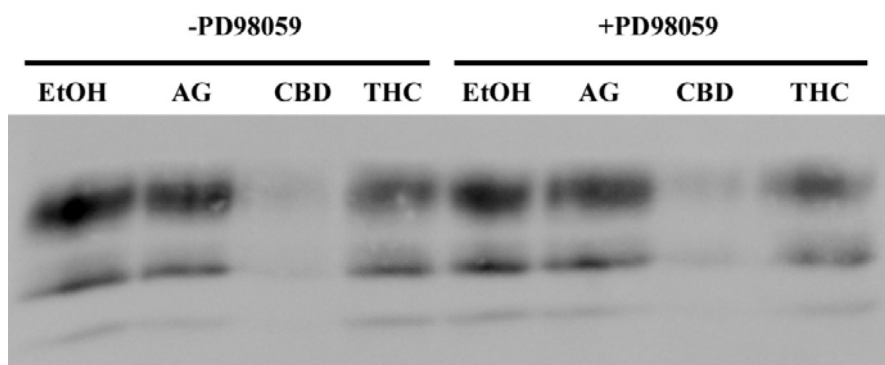


Figure 40 : Le cannabidiol inhibe l'accumulation de la PrPsc indépendamment de la voie des MAP kinases. Les neuroblastomes ScN2a sont traités sur 3 passages avec 5 μ M de 2-AG, de THC et de CBD en présence ou en absence de l'inhibiteur de la voie de MAPKinase PD98059 (25 μ M). Les lysats cellulaires sont attaqués à la protéinase K, avant d'être déposés sur gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide et la PrPsc est détectée avec l'anticorps SAF83. Le protocole détaillé du Western-blot est disponible dans la section matériel et méthodes de la publication associée à ce travail (Dirikoc et al., 2007).

Il apparaît donc dans notre modèle que l'accumulation de PrPres est indépendante de l'état d'activation de ERK et de la voie des MAPkinases. Le CBD exerce donc de multiples effets sur les neuroblastomes chroniquement infectés, mais ses mécanismes d'action dans la différenciation cellulaire et dans son activité « anti-prions » semblent indépendants. En définitive, les mécanismes d'actions du CBD qui n'interagit ni avec la PrPsc, ni avec la PrPc, ni avec la réaction de conversion, demeurent inconnus.

IV/Implication du système immunitaire et du système nerveux périphérique dans la propagation de la PrPsc jusqu'au système nerveux central

La série d'événements déclenchée par une infection périphérique de prions, généralement caractérisée sous le terme de « pathogenèse périphérique des prions », contribue à considérer les prions comme une catégorie d'agent infectieux différents de tous les autres pathogènes connus. Tandis que la plupart des bactéries, parasites, et virus déclenchent des réponses immunitaires innées et/ou adaptatives, le système immunitaire des mammifères semble être remarquablement tolérant envers les prions (absence d'infiltrats inflammatoires, ou d'anticorps anti-PrPsc). Cependant, les organes lymphoïdes participent de façon primordiale à la pathogenèse des EST, notamment en accumulant d'importantes concentrations de l'agent infectieux au début de la maladie. De plus, divers types d'immunodéficience peuvent abolir la pathogenèse périphérique des prions, lorsque ces derniers sont inoculés de façon périphérique. La participation du système immunitaire dans les EST est aujourd'hui incontestable, et plus particulièrement dans le cheminement qui mènent les prions des sites d'entrée périphérique jusqu'au cerveau. Néanmoins le rôle précis de chaque type cellulaire (lymphocyte B, cellule folliculaire dendritique, cellule dendritique,...) n'est pas encore totalement élucidé.

A/ Les infections par voie périphérique

Dans les infections naturelles, l'infectiosité se transmet majoritairement par voie périphérique. L'épizootie d'ESB a mis en évidence l'efficacité de l'exposition orale comme vecteur de transmission. La consommation de viande bovine contaminée a provoqué l'apparition du variant de la MCJ chez l'Homme.

Les EST sont transmissibles aussi bien par voie orale (Anderson et al., 1996), par injection intraveineuse et intrapéritonéale (Kimberlin and Walker, 1978), par instillation conjonctivale (Scott et al., 1993), ou injection intra-oculaire (Fraser, 1982). D'une manière générale, le temps d'incubation est prolongé lors d'une infection par voie périphérique en comparaison avec la voie i.c.v. : les souris de type C57Bl/6 infectées par 6 log LD50 d'unités infectieuses de la souche RML présentent un temps d'incubation d'environ 150 jours après infection par voie i.c.v. et d'environ 230 jours après infection par voie orale ou i.p. (Prinz et al., 2003). De façon intéressante, qu'il s'agisse d'une infection par voie i.c.v. ou par voie i.p., dans la majorité des cas la PrPsc s'accumule dans les organes lymphoïdes et notamment dans la rate, avant de se propager au système nerveux (Kimberlin and Walker, 1989). La réplication de la PrPsc a lieu dans de nombreux sites du système lympho-réticulaire, dont la rate, les ganglions

lymphatiques, les plaques de Peyer (PPS) et les amygdales (Beekes and McBride, 2000; Fraser and Dickinson, 1970; Fraser and Dickinson, 1978; Hill et al., 1997b) (**Fig.41**).

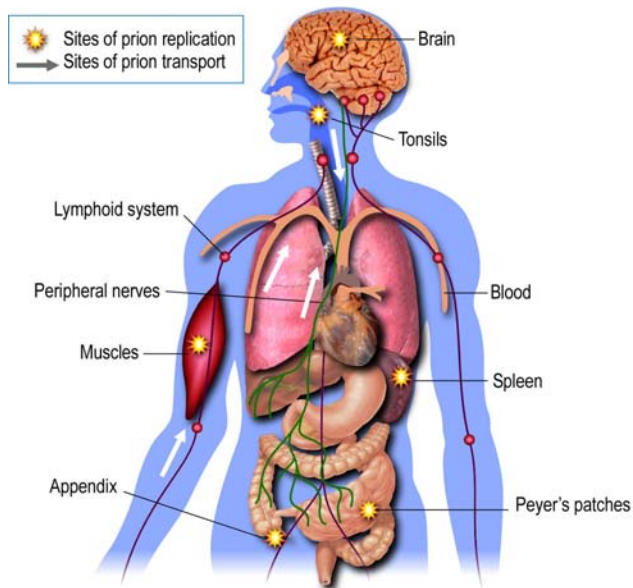


Figure 41 : Tissus impliqués dans la propagation et le transport de la PrPsc chez l'Homme

Les prions ingérés par voie orale sont absorbés à travers la paroi intestinale et transportés dans le sang et les fluides lymphatiques. Après l'étape de réplication périphérique dans la rate, l'appendice, les amygdales et les autres tissus lymphoïdes, les prions sont transportés au cerveau essentiellement par les nerfs périphériques. *D'après Aguzzi et al., 2006.*

Néanmoins, les profils de distribution spatio-temporelle des prions sont dépendants de la souche de prion, des doses utilisées ainsi que du fond génétique des souris infectées. Par exemple, dans les cas d'ESB, il y a très peu d'accumulation de PrPsc dans les tissus lymphoïdes des bovins, alors que les individus atteints de vMCJ accumulent des quantités substantielles de PrPsc dans la rate, les amygdales et l'appendicite.

Après une inoculation périphérique de souris C57BL/6 avec la souche de prion RML, l'infectiosité et la PrPsc augmentent progressivement dans la rate et les ganglions lymphatiques à partir de 40 jours post-infection (j.p.i.), et atteignent un plateau au bout de 6 à 9 semaines. L'infectiosité dans le cerveau n'est détectée que bien plus tard, 4 à 5 mois après l'inoculation (Bruce, 1985; Kimberlin and Walker, 1979b). Même après une inoculation i.c.v. avec la souche RML, l'infectiosité est détectée dans les rates des souris à 4 j.p.i. (Bueler et al., 1993). En effet, la PrPsc splénique est détectable dès la 1^{ère} semaine post-inoculation et persiste tout au long de la période d'incubation. De façon surprenante, la présence de titres infectieux élevés dans les organes lymphoïdes n'entraîne pas de changement histopathologique significatif (Clarke and Haig, 1971).

Dans les EST, il existe une période de latence très longue entre le moment de l'infection et la manifestation clinique de la maladie. Cette particularité pourrait constituer un atout thérapeutique, puisqu'elle laisse une fenêtre de temps pour intervenir avant que l'infection n'atteigne le SNC et que les dommages cérébraux ne surviennent. Au cours de la période d'incubation se produit la neuro-invasion, processus permettant à l'infectiosité d'atteindre le SNC

à partir du site d'entrée périphérique (Aguzzi, 1997; Nicotera, 2001). Ce processus est constitué de deux étapes : la lymphoinvasion puis la neuroinvasion. L'interruption de ce processus de neuroinvasion pourrait permettre de limiter la neurodégénérescence. Mais cette stratégie requiert une connaissance approfondie des différents acteurs de ce processus, et notamment des types cellulaires responsables de la réplication et du transport de l'agent infectieux.

B/ Lympho-invasion et Neuro-Invasion

1) Lympho-invasion

a) Mise en évidence de l'importance des organes lymphoïdes secondaires

La splenectomie, avant ou peu après une infection périphérique, permet de prolonger significativement la durée de vie des souris infectées par la Scrapie (Fraser and Dickinson, 1970) et l'absence des plaques de Peyer retarde la neuroinvasion des souris infectées par voie orale (Fraser and Dickinson, 1978). En revanche, la thymectomie est sans conséquence sur la progression de la maladie (Clarke and Haig, 1971). La pathogenèse périphérique est néanmoins indépendante du compartiment lymphoïde une fois que l'agent infectieux a atteint la moelle épinière (Kimberlin and Walker, 1989). Cependant, la réplication splénique n'est pas une condition *sine qua none* dans tous les modèles d'EST chez les rongeurs : chez des hamsters syriens ayant subi une splenectomie puis infectés par voie i.p. avec la souche 236K, la neuroinvasion se produit malgré l'absence de réplication de PrPsc dans le système lympho-réticulaire (Kimberlin and Walker, 1986a). De plus, la splenectomie n'a aucune influence sur le temps d'incubation de souris infectées avec une souche adaptée de MCJ (Mohri et al., 1987).

La séparation de la pulpe du stroma dans la rate suggère que la quantité d'infectiosité présente dans le stroma est dix fois plus élevée que celle présente dans la pulpe blanche. D'ailleurs, l'infectiosité de la fraction stromale est directement corrélée au poids de rate entière et au poids du stroma. Le compartiment stromal serait donc le site de réplication de l'agent infectieux (Clarke and Kimberlin, 1984), et les cellules impliquées dans la réplication ne sont pas actives sur le plan mitotique (Fraser and Dickinson, 1978). De ce fait, l'irradiation sub-létale, visant préférentiellement les cellules actives sur le plan mitotique, n'a pas d'incidence sur la période d'incubation de la maladie (Fraser and Farquhar, 1987).

b) Implication des cellules du système immunitaire

- Réplication de l'agent infectieux dans les cellules du système immunitaire

Dans les tissus lymphoïdes, la PrPsc s'accumule principalement dans les centres germinatifs des follicules B au niveau des cellules folliculaires dendritiques (FDC)(Kitamoto et al.,

1991). Les FDC résident au sein des follicules primaires des cellules B et dans les centres germinatifs des tissus lymphoïdes. Les FDC appartiennent à une lignée distincte des cellules dendritiques myéloïdes puisqu'elles dérivent de précurseurs stromales non-hématopoïétiques. De plus, les FDC ne sont ni des cellules circulantes, ni des cellules phagocytaires. Morphologiquement, ces cellules présentent de nombreux prolongements dendritiques et s'étalent sur une grande surface, ce qui leur permet de capter et de retenir les antigènes sous leur forme native. Comme les FDC ont une durée de vie importante, les antigènes peuvent être retenus sur ces cellules pendant des mois, voire des années (Mandel et al., 1980). Les antigènes non apprêtés sont retenus à la surface des FDC sous forme de complexes immuns. La membrane plasmique des FDC est équipée pour piéger ces complexes *via* les récepteurs des fragments Fc des anticorps et les récepteurs du complément CR1 et CR2 (Yoshida et al., 1993). Il est probable que l'association intime des FDC avec les lymphocytes B ait une grande importance dans la génération d'anticorps de haute affinité et dans le maintien de la mémoire immunitaire.

A la surface des FDC, la PrPsc s'accumule sur le plasmalemme et au niveau des espaces extracellulaires autour des dendrites (Jeffrey et al., 2000b). L'accumulation de l'agent infectieux des EST dans les FDC est cruciale puisqu'en absence de FDC, la neuroinvasion est retardée et que l'incidence de la maladie est diminuée (Mabbott et al., 2000a; Mabbott et al., 2003; Montrasio et al., 2000). Les lymphocytes B sécrètent des cytokines comme la lymphotoxine $LT\alpha_1\beta_2$ et le $TNF\alpha$ qui contribuent à maintenir la différenciation des FDC (**Fig.42**) (Mackay and Browning, 1998). Dans l'étude réalisée par Klein et al. en 1997, les auteurs ont montré que des souris transgéniques déplétées en lymphocytes B (μ MT) ne développaient pas d'EST après inoculation périphérique (Klein et al., 1997), suggérant que les lymphocytes B jouent un rôle crucial dans la pathogenèse des prions. Mais il s'agit en fait d'un rôle indirect, car les souris dépourvues de cellules B ou des cytokines $LT\alpha_1\beta_2$ et $TNF\alpha$ sont également dépourvues de FDC différenciés et fonctionnels et n'accumulent donc pas de PrPsc dans leurs tissus lymphoïdes (Mabbott et al., 2000b; Prinz et al., 2002). Les auteurs s'accordent aujourd'hui à dire que le rôle principal dans l'accumulation de la PrPsc dans la rate revient aux FDC (Aguzzi and Heikenwalder, 2006; Mabbott and MacPherson, 2006). Les composés qui bloquent les voies de signalisation des récepteurs de la lymphotoxine $LT\beta$ ou du TNF , provoquent une déplétion temporaire des FDC et réduisent la susceptibilité à une infection périphérique par l'agent des EST (Mabbott et al., 2000a; Mabbott et al., 2002; Mabbott et al., 2003; Mohan et al., 2005a; Montrasio et al., 2000). De tels composés pourraient avoir un potentiel thérapeutique mais ne seraient efficaces que dans une très courte fenêtre de temps après l'infection. Les cellules doivent exprimer des taux de PrPc élevés pour pouvoir soutenir et propager l'infection (Bueler et al., 1993) et les FDC expriment

des taux importants de PrPc (Brown et al., 1999). Les lymphocytes, en comparaison avec les FDC, expriment des niveaux bien plus bas en PrPc (Barclay et al., 2002). L'accumulation de PrPsc dans la rate et la neuroinvasion ne sont pas compromises en l'absence de PrPc dans les lymphocytes (Brown et al., 1999b; Klein et al., 1998a).

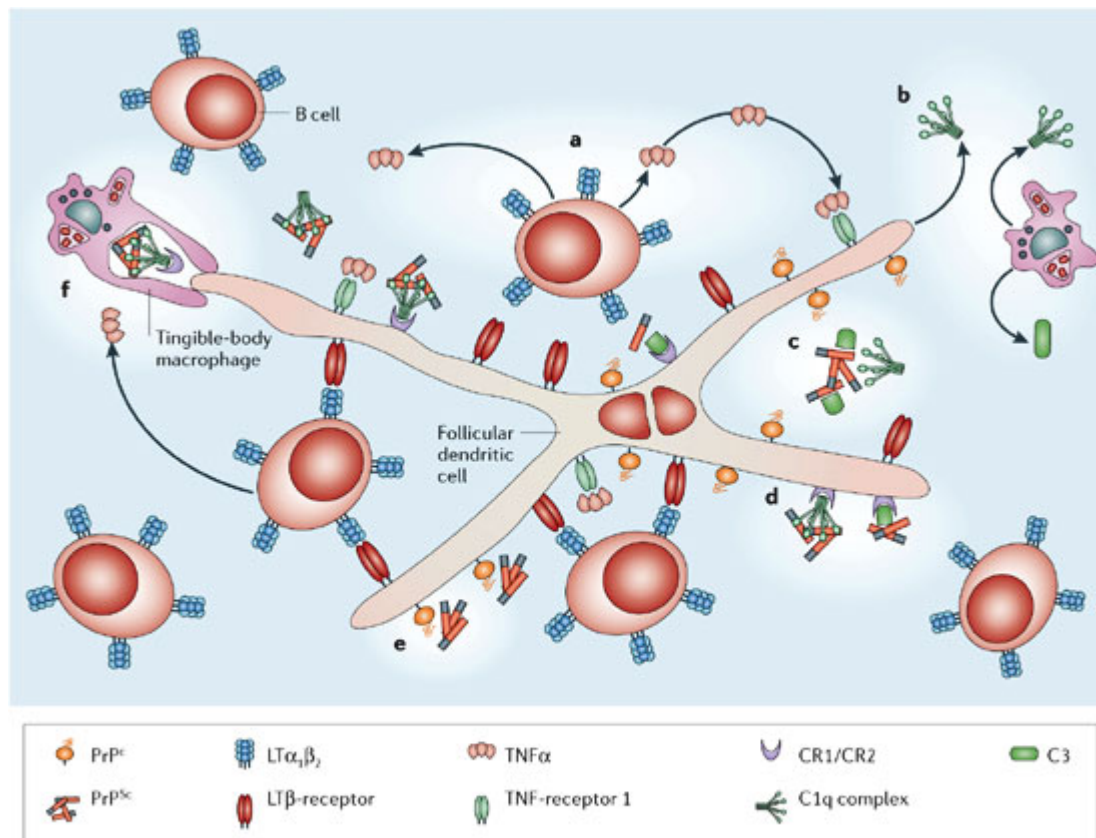


Figure 42 : Modèle des mécanismes moléculaires et cellulaires de la pathogenèse des EST dans les tissus lymphoïdes. a) Les cytokines produites par les cellules B permettent la maturation des FDC et contribuent à les maintenir dans un stade différencié. En absence de cellules B, ou des cytokines lymphotoxine $LT\alpha_1\beta_2$ et $TNF\alpha$, les FDC ne peuvent devenir matures et l'accumulation de l'agent infectieux dans les tissus lymphoïdes est altérée. **b)** La façon par laquelle les FDC acquièrent l'agent infectieux est incertaine. Une déficience des composants du complément, dont C1q et C3, altère l'accumulation de la PrPsc dans la rate et C1q peut se lier à une PrP modifiée dans sa conformation. La PrPsc pourrait être opsonisée par les composants du complément. **d)** Le complexe formé par la PrPsc et les éléments du complément pourrait se fixer sur les récepteurs du complément (CR1/CR2) situés à la surface des FDC. **e)** Il est également envisageable que la PrPc à la surface des FDC se comporte comme un récepteur pour la PrPsc. **f)** Les macrophages au sein des follicules B peuvent également capturer la PrPsc. Même si l'implication des macrophages dans la pathogenèse des EST est incertaine, les macrophages pourraient phagocyter la PrPsc localisée à la surface des FDC et la dégrader. D'après Mabbott and MacPherson, 2006.

La capacité d'un type cellulaire donné à répliquer la PrPsc n'est pas simplement liée à la quantité de PrPc exprimée. En effet, l'expression ectopique de taux élevés de PrPc dans les lymphocytes B ou les lymphocytes T chez des souris transgéniques construites sur fond *prnp*^{0/0} ne permet pas de restaurer la susceptibilité à une infection par la Scrapie chez ces souris. (Montrasio et al., 2001; Raeber et al., 1999b).

Les FDCs capturent et retiennent les antigènes sous forme de complexes immuns, composés d'antigène, d'anticorps et/ou d'élément du complément, sous forme native à la surface cellulaire pendant de longues périodes. La conservation des complexes immuns sur les FDCs est fortement dépendante du complément et des récepteurs du complément. L'absence des récepteurs aux anticorps Fc n'affecte pas l'accumulation de la PrPsc dans les FDC, mais l'absence de plusieurs éléments du complément (C1q, C2, C3 et facteur B) et des récepteurs cellulaires du complément altère l'accumulation de la PrPsc dans la rate (Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2001). Une étude indique que le composant C1q peut se lier à une PrP recombinante de conformation modifiée (Blanquet-Grossard et al., 2005). Cependant, d'autres études seront nécessaires afin de déterminer si la PrPsc est opsonisée par les composants du complément tels que C1q, C2 et C3, et si la PrPsc est capturée par les FDC *via* les récepteurs du complément (**Fig. 42**). Les FDC synthétisent le facteur C1q (Schwaeble et al., 1995), et le complément pourrait potentiellement se lier à la PrPsc directement au sein du réseau de FDC. D'autres populations cellulaires expriment également les récepteurs du complément. Ainsi, le complément pourrait également faciliter la capture et le transport de l'agent infectieux par les cellules circulantes telles que les cellules dendritiques (DCs), ou faciliter la phagocytose et la séquestration de l'agent par des cellules telles que les macrophages. La possibilité que la PrPsc se lie directement sur les FDC par l'intermédiaire de la PrPc cellulaire n'est pas exclue. Enfin, il est également important de souligner que toutes les souches d'EST ne présentent pas nécessairement une accumulation de la PrPsc dans les organes lymphoïdes, par conséquent le rôle des FDC dépend de la souche considérée. Par exemple, dans le cas de la souche DY de l'encéphalopathie du vison, l'agent infectieux peut directement se propager dans le système nerveux sans se répliquer dans les organes lymphoïdes (Bartz et al., 2005).

- Entrée en contact avec le système immunitaire de l'agent infectieux après infection par voie orale

Pour que l'agent infectieux puisse s'accumuler dans les FDC après ingestion d'un met contaminé, il doit d'abord traverser l'épithélium intestinal. La surface luminale de l'intestin limite l'accès des micro-organismes pathogènes aux tissus profonds de l'hôte, et elle est protégée par une monocouche de cellules épithéliales liées par des jonctions serrées. Nichées au sein de l'épithélium villositaire et de l'épithélium associé aux follicules (EAF) des plaques de Peyer, se trouvent les cellules M (microfold), un type cellulaire épithélial spécialisé dans le transport transépithélial de macromolécules et de particules variées. Les cellules M permettent de prélever un échantillon du contenu de la lumière intestinale et la mise en place le cas échéant d'une réponse immunitaire appropriée. Cependant, certains micro-organismes et pathogènes exploitent

ces cellules et les utilisent pour atteindre les muqueuses profondes (Neutra et al., 1996). *In vitro*, il a été montré que les cellules M participent activement à la transcytose de la PrPsc par le côté basolatéral de l'épithélium (Heppner et al., 2001). L'implication de ces cellules dans le transport transépithélial de l'agent infectieux, bien que plausible, nécessite néanmoins une confirmation *in vivo* qui n'a toujours pas été apportée à ce jour.

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

- Transport de l'agent infectieux du site d'entrée périphérique jusqu'aux sites de réplication dans les organes lymphoïdes

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

Les lymphocytes ne sont probablement pas impliqués de le transport de l'agent infectieux lors d'une infection par voie orale car ils n'accumulent pas de quantité détectable de PrPsc suite à une exposition intra-intestinale (Huang et al., 2002). De plus, la surexpression ectopique de la PrPc dans les lymphocytes B ou les lymphocytes T chez des souris transgéniques construites sur fond *prnp^{0/0}* ne permet pas de restaurer la susceptibilité à une infection par la Scrapie chez ces souris. (Montrasio et al., 2001; Raeber et al., 1999b). Néanmoins suite à une infection par voie i.p., les cellules B spléniques accumulent des quantités substantielles de PrPsc (Aucouturier et al.,

2001; Raeber et al., 1999). Les cellules B pourraient acquérir l'infectiosité grâce à leurs contacts étroits avec les FDC de manière passive, par exemple par libération d'exosomes contenant la PrPsc. En définitive, si elles ne semblent pas impliquées dans le transport de l'agent infectieux, il n'y a néanmoins pas de preuve expérimentale suffisante permettant d'exclure les cellules B de toute participation au processus de neuroinvasion.

L'accumulation intra-lysosomale de PrPsc a été montrée dans les macrophages du dôme des plaques de Peyer chez des hamsters inoculés par la Scrapie par voie orale (Beekes and McBride, 2000), dans les macrophages des follicules de cellule B des moutons infectés (Herrmann et al., 2003), et dans les rates des souris infectées par la Scrapie (Jeffrey et al., 2000). L'implication des macrophages dans la pathogenèse des EST est incertaine, mais les études *in vitro* ont indiqué qu'ils pourraient contribuer à réduire l'infectiosité (Carp and Callahan, 1981; Carp and Callahan, 1982). L'administration d'un traitement à base de biphosphonate de dichlorométhylène, qui entraîne une déplétion transitoire des macrophages avant infection orale ou i.p. par la Scrapie, entraîne une augmentation plus rapide du taux de PrPsc dans les tissus lymphoïdes. Ces données suggèrent que les macrophages peuvent altérer l'accumulation précoce de l'agent infectieux dans les tissus lymphoïdes, peut-être par séquestration de l'inoculum initial (Beringue et al., 2000b; Maignien et al., 2005). Cependant, ces données n'excluent pas la possibilité que les macrophages puissent jouer d'autres rôles dans la pathogenèse, tel que le transport ou la propagation de la PrPsc. Néanmoins, le traitement avec le biphosphonate de dichlorométhylène provoque également une déplétion transitoire des FDC et des cellules B dans la rate, ce qui indique que les effets du traitement pourraient ne pas être uniquement dus à la déplétion des macrophages. Le mécanisme d'action des macrophages dans l'altération de l'accumulation de la PrPsc, n'est pas connu. La PrPsc ne provoque pas d'activation significative des macrophages (Cunningham et al., 2005) et la voie de signalisation des « toll-like » récepteurs n'est pas un modulateur important de la pathogenèse des EST (Prinz et al., 2003b). Mais, en l'absence de la voie du récepteur du TNF, l'agent infectieux de la souche RML peut s'accumuler substantiellement dans les macrophages des ganglions lymphatiques (Prinz et al., 2002). Chez les moutons, les macrophages pourraient capter la PrPsc des FDC par phagocytose et cliver l'extrémité N-terminale par protéolyse (Herrmann et al., 2003).

Les DC sont spécialisées dans la capture d'antigènes en périphérie et la présentation de ces antigènes dans les tissus lymphoïdes afin d'initier une réponse immunitaire (Shortman and Liu, 2002). La localisation des DC sous la poche intra-épithéliale des cellules M fait que ces cellules sont idéalement situées pour acquérir les antigènes transcytosés à partir de la lumière de

l'intestin, et les délivrer au GALT (tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal) et à la rate (Liu and MacPherson, 1993). Les DC peuvent également capter des antigènes intestinaux indépendamment des cellules M en s'insérant dans les jonctions serrées des cellules épithéliales grâce à leurs dendrites (Rescigno et al., 2001). Ces caractéristiques font des DC des candidates plausibles pour le transport de l'agent infectieux jusqu'aux tissus lymphoïdes.

Les DC qui patrouillent dans les tissus périphériques sont des cellules immatures qui procèdent, sans interruption, à l'endocytose des antigènes présents dans leur environnement local. Une fois endocytés, les antigènes sont rapidement dirigés vers le compartiment lysosomal, où ils sont dégradés en petits peptides afin d'être présentés à la surface cellulaire en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC). Certains types de DC peuvent capturer et dégrader la PrPsc après exposition *in vitro* (Luhr et al., 2002; Mohan et al., 2005b), suggérant que les DC seraient des candidates peu probables pour délivrer efficacement la PrPsc aux follicules lymphoïdes sous sa forme infectieuse. Cependant, à la différence des macrophages, certaines DC peuvent capturer et maintenir les protéines antigéniques et les agents des EST sous leurs formes natives, non-dégradées (Huang et al., 2002; Mohan et al., 2005b).

Les DC sont-elles des candidates idéales pour le transport de la PrPsc jusqu'aux FDC? Après la capture d'antigènes et une stimulation appropriée, les DC entrent en maturation et migrent habituellement vers les régions riches en cellules T des tissus lymphoïdes afin de leur présenter les peptides antigéniques dans le but d'initier une réponse immunitaire. Mais dans les tissus lymphoïdes, les zones riches en cellule T forment une région anatomiquement distincte des follicules de cellules B dans lesquelles résident les FDCs. Ceci implique que même si les DCs transportent la PrPsc jusqu'aux tissus lymphoïdes, il est néanmoins *a priori* peu probables qu'ils atteignent les FDCs. Cependant, un sous-type de DC pouvant émigrer jusqu'aux follicules de cellules B a été décrit (Yu et al., 2002). De façon intéressante, une partie des DC qui interagissent avec les cellules B gardent leurs antigènes sous forme native et non dégradées (Wykes et al., 1998).

Puisque certains types de DC gardent l'agent infectieux sous sa forme infectieuse, les DC sont-elles également impliquées dans le transport jusqu'aux tissus lymphoïdes ? Il a été montré que le peptide PrP106-126 pouvait agir comme un chemoattractant sur les DC (Kaneider et al., 2005; Kaneider et al., 2003). Ces données suggèrent que les DCs pourraient migrer vers la PrPsc dans les tissus de l'hôte infecté, mais il n'existe que peu d'études sur le transport de l'agent infectieux des EST par les DC. L'ablation des ganglions lymphatiques mésentériques chez le rat permet aux vaisseaux lymphatiques afférents qui drainent l'intestin de rejoindre les vaisseaux lymphatiques mésentériques efférents. Cette opération permet au fluide et aux cellules qui

auraient normalement été drainés des intestins vers les ganglions lymphatiques mésentériques, d'être collectés par une cannulation du conduit thoracique. Quand cette technique a été utilisée pour étudier l'association cellulaire de la PrPsc dans la lymphe des rats inoculés par voie intra-intestinale, la PrPsc a été retrouvée exclusivement dans une sous-population de DC circulantes (Huang et al., 2002). Par ailleurs, en ce qui concerne les DC spléniques, il a été montré que celles-ci pouvaient accumuler des quantités d'infectiosité suffisamment importantes pour permettre la propagation des prions. Dans l'étude réalisée par Aucouturier et al., les auteurs purifient des DC spléniques d'une souris infectée et les réinjectent par voie intraveineuse chez des souris RAG1-/- immunodéficientes (Aucouturier et al., 2001). Ces dernières développent la Scrapie sans qu'il y ait accumulation préalable de la PrPsc dans la rate. Ces résultats suggèrent que les DC peuvent propager l'agent infectieux du site d'entrée périphérique jusqu'au SNC.

La confirmation de l'implication des DC dans la neuroinvasion ne peut être apportée que par déplétion, ou par inhibition de la migration DC. Par exemple, les cellules de Langerhans sont un sous-type de DC circulantes de l'épiderme. Lorsque la migration active de ces cellules est bloquée, le passage de l'agent infectieux au ganglion lymphatique drainant n'a pas été altéré. Cette expérience suggère que les cellules de Langerhans ne sont pas impliquées dans le transport de la PrPsc à partir de la peau (Mohan et al., 2005). Cependant, cette étude ne permet pas de conclure sur l'implication éventuelle des autres populations de DC de la peau. Dans une autre étude, la neuroinvasion de l'agent de la Scrapie, suite à une inoculation orale ou intrapéritonéale n'était pas perturbée chez des souris déplétées en DC grâce au virus *choriomeningitis* (Oldstone et al., 2002). Les auteurs ont conclu à l'absence d'implication des DC dans le processus de neuroinvasion. Cependant, la dose élevée d'inoculum utilisée dans cette étude est susceptible d'avoir rendu inutile l'accumulation préalable de PrPsc dans les tissus lymphoïdes avant la neuroinvasion. De plus, la déplétion des DC dans cette étude n'est pas totale.

Récemment, deux modèles de souris transgéniques (CD11c-N17Rac1 et *pl/l*) ont permis d'apporter des éléments nouveaux concernant l'implication des DC dans les mécanismes de neuroinvasion lors d'une infection par voie périphérique. Chez les souris transgéniques CD11c-N17Rac1, l'expression de la rho GTPase Rac1 est sélectivement inhibée dans les cellules dendritiques, ce qui conduit à une réduction de la sous-population de cellules dendritiques CD11c^{High} CD8+. Ces souris présentent un temps d'incubation plus long après une infection par voie intrapéritonéale en comparaison avec des souris contrôles. En revanche, aucune différence n'est détectée après une infection par voie orale. Ces résultats soulignent l'importance des DC dans le transport de l'agent infectieux après une infection i.p. mais suggèrent l'implication de types cellulaires différents entre les voies d'infection orale et i.p. (Sethi et al., 2007). Le modèle

des souris transgéniques *plt* a permis de montrer que la migration des DC après infection périphérique était indépendante du système des chemokines CCL19/CCL21 et leur récepteurs CCR7. Ces souris sont déficientes pour les chémokines CCL19/CCL21 et la migration des DC après une stimulation antigénique est altérée. Mais ces souris présentent des temps d'incubation similaires avec ceux des souris contrôles après infection par voie i.p. (Levavasseur et al., 2007).

- c) Effet d'une déplétion temporaire des cellules dendritiques lors d'une infection par voie périphérique (Article 3)

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation du rôle des DC dans le transport de l'agent infectieux, nous avons choisi d'utiliser le modèle de souris transgéniques *DTR^{+/+}*. Ces souris constituent un modèle de déplétion transitoire de l'ensemble des cellules dendritiques (Jung et al., 2002). Dans ce modèle, l'expression de la protéine de fusion DTR-GFP est placée sous le contrôle du promoteur de CD11c qui est un marqueur de surface exprimé par toutes les sous-populations de DC chez la souris. La stratégie de déplétion est basée sur le fait que les souris sont résistantes à la diphtérie toxine (DT) en raison de la faible affinité de la DT pour son récepteur (DTR) murin. La réintroduction d'un transgène simien du récepteur DTR sous le promoteur de CD11c permet de sensibiliser les cellules dendritiques à l'action de la DT et entraîne leur déplétion transitoire. En effet, dans l'étude de caractérisation originale de ce modèle, il est montré que l'injection de 4ng de toxine/g de poids corporel entraîne une déplétion totale des DC pendant 48 heures ; le nombre de DC revient ensuite progressivement à la normale. Contrairement à une réponse immunitaire classique qui est souvent mise en place dans les heures qui suivent une infection par un pathogène conventionnel, l'infection par la Scrapie n'entraîne pas une activation du système immunitaire et le transport de la PrPsc jusqu'aux organes lymphoïdes nécessite au moins une semaine (Aguzzi and Heikenwalder, 2006). C'est pourquoi nous avons induit la déplétion des DC pendant une durée de 11 jours en renouvelant les injections de DT toutes les 48 heures. Les doses de DT que nous avons utilisées sont inférieures à celles de l'étude initiale en raison de la toxicité des injections répétées (entre 0,4 et 1ng/g de poids corporel). Nous avons vérifié que malgré la diminution du dosage, la déplétion des DC était quasi-totale (~ 85%). Par ailleurs, ce traitement n'affecte pas le nombre de lymphocytes B et T.

Après induction de la déplétion, les souris ont été infectées en parallèle par deux voies périphériques différentes (orale et i.p.) par la souche 139A, préalablement adaptée au fond génétique Balb/c. Dans cette étude, nous avons montré que la déplétion des DC entraîne une diminution de l'accumulation de la PrPsc dans la rate et le cerveau des animaux infectés par voie i.p. et un allongement significatif du temps de survie. L'examen des rates des souris infectées et

traitées par la toxine à 70 j.p.i., a révélé une différence importante dans la quantité de PrPsc accumulée par rapport aux souris contrôles. Néanmoins, 84 jours post-infection, cette différence d'accumulation de PrPsc n'est plus détectable. En revanche, à ce stade l'accumulation de PrPsc n'est toujours pas détectée dans le cerveau des souris traitées. Toutefois, en raison du décalage existant entre la réplication de la PrPsc dans le système immunitaire et le système nerveux, les résultats obtenus dans la rate laissent supposer que la PrPsc finirait également par s'accumuler dans le cerveau. En effet, les souris traitées ont quand même succombé à la maladie malgré l'allongement de leur temps de survie. Ces résultats suggèrent que les DC participent activement au transport de la PrPsc du site d'entrée périphérique vers la rate dans les stades précoces de l'infection. Ainsi les DC sont des acteurs précoces de l'infection par voie i.p.

Toutefois, aucune différence n'a été détectée dans la cinétique d'accumulation de la PrPsc dans les rates et les cerveaux des animaux traités comparés aux animaux non-traités après une infection par voie orale. Ces résultats sont en parfait accord avec l'étude publiée par Sethi et al. qui montre que la déplétion des CD11c+ CD8+ entraîne un allongement du temps de survie uniquement chez les souris infectées par voie i.p. et non par voie orale (Sethi et al., 2007). L'avantage du modèle DTR par rapport au modèle CD11c-N17Rac1 est la déplétion de l'ensemble des cellules dendritiques, aussi bien des CD11c+ CD8+ que des CD11c CD8-. L'allongement du temps de survie obtenu chez les souris CD11c-N17Rac1 infectées par voie i.p., est d'environ une cinquantaine de jours. Dans notre étude, l'allongement de survie constaté est moindre mais la grande différence entre ces deux modèles est la durée de la déplétion des DC. Alors que l'effet est permanent chez les CD11c-N17Rac1, il se limite à une semaine post-infection dans le modèle DTR. La déplétion des DC pendant une aussi courte période au cours des jours qui suivent l'infection suffit à rallonger le temps de survie de 12 jours.

En revanche, les conclusions de notre étude sur l'implication des DC après infection par voie orale sont en complète opposition avec les résultats publiés dernièrement par Raymond et al (Raymond et al., 2007). Les auteurs affirment en effet que les cellules dendritiques jouent un rôle indispensable dans la propagation de l'agent infectieux à partir de l'intestin, donc après infection par voie orale. De façon intéressante, les auteurs ont eu recours au même modèle de souris transgéniques, *DTR^{+/+}*. Toutefois, plusieurs différences importantes d'ordre méthodologique peuvent être constatées. Premièrement, les fonds génétiques des souris DTR utilisées ne sont pas identiques. Les souris transgéniques DTR ont été générées en parallèle sur les fonds génétiques Balb/c et C57Bl/6 (Jung et al., 2002). Contrairement à Raymond et al., nous avons choisi de travailler sur les souris de fond Balb/c qui présentent environ vingt copies du transgène DTR au lieu de 1 à 2 copies pour les souris générées sur fond C57Bl/6. Nous avons par ailleurs procédé,

par des injections répétées de toxine, à une déplétion continue des DC pendant une période de 10 jours après infection, tandis que Raymond et al. n'ont procédé qu'à une seule injection la veille de l'infection, ce qui par conséquent a entraîné une déplétion de moins longue durée (maximum 4 jours post-infection). Il faut également noter que la déplétion obtenue dans l'étude de Raymond et al. est incomplète. Après injection de la toxine à une concentration de 4ng/g de poids corporel, les auteurs constatent par cytométrie de flux la déplétion de seulement 60% des DC de la rate. Pourtant dans l'étude de Jung et al., le taux de déplétion provoqué par la même dose de toxine est de 90% et nous avons reproduit ce résultat malgré l'utilisation de la toxine à une dose 4 fois inférieure.

En résumé, malgré une déplétion plus efficace et de plus longue durée des DC en comparaison avec l'étude de Raymond et al., nous n'avons constaté aucun allongement significatif du temps de survie chez les souris infectées par voie orale. Toutefois, il est important de remarquer que dans l'étude de Raymond et al., environ la moitié des souris infectées et traitées par la DT présentent des temps d'incubation similaires à ceux des souris contrôles. De façon très surprenante, l'autre moitié des souris traitées par la toxine DT puis infectées semblent dépourvues de tout signe clinique de Scrapie et présentent un temps de survie supérieur à 530 jours. Une telle variabilité dans l'effet de déplétion des DC dans un modèle d'infection par la Scrapie semble difficilement concevable. En effet, dans les cas d'infections par la Scrapie, il n'existe à ce jour aucun modèle de traitement ou de déplétion cellulaire capable d'induire une résistance à l'infection uniquement chez la moitié des individus traités, alors que l'autre moitié ne présente aucune amélioration. Afin d'expliquer ce paradoxe, les auteurs affirment que selon les circonstances, la translocation initiale de l'agent infectieux à partir de la lumière intestinale peut se faire indépendamment des DC. En accord avec cette affirmation et au vu de nos résultats, les DC ne semblent pas indispensables dans le transport de l'agent infectieux après une infection par voie orale. Il est envisageable que lorsque la contamination se fait par voie orale, l'agent infectieux se propage principalement à travers les fibres efférentes du système mésentérique (McBride et al., 2001).

ARTICLE 3

“TEMPORARY DEPLETION OF CD11c+ DENDRITIC CELLS DELAYS LYMPHOINVASION AFTER INTRAPERITONEAL SCRAPIE INFECTION”

Sevda Cordier-Dirikoc and Joëlle Chabry

Soumis à *Journal of Virology*

Statut : en révision

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

**TEMPORARY DEPLETION OF CD11c⁺ DENDRITIC CELLS DELAYS LYMPHOINVASION
AFTER INTRAPERITONAL SCRAPIE INFECTION**

Sevda Cordier-Dirikoc and Joëlle Chabry*

From the “Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire”, Centre National de la Recherche Scientifique. 660, route des lucioles, 06560 Valbonne, France

RUNNING TITLE: Role of dendritic cells CD11c⁺ in prion lymphoinvasion

CORRESPONDENT FOOTNOTE: Joëlle Chabry “Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire”, Centre National de la Recherche Scientifique. 660, route des lucioles 06560 Valbonne, France, Tel:+33493957767; E-mail:chabry@ipmc.cnrs.fr

WORD COUNT: abstract 100; text 1556

19

20 **ABSTRACT**

21 The involvement of immune cells in prion capture and transport to lymphoid tissues
22 still remains unclear. To investigate the role of dendritic cells (DC), we used DTR^{+/+} mice, a
23 transgenic model designed to trigger short-term ablation of DC. Transient depletion of DC
24 around the time of intra-peritoneal infection delayed prion replication in the spleen, as
25 followed by PrP^{sc} amount, a specific hallmark of prion diseases. Consequently,
26 neuroinvasion and incubation time of prion disease were delayed. In contrast, no differences
27 were observed after oral infection. These results suggest that DC act as vectors for prions
28 from peripheral entry site to the spleen.

29 Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative diseases
30 caused by the progressive accumulation of the pathological prion protein isoform (PrP^{sc}) in
31 brain of affected-human and -animals. PrP^{sc}, a pathological conformer of the cellular prion
32 protein (PrP^c) was proposed to be the causative agent of TSEs (15). Peripheral prion
33 infections induce a rise of PrP^{sc} deposition and infectivity in lymphoid tissues notably in
34 spleen long before the infection spreads to the central nervous system (CNS). In intra-
35 peritoneally infected mice, infectivity rises the spleen within few days (17). The importance
36 of spleen in prion replication and neuroinvasion was suggested by experiments showing a
37 delay of disease onset in splenectomized mice (8). Follicular dendritic cells appear to support
38 prion replication in lymphoid follicles (4, 9, 12). However, the precise nature of cell types
39 within the lymphoreticular system supporting TSE-agent transport from peripheral infection
40 site to the spleen remains obscure. B-lymphocytes are not essential for trafficking prions
41 within lymphoid organs (1). Beringue and *al.* demonstrated the involvement of macrophages
42 in the clearance of prions rather than in their transport (3). CD11c⁺DC subsets can propagate
43 prions from lymphoid organs to the CNS in the absence of any other lymphoid element (2).
44 Importantly, DC are active endocytotic and migratory cells making them good candidate
45 vectors for prions. The main function of DC is to acquire antigens in peripheral tissues and
46 transport them to secondary lymphoid tissues (19). Therefore, in the present study, we
47 assayed the hypothesis that CD11c⁺DC might be involved in the uptake and carry of prions
48 from the infection point to the spleen. To do so, we used a well-characterized diphtheria toxin
49 (DT)-based transgenic mouse model that allows inducible and short-term ablation of DC (7).
50 The strategy is based on the fact that murine cells, unlike primate cells, are resistant to DT.
51 Indeed, the cytotoxicity of DT is strictly dependent on its endocytosis mediated by its cellular
52 receptor (DTR) (13). DT resistance of murine cells results from the low affinity of DT for
53 rodent DTR. Genetic transfer of a primate DTR into mice (Balb-c genetic background)

54 confers DT sensitivity to murine cells. DT sensitivity was targeted to DC by introducing a
55 transgene encoding a simian DTR-GFP (green fluorescent protein) fusion protein under the
56 control of the murine CD11c⁺ promoter; the resulting transgenic mice were named DTR^{+/+}.
57 CD11c⁺ is considered as pan marker of murine DC regardless of subset. Jung and co-workers
58 have demonstrated that the DT-induced depletion of DC was transient and persisted for two
59 days, after which DC number was gradually restored (7). Because PrPsc inoculated intra-
60 peritoneally (IP) persisted at least 5 days in the mouse body (10), a minimum of 5-days
61 depletion of DC was required. To increase the duration of DC-depletion until the complete
62 disappearance of the inoculated PrPsc, we designed a protocol of systemic DT injections.
63 DTR^{+/+} mice were submitted to IP injections of DT two days apart, two injections of 1ng of
64 toxin/g of body weight (bw), followed by four extra injections (0.4ng/g of bw). Flow
65 cytometry analyses were performed on splenocytes from DT-treated or untreated DTR^{+/+} mice
66 focusing on GFP-CD11c^{high} double positive DC (Fig.1). The first two injections of DT
67 (1ng/g of bw) led to an important depletion of CD11c⁺DC (89.0% ± 3.5; n=7; *p*<0.01, Mann-
68 Whitney test) as compared to PBS-treated mice (Fig.1). The systemic injection of DT used
69 here allowed an important and persistent depletion of DC until two days after the last
70 injection of toxin but resulted, however, in 20% lethality in DTR^{+/+} mice. Neither mortality
71 nor depletion of DC was observed when Balb-c mice were submitted to the same procedure
72 (Fig.1).

73 We then investigated the effect of transient depletion of DC on PrPsc formation in the
74 spleen after peripheral prion inoculation. One-day after the first two injections of DT, mice
75 were inoculated IP with 100µl of 2% brain homogenate prepared from terminally ill 139A
76 prion-infected Balb-c mice; then the systemic DT-treatment was pursued as described above.
77 As a control, PBS-treated DTR^{+/+} mice were infected under the same experimental conditions.
78 Mice were killed one-day after the last DT injection (i.e. 8 days post-infection, dpi), 70 and 84

79 dpi; then spleen and brain were collected and homogenized as described previously (5). For
80 detection of PrPsc, lysates were digested with 100µg of proteinase K (PK) *per* mg of total
81 proteins for 45min at 37°C. PrPc and PrPsc were detected using the PrP mAb SAF70. The
82 pathological PK-resistant PrP isoform (i.e. PrPsc) was undetectable in spleen and brain of
83 DTR^{+/+} mice at 8dpi (data not shown). At 70dpi, PrPsc was detectable in both organs
84 indicating the beginning of PrPsc accumulation as estimated by western blot (Fig.2A). The
85 PrPsc amount was drastically reduced in spleen and brain of DT-treated DTR^{+/+} mice
86 compared to the PBS-treated mice. A marked difference in the PrPsc amount remained in the
87 brain of DT-treated *versus* non-treated mice at 84dpi, whereas no difference was observed in
88 the spleen (Fig.2A). Neither the rate nor the glycosylation profile of PrPc were modified by
89 the DT treatment (Fig.2B). By plotting the quantified results of blots, we determined that the
90 rate of PrPsc in the spleen was significantly lower in DT-treated mice as compared to control
91 animals at 70 dpi (n=8; $p<0.01$, Mann-Whitney test; Fig.2C) whereas there was no significant
92 difference at 84 dpi. Significant difference in the cerebral PrPsc amount was measured
93 between DT-treated *versus* untreated animals at both time post-infection (n=8; $p<0.01$, Mann-
94 Whitney test, Fig.2C). As control, Balb-c mice were submitted to the DT-treatment and
95 infected with prions following the same procedure. At 70dpi, the PrPsc formation was
96 estimated by western blot on PK-digested spleen and brain homogenates (Fig.2 D). The
97 amounts of PrPsc were similar in tissues from untreated and DT-treated mice (Fig.2 D, E)
98 indicating that in Balb-c mice, DT *per se*, had no effect on both PrPsc formation and prion
99 neuroinvasion. After PK digestion, no PrP-like immunoreactivity was detectable in tissue
100 homogenates from healthy Balb-c mice demonstrating that the efficacy of the PK-digestion
101 and the specificity of the αPrP mAb (Fig.2 F).

102 In order to determine whether transient DC-depletion could delay the prion disease
103 incubation time, DTR^{+/+} mice were infected with the 139A scrapie strain (100µl of 2% brain

104 homogenate, IP) and DT-treated or not as described above (Table 1). Systemic DT-treatment
105 significantly increased the survival time of the infected mice as compared to the vehicle
106 treated group ($p < 0.001$, Mann-Whitney test). However, all DTR^{+/+} mice finally developed
107 clinical signs of prion disease such as ataxia, tremor and swaying gait and PrPsc was detected
108 in their brains at terminal illness stage (data not shown). When inoculated with prions directly
109 into the brain, all control and DT-treated DTR^{+/+} mice developed clinical signs of disease and
110 died with similar incubation time (i.e. 148 dpi \pm 5.0 and 145 dpi \pm 4.0 respectively).

111 In summary, short-term depletion of DC before prion infection decreased the kinetic
112 of newly formed PrPsc accumulation in the spleen, after IP infection. Consequently, the
113 cerebral formation of PrPsc and the incubation time to death were both delayed. Together,
114 these results strongly suggest that CD11c⁺DC may partly control prion infection in peripheral
115 tissues by sequestration and transport of the TSE-agent from the peripheral infection site to
116 the spleen.

117 There is substantial evidence suggesting that lymphoreticular requirements for IP and
118 oral uptake of prions differ from each other (18). The effect of DC-depletion after oral
119 contamination with prions was studied using the systemic toxin treatment described above
120 and DTR^{+/+} mice were infected by forced-feed with 100 μ l of 2% brain homogenate of 139A
121 scrapie strain. After oral infection, no distinct difference in the PrPsc rate was observed in
122 spleen and brain of DT-treated *versus* untreated DTR^{+/+} mice (Fig. 3). Thus, in contrast to IP
123 route of infection, transient depletion of DC had no effect in the kinetic of PrPsc accumulation
124 in spleen after oral infection. These results suggest that CD11c⁺DC were not required in the
125 uptake and transport of prions from the gut to the spleen. Our results are in line with previous
126 reports indicating differences in lymphoreticular requirements between oral and IP prion
127 infection (14, 18). Regarding the oral route of prion infection, the role of DC remains
128 uncertain. It is conceivable that the oral route uses primarily efferent nerve fibers for

129 neuroinvasion with minor role played by mobile immune cells (11). In agreement with our
130 results, Sethi and *al.* have shown that a defect of CD8⁺CD11c⁺DC impedes neuroinvasion
131 after IP but not oral infection with prions (18) whereas DC have been proposed by others as
132 potential vectors of prions after oral infection (6). Recently, Raymond and *al.* have reported
133 that two-days depletion of DC impaired the neuroinvasion of prions in ~50% of DTR^{+/+} mice
134 under C57BL6 genetic background (16). Since, in our model, DC-depletion was stronger (i.e.
135 89% *versus* 60%) and longer (i.e. 8 dpi *versus* 2 dpi), these discrepancies could be explained
136 by the different ways of oral inoculations of the infectious agent (feeding *versus* forced-
137 feeding). Alternatively, the involvement of DC might depend on the strain of mouse.

138 In summary, we clearly demonstrated that CD11c⁺DC may act as vectors for prions
139 very early after IP infection. Owing to the fact that DC are present in a wide number of
140 epithelia such as skin, oral mucosa and gastrointestinal tract, the implication of DC in the
141 transport of prions following any other possible infection routes (scarification, blood
142 transfusion, intra-ocular, dental) remains to be established.

143

144 **ACKNOWLEDGMENTS**

145 We are indebted to F. Bihl and G. Lauvau for supplying us with DTR^{+/+} mice, and J. Grassi
146 for PrP mAb. This work was supported by grant from the "Agence Nationale de la
147 Recherche". SCD was recipient of a fellowship from the "Fondation pour la Recherche
148 Médicale".

149

150 **REFERENCES**

- 151 1. **Aguzzi, A., F.L. Heppner, M. Heikenwalder, M. Prinz, K. Mertz, H. Seeger, and**
152 **M. Glatzel.** 2003. Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to
153 CNS. *Br Med Bull* **66**:141-59.

- 154 2. **Aucouturier, P., F. Geissmann, D. Damotte, G.P. Saborio, H.C. Meeker, R.**
155 **Kacsak, R.I. Carp, and T. Wisniewski.** 2001. Infected splenic dendritic cells are
156 sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest* **108**:703-8.
- 157 3. **Beringue, V., M. Demoy, C.I. Lasmezas, B. Gouritin, C. Weingarten, J.P. Deslys,**
158 **J.P. Andreux, P. Couvreur, and D. Dormont.** 2000. Role of spleen macrophages in
159 the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* **190**:495-502.
- 160 4. **Brown, K.L., K. Stewart, D.L. Ritchie, N.A. Mabbott, A. Williams, H. Fraser, W.**
161 **I. Morrison, and M.E. Bruce.** 1999. Scrapie replication in lymphoid tissues depends
162 on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* **5**:1308-12.
- 163 5. **Dirikoc, S., S.A. Priola, M. Marella, N. Zsürger, and J. Chabry.** 2007.
164 Nonpsychoactive cannabidiol prevents prion accumulation and protects neurons
165 against prion toxicity. *J Neurosci* **27**:9537-44.
- 166 6. **Huang, F.P., C.F. Farquhar, N.A. Mabbott, M.E. Bruce, and G.G. MacPherson.**
167 2002. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*
168 **83**:267-71.
- 169 7. **Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu,**
170 **S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang.** 2002.
171 In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by
172 exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**:211-20.
- 173 8. **Kimberlin, R.H., and C.A. Walker.** 1989. The role of the spleen in the
174 neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res* **12**:201-11.
- 175 9. **Mabbott, N.A., F. Mackay, F. Minns, and M.E. Bruce.** 2000. Temporary
176 inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*
177 **6**:719-20.
- 178 10. **Maignien, T., Lasmezas, C.I., Beringue, V., Dormont, D. and Deslys, J.P.** 1999

- 179 Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform
180 encephalopathy agents. *J. Gen. Virol* **80**: 3035-42.
- 181
182 11. **McBride, P.A., W.J. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. Bruce, H. Diringer, H.**
183 **A. Kretzschmar, and M. Beekes.** 2001. Early spread of scrapie from the
184 gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the
185 splanchnic and vagus nerves. *J Virol* **75**:9320-7.
- 186 12. **Montrasio, F., R. Frigg, M. Glatzel, M.A. Klein, F. Mackay, A. Aguzzi, and C.**
187 **Weissmann.** 2000. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional
188 follicular dendritic cells. *Science* **288**:1257-9.
- 189 13. **Naglich, J.G., J.E. Metherall, D.W. Russell, and L. Eidels.** 1992. Expression
190 cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like
191 growth factor precursor. *Cell* **69**:1051-61.
- 192 14. **Prinz, M., G. Huber, A.J. Macpherson, F.L. Heppner, M. Glatzel, H.P. Eugster,**
193 **N. Wagner, and A. Aguzzi.** 2003. Oral prion infection requires normal numbers of
194 Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol* **162**:1103-11.
- 195 15. **Prusiner, S. B.** 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13363-83.
- 196 16. **Raymond, C.R., P. Aucouturier, and N.A. Mabbott** 2007. In vivo depletion of
197 CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine *J. Immunol*
198 **179**:7758-66
- 199 17. **Rubenstein, R., P.A. Merz, R.J. Kascsak, C.L. Scalici, M.C. Papini, R.I. Carp,**
200 **and R.H. Kimberlin.** 1991. Scrapie-infected spleens: analysis of infectivity, scrapie-
201 associated fibrils, and protease-resistant proteins. *J Infect Dis* **164**:29-35.
- 202 18. **Sethi, S., K.M. Kerksiek, T. Brocker, and H. Kretzschmar.** 2007. Role of the
203 CD8+ dendritic cell subset in transmission of prions. *J Virol* **81**:4877-80.

204 19. **Steinman, R.M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
205 Annu Rev Immunol **9**:271-96.

206

207 **FIGURE LEGENDS**

208

209 **Figure 1: DT sensitivity of the DC compartment in DTR^{+/+} transgenic mice.** Flow
210 cytometry analysis of freshly isolated splenocytes of DTR^{+/+} mice one-day post-injection with
211 PBS or the indicated doses of DT (left). Gates indicate the GFP⁺CD11c⁺DC. Representative
212 data of 7 independent experiments are presented as dot-plots.

213

214 **Figure 2: DT systemic treatment delays splenic and cerebral PrP^{sc} formation of DTR^{+/+}**
215 **mice after intra-peritoneal prion infection.** Representative western blots performed on
216 brain (right) or spleen (left) homogenates of three DTR^{+/+} (**A, C**) and wild-type Balb-c (**D, E**)
217 mice treated twice with DT 1ng/g of bw, IP inoculated with prions one-day later and treated
218 again with four extra injections of DT 0.4ng/g every two days. “Non-treated” group of
219 animals was injected with the saline buffer alone. Mice were sacrificed at 70 and 84dpi and
220 spleen and brains were homogenized in lysis buffer. PrP^{sc} (**A, D**) and PrP^c (**B**) were prepared
221 from PK-digested and undigested homogenates, respectively. 400μg (**A, D**) and 25μg (**B**) of
222 total proteins were loaded *per* lane, submitted to electrophoresis, blotted and PrP isoforms
223 were detected using the αPrP mAb SAF70. Alternatively, brain and spleen homogenates of
224 healthy Balb-c mice were analyzed with or without PK-digestion (**F**). To determine the
225 correction factor of load, blots performed with non-digested proteins were reprobbed with the
226 anti-Erk2 antibody (**B**). Blots were revealed using an enhanced chemoluminescence system
227 (Amersham) with a LAS3000 detector (Fuji). Densitometry analyses were performed with a
228 “National Institutes of Health” IMAGE software on blots corresponding to eight animals *per*

229 group (C, E). The results of the densitometry analysis performed on immuno-positive bands
230 indicated with an arrow were calculated as followed: (mean intensity / surface X correction
231 factor of load) and expressed in arbitrary units (a.u). Statistical analyses were performed using
232 the nonparametric Mann-Whitney test, *, $p < 0.01$.

233

234 **Figure 3: No change in the splenic and cerebral PrPsc formation of DT-treated DTR^{+/+}**
235 **mice after oral prion inoculation.** Western blot analyses performed on brain (right) or
236 spleen (left) homogenates of orally prion-infected DTR^{+/+} mice DT-treated or not. Detection
237 of PrPsc (A) and PrPc (B) were performed on brain and spleen of DTR^{+/+} mice at 84 and 98
238 dpi. (C) Densitometry analyses were performed on blots with eight animals *per* group.

Table 1: Effect of DT-treatment on the incubation time of prion infected DTR^{+/+} mice

	mice (scrapie sick/total)	Mean incubation time to death (days ± SD)	Delay (days)	Significance <i>p</i> value (Mann-Whitney test)
Infected non treated	6/6	207.0 ± 1.8	NA	NA
Infected DT-treated	8/8	219.0 ± 2.1	12	<i>p</i> < 0.001

NA, not applicable

Figure 1

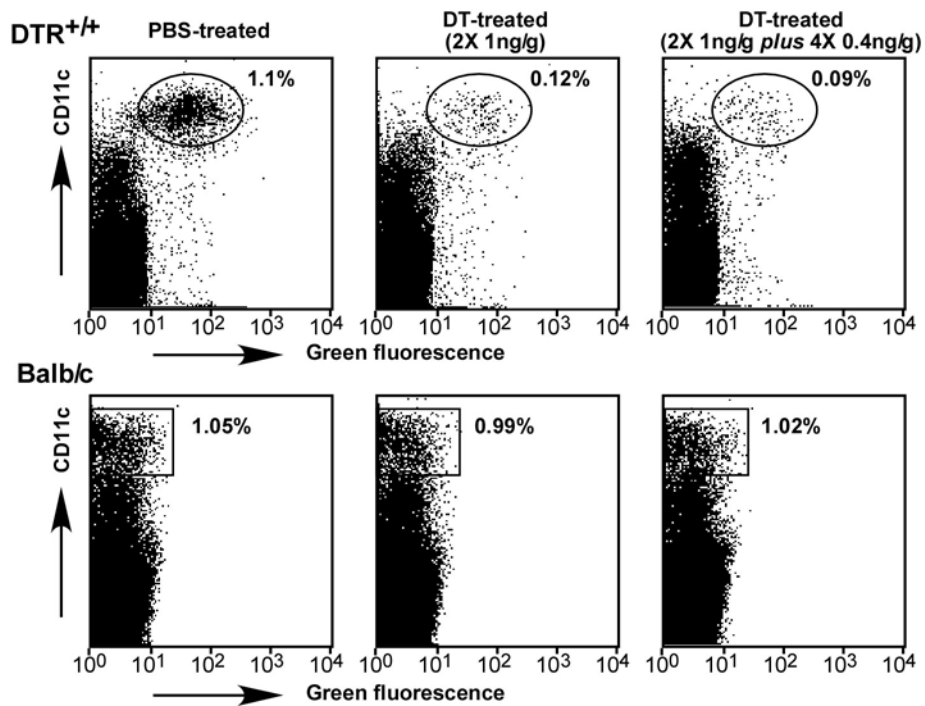


Figure 2

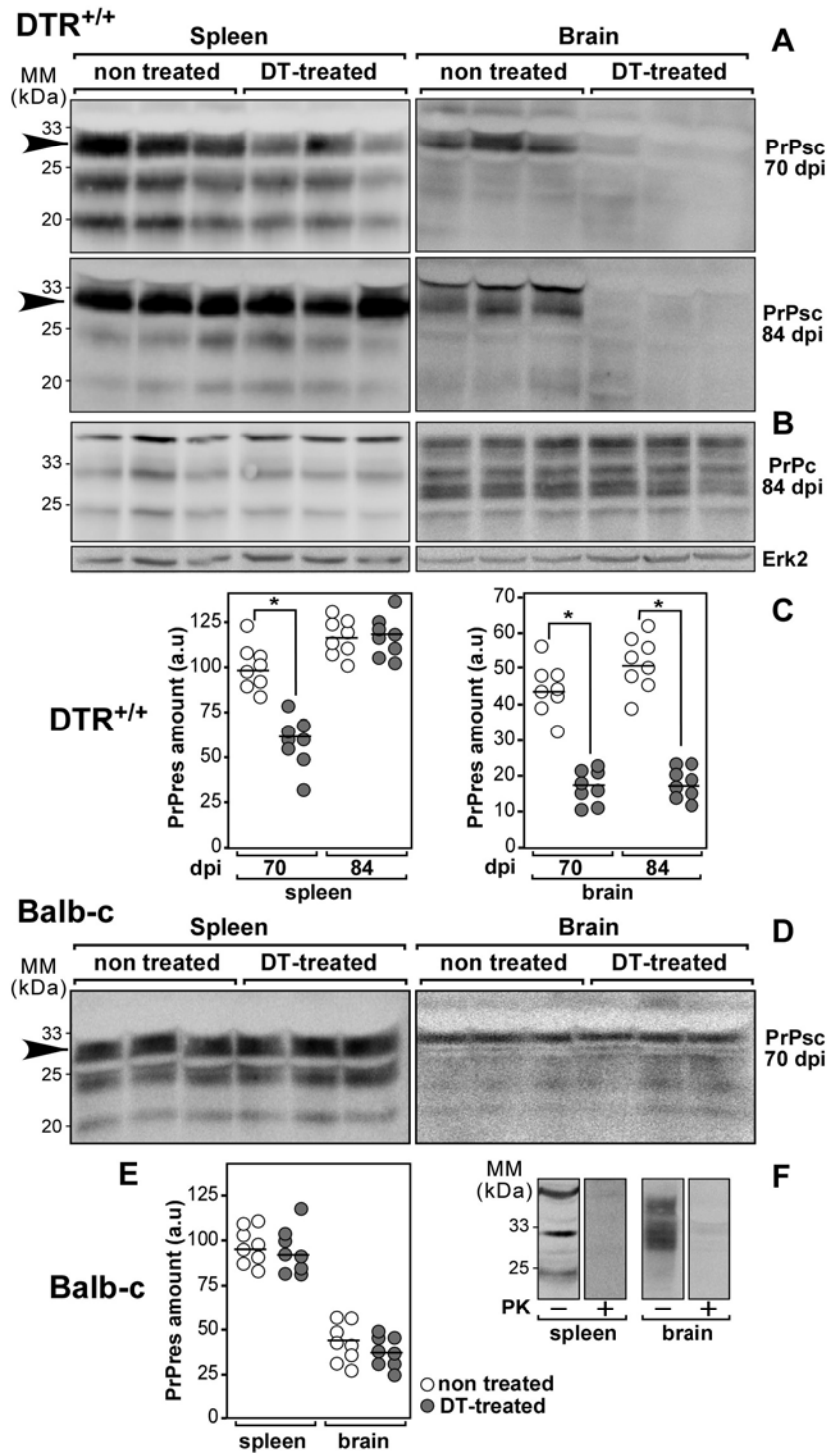
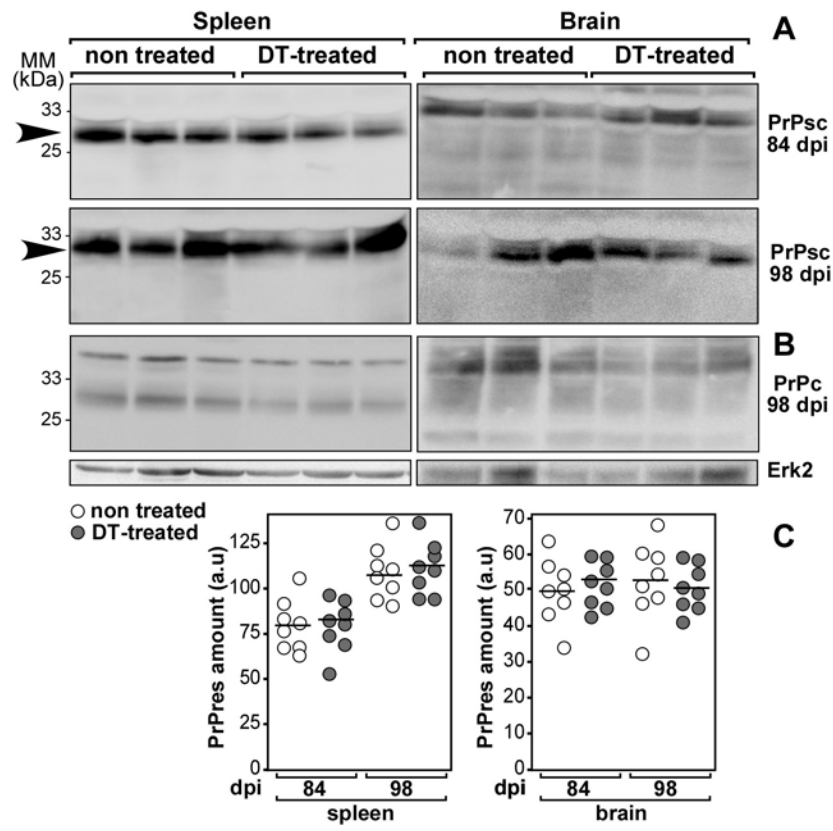


Figure 3



2) Neuro-invasion : importance du SNP

Le système nerveux entérique est un composant important du système nerveux autonome, et il régule la motilité intestinale et les sécrétions à travers les nerfs sympathiques et les nerfs parasympathiques. L'analyse la distribution spatio-temporelle de la PrPsc dans le système nerveux des rongeurs inoculés par voie orale indique que celle-ci peut se propager du GALT au SNC *via* le système nerveux entérique (Baldauf et al., 1997; Beekes et al., 1996; Beekes and McBride, 2000; McBride et al., 2001) (**Fig. 43**).

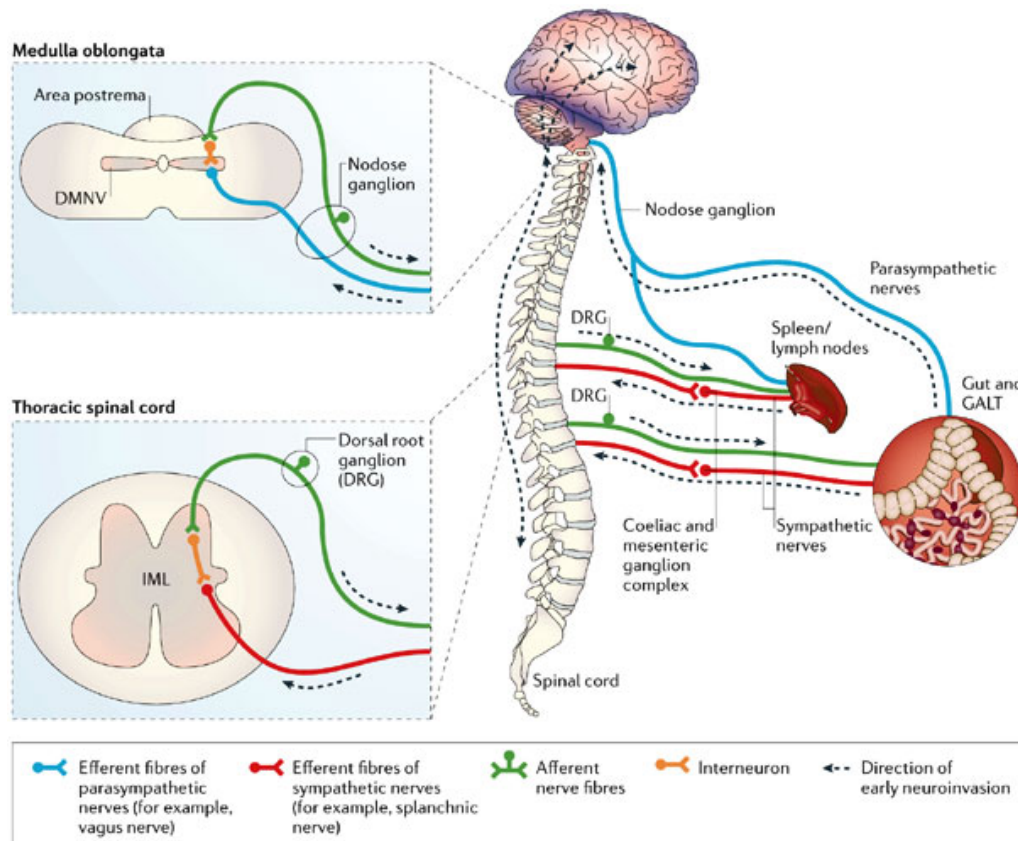


Figure 43 : Propagation de l'accumulation de la PrPsc au sein du système nerveux chez la souris inoculée par la Scrapie par voie périphérique. L'agent infectieux se propage de l'intestin vers le SNC à travers différentes voies neuroanatomiques. Dans tous les cas, la propagation initiale se produit de façon rétrograde le long des voies efférentes motrices *via* les connexions synaptiques. Une des voies vers le SNC passe par les fibres sympathiques du nerf splanchnique et permet à l'agent infectieux d'atteindre la moëlle épinière au niveau thoracique. Par la suite, l'agent se propage au cerveau selon une orientation caudal-cranial le long de la moëlle épinière. La neuroinvasion à partir des intestins peut également se produire indépendamment de la moëlle épinière. Dans ce cas, l'agent se propage le long des fibres parasympathiques du nerf vague vers le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMNV) au sein de la medulla oblongata du cerveau. *D'après Mabbott et al., 2006.*

L'agent infectieux atteindrait les sites initiaux de réplication du SNC en se propageant de façon rétrograde le long des fibres efférentes des nerfs sympathiques, comme le nerf vague, et des nerfs parasympathiques, comme le nerf splanchnique (McBride and Beekes, 1999; McBride et al., 2001). Les nerfs parasympathiques, à la différence des nerfs sympathiques, entrent dans le SNC indépendamment du cordon médullaire, ce qui suggère que l'agent infectieux peut entrer dans le

SNC de plusieurs façons. Une fois dans le cordon médullaire, la PrPsc se propage aussi bien dans une direction antérograde que rétrograde (Beekes et al., 1996). Dans la Scrapie du mouton et dans la vMCJ chez l'Homme, il semblerait que le système nerveux entérique soit impliqué dans la neuroinvasion directement à partir du GALT (Haik et al., 2003; Heggebo et al., 2003). Il est important de souligner que la propagation de l'agent des EST au sein du SNP et du SNC est dépendante de l'expression de la PrPc (Blattler et al., 1997; Glatzel and Aguzzi, 2000; Race et al., 2000).

Le mode d'innervation des organes lymphoïdes secondaires, dont la rate, est principalement sympathique, et de nombreuses études suggèrent que le transport de l'agent de la PrPsc des organes lymphoïdes jusqu'au SNC pourrait se faire *via* le système nerveux autonome (Cole and Kimberlin, 1985; McBride and Beekes, 1999). La sympathectomie retarde le début de la Scrapie après une inoculation i.p., tandis qu'une hyper-innervation sympathique augmente la vitesse de réplication de la PrPsc dans la rate et de la neuroinvasion en général. Ces résultats suggèrent que l'innervation des organes lymphoïdes secondaires est une étape limitante de la neuroinvasion (Glatzel et al., 2001). La détection de la PrPsc dans les rates des patients atteints de sMCJ indique que l'interface entre les cellules du système immunitaire et le système nerveux périphérique pourrait également avoir une importance dans les EST sporadiques (Glatzel et al., 2003).

Une étude récente montre que la distance entre les FDCs et les nerfs spléniques a un impact considérable sur la vitesse de neuroinvasion (Prinz et al., 2003a). Dans cette étude, le positionnement des FDC a été modifié par ablation du récepteur de la chemokine CXCR5, qui dirige les lymphocytes vers des micro-compartiments spécifiques (Forster et al., 1996), de telle sorte que la distance entre les FDCs associés aux centres germinatifs et les terminaisons nerveuses était réduite. Chez les souris CXCR5^{-/-}, le repositionnement des FDCs à proximité des artérioles spléniques hyper-innervées, a pour conséquence une augmentation de la vitesse de propagation des prions dans le SNC. Comment l'agent infectieux pourrait-il se propager des FDCs au SNP ? Il est peu probable qu'il soit transféré directement par une synapse nerf-FDC dans la mesure où ces types de contacts physiques sont rares et que chaque type cellulaire occupe un site anatomiquement distinct. Dans la rate, les nerfs sympathiques sont associés aux vaisseaux sanguins, tandis que les FDCs sont situés à la périphérie de la pulpe blanche dans les follicules de cellules B. Il reste à déterminer si cet effet résulte d'une diffusion passive des prions, par exemple grâce à une libération de la PrPsc accumulée dans les FDC *via* des exosomes, ou d'un processus de transport actif, qui impliquerait la participation de cellules mobiles, telles que les lymphocytes B des centres germinatifs ou les DCs. Des connections anatomiques entre les DC circulantes et le

SNP ont été décrites dans la littérature et une étude suggère que les DC pourraient potentiellement transférer l'agent infectieux directement au SNP (Aucouturier et al., 2001).

Une autre possibilité serait l'invasion du cerveau par les prions directement à travers la BHE (Banks et al., 2004). Deux cas de vMCJ dont la transmission est probablement liée à une transfusion sanguine ont récemment été décrit (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004). Ces observations sont en accord avec des études précédentes qui avaient montré que les moutons infectés présentaient des taux significatifs d'infectiosité dans leur sang à un stade préclinique de la maladie (Hunter et al., 2002). La BHE est constituée d'une couche jointive de cellules endothéliales spécialisées et elle empêche les pathogènes, les antigènes ainsi que les cellules d'entrer dans le cerveau par la circulation sanguine. Néanmoins au cours de certaines affections du SNC, les pathogènes et les lymphocytes peuvent traverser la BHE. Il a été montré que les DC ainsi que les cellules T pouvaient traverser la BHE pendant les stades pré-cliniques des EST (Lewicki et al., 2003; Rosicarelli et al., 2005). Cependant, plusieurs arguments peuvent être dressés contre cette théorie. Premièrement, la pathogenèse des prions n'est pas affectée par une déficience en cellules T en cas d'infection périphérique (Klein et al., 1997). Deuxièmement, la corrélation spatiale entre les dépôts de PrPsc et les vaisseaux sanguins chez les patients décédés de sMCJ ne reflète pas une propagation sanguine (Armstrong et al., 2003). Enfin, la déplétion permanente des nerfs sympathiques prévient totalement la neuroinvasion (Glatzel et al., 2001), ce qui démontre clairement que les DC et les LT infiltrés ne constituent pas un mécanisme important de transport de l'agent infectieux au cerveau.

V/ Conclusion et Perspectives

Les EST, dont l'évènement moléculaire clé est la conversion de la PrPc en PrPsc, demeurent à ce jour une maladie incurable. LaPrPsc est exclusivement présente chez les patients atteints, systématiquement co-purifiée avec l'infectiosité et sa présence est intimement liée aux effets neurotoxiques. La découverte de l'activité « anti-prion » d'une molécule au profil toxicologique très satisfaisant ayant déjà fait l'objet d'essais cliniques chez l'Homme telle que le cannabidiol, ouvre de vastes perspectives pour le traitement des EST. Nous avons en effet montré que cette molécule permettait d'inhiber significativement l'accumulation de PrPsc *in vitro* et *in vivo* et également d'allonger le temps de survie des souris infectées. Avant la mise en place d'éventuels essais cliniques, plusieurs expériences peuvent être envisagées dans le but d'améliorer l'efficacité du CBD. Au vu des dosages utilisés lors des précédents essais cliniques, le dosage à administrer lors d'une infection par une EST peut être largement supérieur à celui utilisé dans notre étude. Nous avons montré un effet dépendant de la dose dans l'amélioration du temps de survie, c'est pourquoi la définition du dosage à utiliser pour un effet maximal reste une priorité. L'influence de divers voies d'administration (intra-nasale, orale, etc...) sur l'efficacité du traitement devrait également être définie. Par ailleurs, ce travail pourrait encourager le développement de molécules analogues présentant une solubilité ou une stabilité améliorée par rapport au cannabidiol (i.e. analogues hydrophiles ou non-hydrolysable, etc...). Enfin la découverte du mécanisme d'action du cannabidiol et éventuellement d'un récepteur spécifique à cette molécule contribuerait au développement d'outils pharmacologiques plus ciblés.

L'accumulation de la PrPsc dans le système nerveux central est intimement liée à la perte neuronale et aux symptômes cliniques. Cependant, dans de nombreuses formes d'EST, la PrPsc s'accumule dans un premier temps dans les tissus lymphoïdes, et notamment dans la rate. Dans cet organe, les cellules folliculaires dendritiques, qui sont des cellules résidentes et immobiles, apparaissent comme le principal lieu de réplication de PrPsc. Toutefois, les types cellulaires impliqués dans le transport de la PrPsc du site d'entrée périphérique d'infection jusqu'aux organes lymphoïdes, où se situent les FDC, ne sont pas réellement définis. Les cellules dendritiques sont parmi les candidates les plus plausibles pour ce transport, de par leur fonction physiologique et par leur capacité à répliquer la PrPsc et à propager l'infection. Dans ce contexte, nous avons montré que les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans le transport de la PrPsc lors d'une infection par voie périphérique grâce au modèle de souris transgéniques *DTR*^{+/+} en déplaçant spécifiquement les cellules CD11c⁺ à partir du moment de l'infection pendant une durée totale de 10 jours. Ce travail s'inscrit dans la continuité de deux récentes publications (Raymond et al., 2007; Sethi et al., 2007) ayant également mis en évidence l'importance des

cellules dendritiques dans le transport de la PrP^{sc} par des modèles transgéniques. Ce faisceau de résultats convergents permet de confirmer l'implication des cellules dendritiques comme acteur majeur du transport de la PrP^{sc}. Toutefois, nous avons montré que la déplétion de cellules dendritiques n'entraîne une inhibition de l'accumulation de la PrP^{sc} dans la rate ainsi qu'un allongement du temps de survie chez la souris infectée uniquement après une infection par voie intrapéritonéale et non par voie orale. Lors d'une infection par voie orale, la propagation de la PrP^{sc} passe également par les nerfs périphériques et ce mode de propagation peut permettre de compenser l'absence des cellules dendritiques, si toutefois ces cellules sont impliquées dans cette voie d'infection. L'implication des cellules dendritiques lors d'une infection par voie intrapéritonéale suggère un rôle possible de ces cellules lors d'une infection par voie sanguine. La récente découverte de la possibilité de transmission des EST par transfusion sanguine renforce la nécessité de déterminer les acteurs cellulaires de la propagation de l'agent infectieux.

Interférer dans la propagation de la PrP^{sc} en modifiant les propriétés du système immunitaire pourrait donc constituer une stratégie thérapeutique. Alternativement, les mécanismes immunitaires de l'hôte pourraient être orientés afin de bloquer la conversion de la PrP^c, ou d'éliminer sa conformation anormale. Cependant, la mise en place de telle stratégie nécessite au préalable une connaissance approfondie des fonctions constitutives de la PrP^c dans le système immunitaire afin de prévenir des effets secondaires indésirables. Une des approches possibles dans le but d'élucider les fonctions de la PrP^c était la définition des sites d'expression et de liaison de la PrP^c dans les populations cellulaires du système immunitaire, que nous avons entrepris grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques et du tétramère fluorescent de PrP que nous avons développé. La PrP^c ainsi que ses sites de liaison ont été détectés dans une grande variété de cellules : les cellules B, les granulocytes et les cellules dendritiques en présentent des quantités importantes à leur surface, tandis que les macrophages expriment essentiellement des sites de liaison. En parallèle, nous avons montré que la protéine homologue Doppel présentait des profils d'expression et de sites de liaison très similaires à ceux de la protéine PrP^c. La fonctionnalité de ces interactions a été démontrée dans la lignée de lymphocytes B, avec une induction par les tétramères PrP et Dpl de l'activation de la voie des MAPkinases et une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire. Par ailleurs, l'expression de ces deux protéines peut également être modulée suite à une activation polyclonale dans les lymphocytes B et T. Si l'augmentation de l'expression de la PrP dans des lymphocytes T était connue depuis 1990, l'augmentation de son expression dans les lymphocytes B constitue une nouveauté. Ces résultats suggèrent une fonction proche, voire redondante pour ces deux protéines au sein du système immunitaire et semblent indiquer qu'elles joueraient un rôle dans

l'activation lymphocytaire. L'identification du ou des récepteur(s) de la PrPc permettrait une avancée significative dans la compréhension de sa fonction physiologique. Il serait important de déterminer s'il s'agit d'un récepteur unique exprimé à la surface de toutes les populations marquées par le tétramère de PrP et si la PrPc et Dpl possèdent le ou les même(s) récepteur(s). Par ailleurs, la découverte de récepteurs dans les cellules immunitaires pourraient également avoir des retombées sur la compréhension des mécanismes de propagation de la PrPsc. En effet, il serait envisageable que la PrPsc se lie à la surface cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs de la PrPc. En définitive, la compréhension du rôle de la PrPc dans le système immunitaire pourrait amener non seulement à une meilleure connaissance de la fonction immune mais aussi de la pathogenèse des EST en général.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abid, K. and Soto, C.** (2006). The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2342-51.
- Adjou, K. T., Demaimay, R., Lasmezas, C., Deslys, J. P., Seman, M. and Dormont, D.** (1995). MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2810-2.
- Adjou, K. T., Privat, N., Demart, S., Deslys, J. P., Seman, M., Hauw, J. J. and Dormont, D.** (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., Simoneau, S., Sales, N., Lamoury, F., Dormont, D., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Deslys, J. P. and Lasmezas, C. I.** (2003). A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* **84**, 2595-603.
- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kasczak, R., Rubenstein, R. and Grossman, A.** (2003). Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *J Mol Biol* **332**, 47-57.
- Aguzzi, A.** (1997). Neuro-immune connection in spread of prions in the body? *Lancet* **349**, 742-3.
- Aguzzi, A.** (2003). Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves. *Adv Immunol* **81**, 123-71.
- Aguzzi, A. and Heikenwalder, M.** (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol* **4**, 765-75.
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M. and Miele, G.** (2004). Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *J Clin Invest* **114**, 153-60.
- Aguzzi, A. and Polymenidou, M.** (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* **116**, 313-27.
- Alfa Cisse, M., Sunyach, C., Slack, B. E., Fisher, A., Vincent, B. and Checler, F.** (2007). M1 and M3 muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity. *J Neurosci* **27**, 4083-92.
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. and Clarke, M. C.** (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-6.
- Alper, T., Haig, D. A. and Clarke, M. C.** (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 278-84.
- Anderson, R. G.** (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**, 199-225.
- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W. et al.** (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* **382**, 779-88.
- Andrews, N. J., Farrington, C. P., Ward, H. J., Cousens, S. N., Smith, P. G., Molesworth, A. M., Knight, R. S., Ironside, J. W. and Will, R. G.** (2003). Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **361**, 751-2.
- Antoine, N., Cesbron, J. Y., Coumans, B., Jolles, O., Zorzi, W. and Heinen, E.** (2000). Differential expression of cellular prion protein on human blood and tonsil lymphocytes. *Haematologica* **85**, 475-80.
- Apetri, A. C. and Surewicz, W. K.** (2002). Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *J Biol Chem* **277**, 44589-92.

- Arevalo-Martin, A., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Borrell, J. and Guaza, C.** (2003). Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci* **23**, 2511-6.
- Armstrong, R. A., Cairns, N. J., Ironside, J. W. and Lantos, P. L.** (2003). Does the neuropathology of human patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease reflect haematogenous spread of the disease? *Neurosci Lett* **348**, 37-40.
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Gowland, I., Joiner, S., Fox, K., Cooper, S., Osiguwa, O., Gorry, M., Welch, J., Houghton, R. et al.** (2006). Dissociation of pathological and molecular phenotype of variant Creutzfeldt-Jakob disease in transgenic human prion protein 129 heterozygous mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10759-64.
- Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G. P., Meeker, H. C., Kascsak, R., Carp, R. I. and Wisniewski, T.** (2001). Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest* **108**, 703-8.
- Azzalin, A., Ferrara, V., Arias, A., Cerri, S., Avella, D., Pisu, M. B., Nano, R., Bernocchi, G., Ferretti, L. and Comincini, S.** (2006). Interaction between the cellular prion (PrPC) and the 2P domain K⁺ channel TREK-1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 108-15.
- Bailly, Y., Haeberle, A. M., Blanquet-Grossard, F., Chasserot-Golaz, S., Grant, N., Schulze, T., Bombarde, G., Grassi, J., Cesbron, J. Y. and Lemaire-Vieille, C.** (2004). Prion protein (PrPc) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain. *J Comp Neurol* **473**, 244-69.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L. and Hiley, C. R.** (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 1-4.
- Baldauf, E., Beekes, M. and Diringer, H.** (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* **78 (Pt 5)**, 1187-97.
- Ballerini, C., Gourdain, P., Bachy, V., Blanchard, N., Levavasseur, E., Gregoire, S., Fontes, P., Aucouturier, P., Hivroz, C. and Carnaud, C.** (2006). Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol* **176**, 7254-62.
- Baloui, H., von Boxberg, Y., Vinh, J., Weiss, S., Rossier, J., Nothias, F. and Stettler, O.** (2004). Cellular prion protein/laminin receptor: distribution in adult central nervous system and characterization of an isoform associated with a subtype of cortical neurons. *Eur J Neurosci* **20**, 2605-16.
- Banks, W. A., Niehoff, M. L., Adessi, C. and Soto, C.** (2004). Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 125-30.
- Barclay, G. R., Houston, E. F., Halliday, S. I., Farquhar, C. F. and Turner, M. L.** (2002). Comparative analysis of normal prion protein expression on human, rodent, and ruminant blood cells by using a panel of prion antibodies. *Transfusion* **42**, 517-26.
- Barmada, S., Piccardo, P., Yamaguchi, K., Ghetti, B. and Harris, D. A.** (2004). GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiol Dis* **16**, 527-37.
- Barnewitz, K., Maringer, M., Mitteregger, G., Giese, A., Bertsch, U. and Kretzschmar, H. A.** (2006). Unaltered prion protein cleavage in plasminogen-deficient mice. *Neuroreport* **17**, 527-30.
- Baron, G. S. and Caughey, B.** (2003). Effect of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent and -independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform. *J Biol Chem* **278**, 14883-92.

- Baron, G. S., Wehrly, K., Dorward, D. W., Chesebro, B. and Caughey, B.** (2002). Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J* **21**, 1031-40.
- Baron, T., Bencsik A., Biacabe, A.G., Morignat E., Bessen, R.A.** (2007). Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model. *Emerg Infect Dis* **13** (12), 1887-94.
- Barrault, D. V. and Knight, A. M.** (2004). Distinct sequences in the cytoplasmic domain of complement receptor 2 are involved in antigen internalization and presentation. *J Immunol* **172**, 3509-17.
- Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmona, M., Colombo, L., De Luigi, A., Limido, L., Suardi, S., Rossi, G. et al.** (2003). Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* **77**, 8462-9.
- Barron, R. M. and Manson, J. C.** (2003). A gene-targeted mouse model of P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Clin Lab Med* **23**, 161-73.
- Bartz, J. C., Dejoia, C., Tucker, T., Kincaid, A. E. and Bessen, R. A.** (2005). Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection. *J Virol* **79**, 11858-63.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. and Weissmann, C.** (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-28.
- Batkai, S., Pacher, P., Osei-Hyiaman, D., Radaeva, S., Liu, J., Harvey-White, J., Offertaler, L., Mackie, K., Rudd, M. A., Bukoski, R. D. et al.** (2004). Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* **110**, 1996-2002.
- Baumann, F., Tolnay, M., Brabeck, C., Pahnke, J., Kloz, U., Niemann, H. H., Heikenwalder, M., Rulicke, T., Burkle, A. and Aguzzi, A.** (2007). Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* **26**, 538-47.
- Baybutt, H. and Manson, J.** (1997). Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene* **184**, 125-31.
- Beck, K. E., Kay, J. G. and Braun, J. E.** (2006). Rdj2, a J protein family member, interacts with cellular prion PrP(C). *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 866-71.
- Beekes, M., Baldauf, E. and Diringer, H.** (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* **77** (Pt 8), 1925-34.
- Beekes, M. and McBride, P. A.** (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* **278**, 181-4.
- Behrens, A., Brandner, S., Genoud, N. and Aguzzi, A.** (2001). Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. *EMBO Rep* **2**, 347-52.
- Behrens, A., Genoud, N., Naumann, H., Rulicke, T., Janett, F., Heppner, F. L., Ledermann, B. and Aguzzi, A.** (2002). Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO J* **21**, 3652-8.
- Belichenko, P. V., Miklossy, J., Belser, B., Budka, H. and Celio, M. R.** (1999). Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* **6**, 269-79.

- Bendheim, P. E., Brown, H. R., Rudelli, R. D., Scala, L. J., Goller, N. L., Wen, G. Y., Kascsak, R. J., Cashman, N. R. and Bolton, D. C.** (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**, 149-56.
- Beringue, V., Adjou, K. T., Lamoury, F., Maignien, T., Deslys, J. P., Race, R. and Dormont, D.** (2000a). Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol* **74**, 5432-40.
- Beringue, V., Demoy, M., Lasmezas, C. I., Gouritin, B., Weingarten, C., Deslys, J. P., Andreux, J. P., Couvreur, P. and Dormont, D.** (2000b). Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* **190**, 495-502.
- Beringue, V., Mallinson, G., Kaiser, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J. and Hawke, S.** (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* **126**, 2065-73.
- Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J., Jr.** (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* **1**, 478-9.
- Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T. and Caughey, B.** (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**, 698-700.
- Bessen, R. A. and Marsh, R. F.** (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**, 7859-68.
- Betmouni, S., Perry, V. H. and Gordon, J. L.** (1996). Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* **74**, 1-5.
- Birkett, C. R., Hennion, R. M., Bembridge, D. A., Clarke, M. C., Chree, A., Bruce, M. E. and Bostock, C. J.** (2001). Scrapie strains maintain biological phenotypes on propagation in a cell line in culture. *EMBO J* **20**, 3351-8.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R. and Di Marzo, V.** (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* **134**, 845-52.
- Blanquet-Grossard, F., Thielens, N. M., Vendrely, C., Jamin, M. and Arlaud, G. J.** (2005). Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* **44**, 4349-56.
- Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A. J., Klein, M. A., Voigtlander, T., Weissmann, C. and Aguzzi, A.** (1997). PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* **389**, 69-73.
- Bockman, J. M., Prusiner, S. B., Tateishi, J. and Kingsbury, D. T.** (1987). Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins: host species-specific epitopes. *Ann Neurol* **21**, 589-95.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P. and Prusiner, S. B.** (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-11.
- Borchelt, D. R., Koliatsos, V. E., Guarnieri, M., Pardo, C. A., Sisodia, S. S. and Price, D. L.** (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J Biol Chem* **269**, 14711-4.

- Borchelt, D. R., Rogers, M., Stahl, N., Telling, G. and Prusiner, S. B.** (1993). Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* **3**, 319-29.
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. and Prusiner, S. B.** (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* **110**, 743-52.
- Borchelt, D. R., Taraboulos, A. and Prusiner, S. B.** (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* **267**, 16188-99.
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C. G. and LeBlanc, A.** (2001). Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 39145-9.
- Bragason, B. T. and Palsdottir, A.** (2005). Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci* **29**, 232-44.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. and Aguzzi, A.** (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339-43.
- Brimacombe, D. B., Bennett, A. D., Wusteman, F. S., Gill, A. C., Dann, J. C. and Bostock, C. J.** (1999). Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein. *Biochem J* **342 Pt 3**, 605-13.
- Brown, D. A. and London, E.** (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-36.
- Brown, D. R.** (2002). Mayhem of the multiple mechanisms: modelling neurodegeneration in prion disease. *J Neurochem* **82**, 209-15.
- Brown, D. R. and Besinger, A.** (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 423-9.
- Brown, D. R., Clive, C. and Haswell, S. J.** (2001). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* **76**, 69-76.
- Brown, D. R., Herms, J. and Kretzschmar, H. A.** (1994). Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* **5**, 2057-60.
- Brown, D. R., Nicholas, R. S. and Canevari, L.** (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* **67**, 211-24.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W. et al.** (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-7.
- Brown, D. R., Schmidt, B. and Kretzschmar, H. A.** (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **380**, 345-7.
- Brown, D. R., Schmidt, B. and Kretzschmar, H. A.** (1997b). Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci* **15**, 961-72.
- Brown, D. R., Schmidt, B. and Kretzschmar, H. A.** (1998). Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem* **70**, 1686-93.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. and Kretzschmar, H. A.** (1997c). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**, 104-12.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. and Jones, I. M.** (1999a). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* **344 Pt 1**, 1-5.

- Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Merz, G. S., Wolfe, G. C., Wisniewski, H. M. and Robakis, N. K.** (1990). The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol (Berl)* **80**, 1-6.
- Brown, K. L., Stewart, K., Ritchie, D. L., Mabbott, N. A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W. I. and Bruce, M. E.** (1999b). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1308-12.
- Brown, P., Cathala, F., Raubertas, R. F., Gajdusek, D. C. and Castaigne, P.** (1987). The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* **37**, 895-904.
- Brown, P., Preece, M. A. and Will, R. G.** (1992). "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **340**, 24-7.
- Bruce, M. E.** (1985). Agent replication dynamics in a long incubation period model of mouse scrapie. *J Gen Virol* **66 (Pt 12)**, 2517-22.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C. et al.** (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.
- Bueller, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C.** (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-47.
- Bueller, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. and Weissmann, C.** (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-82.
- Bueller, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (1994). High prion and PrPsc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* **1**, 19-30.
- Burthem, J., Urban, B., Pain, A. and Roberts, D. J.** (2001). The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* **98**, 3733-8.
- Butler, D. A., Scott, M. R., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T. and Prusiner, S. B.** (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* **62**, 1558-64.
- Capellari, S., Cardone, F., Notari, S., Schinina, M. E., Maras, B., Sita, D., Baruzzi, A., Pocchiari, M. and Parchi, P.** (2005). Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene. *Neurology* **64**, 905-7.
- Carleton, A., Tremblay, P., Vincent, J. D. and Lledo, P. M.** (2001). Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflugers Arch* **442**, 223-9.
- Carlini, E. A. and Cunha, J. M.** (1981). Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol* **21**, 417S-427S.
- Carp, R. I. and Callahan, S. M.** (1981). In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology* **16**, 8-13.
- Carp, R. I. and Callahan, S. M.** (1982). Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology* **17**, 201-7.
- Carroll, M. C.** (1998). CD21/CD35 in B cell activation. *Semin Immunol* **10**, 279-86.

- Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. and Bendheim, P. E.** (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**, 185-92.
- Caspi, S., Halimi, M., Yanai, A., Sasson, S. B., Taraboulos, A. and Gabizon, R.** (1998). The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem* **273**, 3484-9.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. and Soto, C.** (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**, 195-206.
- Caughey, B., Brown, K., Raymond, G. J., Katzenstein, G. E. and Thresher, W.** (1994). Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]. *J Virol* **68**, 2135-41.
- Caughey, B., Ernst, D. and Race, R. E.** (1993). Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol* **67**, 6270-2.
- Caughey, B. and Lansbury, P. T.** (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**, 267-98.
- Caughey, B. and Race, R. E.** (1992). Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem* **59**, 768-71.
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. and Chesebro, B.** (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* **63**, 175-81.
- Caughey, B. and Raymond, G. J.** (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**, 18217-23.
- Caughey, B. and Raymond, G. J.** (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* **67**, 643-50.
- Caughey, B., Raymond, G. J. and Bessen, R. A.** (1998a). Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* **273**, 32230-5.
- Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D. and Race, R. E.** (1991a). 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., Raymond, G. J., Kocisko, D. A. and Lansbury, P. T., Jr.** (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. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. and Caughey, W. S.** (1991b). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-80.
- Caughey, W. S., Raymond, L. D., Horiuchi, M. and Caughey, B.** (1998b). Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12117-22.
- Caughey, W.S. and Baron, G.S.** (2006). Prions and their partners in crime. *Nature* **443**, 803-810.
- Chabry, J., Caughey, B. and Chesebro, B.** (1998). Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* **273**, 13203-7.
- Chabry, J., Ratsimanohatra, C., Sponne, I., Elena, P. P., Vincent, J. P. and Pillot, T.** (2003). In vivo and in vitro neurotoxicity of the human prion protein (PrP) fragment P118-135 independently of PrP expression. *J Neurosci* **23**, 462-9.

- Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouyssegur, J. and Lenormand, P.** (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1299-310.
- Chandler, R. L.** (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**, 1378-9.
- Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S. and Schachner, M.** (2003a). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* **22**, 227-33.
- Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P. and Autilio-Gambetti, L.** (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* **270**, 19173-80.
- Chen, Z., Koralov, S. B. and Kelsoe, G.** (2000). Regulation of humoral immune responses by CD21/CD35. *Immunol Rev* **176**, 194-204.
- Chen, Z., Lund, R., Aittokallio, T., Kosonen, M., Nevalainen, O. and Lahesmaa, R.** (2003b). Identification of novel IL-4/Stat6-regulated genes in T lymphocytes. *J Immunol* **171**, 3627-35.
- Cherednichenko Yu, N., Mikhailova, G. R., Rajcani, J. and Zhdanov, V. M.** (1985). In vitro studies with the scrapie agent. *Acta Virol* **29**, 285-93.
- Chesebro, B.** (1998). BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science* **279**, 42-3.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M. et al.** (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-3.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S. et al.** (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**, 1435-9.
- Chiarini, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R. and Linden, R.** (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* **21**, 3317-26.
- Chiesa, R., Pestronk, A., Schmidt, R. E., Tourtellotte, W. G., Ghetti, B., Piccardo, P. and Harris, D. A.** (2001). Primary myopathy and accumulation of PrP^{Sc}-like molecules in peripheral tissues of transgenic mice expressing a prion protein insertional mutation. *Neurobiol Dis* **8**, 279-88.
- Chiesa, R., Piccardo, P., Quaglio, E., Drisaldi, B., Si-Hoe, S. L., Takao, M., Ghetti, B. and Harris, D. A.** (2003). Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J Virol* **77**, 7611-22.
- Cho, H. J.** (1976). Is the scrapie agent a virus? *Nature* **262**, 411-2.
- Cisse, M. A., Sunyach, C., Lefranc-Jullien, S., Postina, R., Vincent, B. and Checler, F.** (2005). The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem* **280**, 40624-31.
- Clarke, M. C. and Haig, D. A.** (1970). Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture. *Nature* **225**, 100-1.
- Clarke, M. C. and Haig, D. A.** (1971). Multiplication of scrapie agent in mouse spleen. *Res Vet Sci* **12**, 195-7.
- Clarke, M. C. and Kimberlin, R. H.** (1984). Pathogenesis of mouse scrapie: distribution of agent in the pulp and stroma of infected spleens. *Vet Microbiol* **9**, 215-25.
- Clarke, M. C. and Millson, G. C.** (1976). Infection of a cell line of mouse L fibroblasts with scrapie agent. *Nature* **261**, 144-5.

- Coitinho, A. S., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Rossato, J. I., Freitas, A. R., Castro, C. C., Cammarota, M., Brentani, R. R., Izquierdo, I. and Martins, V. R.** (2007). Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis* **26**, 282-90.
- Cole, S. and Kimberlin, R. H.** (1985). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of vacuolation in brain and spinal cord after intraperitoneal infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* **11**, 213-27.
- Colling, S. B., Collinge, J. and Jefferys, J. G.** (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett* **209**, 49-52.
- Colling, S. B., Khana, M., Collinge, J. and Jefferys, J. G.** (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* **755**, 28-35.
- Collinge, J.** (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**, 519-50.
- Collinge, J., Palmer, M. S. and Dryden, A. J.** (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **337**, 1441-2.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. and Hill, A. F.** (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-90.
- Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D. J. and Alpers, M. P.** (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**, 2068-74.
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. and Jefferys, J. G.** (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-7.
- Collins, S. J., Lewis, V., Brazier, M., Hill, A. F., Fletcher, A. and Masters, C. L.** (2002). Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* **52**, 503-6.
- Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D. and Silva, J. L.** (2001). DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* **276**, 49400-9.
- Creutzfeldt, H.G.** (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z ges Neurol Psychiatr* **57**, 1-19.
- Criado, J. R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J. L., Wills, D. N., Henriksen, S. J., Race, R., Manson, J. C., Chesebro, B. and Oldstone, M. B.** (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* **19**, 255-65.
- Cronier, S., Laude, H. and Peyrin, J. M.** (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12271-6.
- Cuccioloni, M., Amici, M., Eleuteri, A. M., Biagetti, M., Barocci, S. and Angeletti, M.** (2005). Binding of recombinant PrP^C to human plasminogen: kinetic and thermodynamic study using a resonant mirror biosensor. *Proteins* **58**, 728-34.
- Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Boche, D. and Perry, V. H.** (2005). Comparison of inflammatory and acute-phase responses in the brain and peripheral organs of the ME7 model of prion disease. *J Virol* **79**, 5174-84.
- Cuille, J., and Chelle, P.L.** (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences* **208**, 1058-1160.

- Daude, N., Marella, M. and Chabry, J.** (2003). Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci* **116**, 2775-9.
- de Almeida, C. J., Chiarini, L. B., da Silva, J. P., PM, E. S., Martins, M. A. and Linden, R.** (2005). The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* **77**, 238-46.
- DeArmond, S. J., Kristensson, K. and Bowler, R. P.** (1992). PrP^{sc} causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox. *Prog Brain Res* **94**, 437-46.
- DeArmond, S. J., Mobley, W. C., DeMott, D. L., Barry, R. A., Beckstead, J. H. and Prusiner, S. B.** (1987). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* **37**, 1271-80.
- DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Daggett, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D. et al.** (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* **19**, 1337-48.
- Deleault, N. R., Geoghegan, J. C., Nishina, K., Kasczak, R., Williamson, R. A. and Supattapone, S.** (2005). Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* **280**, 26873-9.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W. and Supattapone, S.** (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* **425**, 717-20.
- Demaimay, R., Adjou, K., Lasmezas, C., Lazarini, F., Cherifi, K., Seman, M., Deslys, J. P. and Dormont, D.** (1994). Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie. *J Gen Virol* **75 (Pt 9)**, 2499-503.
- Demaimay, R., Adjou, K. T., Beringue, V., Demart, S., Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Seman, M. and Dormont, D.** (1997). Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol* **71**, 9685-9.
- Demaimay, R., Chesebro, B. and Caughey, B.** (2000). Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red and other Congo Red analogs. *Arch Virol Suppl*, 277-83.
- Demaimay, R., Harper, J., Gordon, H., Weaver, D., Chesebro, B. and Caughey, B.** (1998). Structural aspects of Congo red as an inhibitor of protease-resistant prion protein formation. *J Neurochem* **71**, 2534-41.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S. and Howlett, A. C.** (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **34**, 605-13.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R.** (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-9.
- Dheen, S. T., Kaur, C. and Ling, E. A.** (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* **14**, 1189-97.
- Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Pietu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D. et al.** (2004). Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res* **64**, 719-27.
- Diaz-Nido, J., Wandosell, F. and Avila, J.** (2002). Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides* **23**, 1323-32.
- Dickinson, A. G.** (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* **44**, 209-41.
- Dickinson, A. G. and Taylor, D. M.** (1978). Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med* **299**, 1413-4.

- Diedrich, J. F., Bendheim, P. E., Kim, Y. S., Carp, R. I. and Haase, A. T.** (1991). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 375-9.
- Dikic, I., Schlessinger, J. and Lax, I.** (1994). PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* **4**, 702-8.
- Diringer, H. and Ehlers, B.** (1991). Chemoprophylaxis of scrapie in mice. *J Gen Virol* **72 (Pt 2)**, 457-60.
- Dodelet, V. C. and Cashman, N. R.** (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* **91**, 1556-61.
- Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R. and Iwaki, T.** (2004). Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* **78**, 4999-5006.
- Doh-Ura, K., Iwaki, T. and Caughey, B.** (2000). Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* **74**, 4894-7.
- Drisaldi, B., Coomaraswamy, J., Mastrangelo, P., Strome, B., Yang, J., Watts, J. C., Chishti, M. A., Marvi, M., Windl, O., Ahrens, R. et al.** (2004). Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins: N-terminal modules in PrPC offset pro-apoptotic activity of the Doppel helix B/B' region. *J Biol Chem* **279**, 55443-54.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A. G., Streeten, B. and Cowen, D.** (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **290**, 692-3.
- Durig, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Rosenthal, C., Schmucker, U., Bieschke, J., Duhrsen, U. and Kretzschmar, H. A.** (2000). Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br J Haematol* **108**, 488-95.
- Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. and Winnacker, E. L.** (1996). Prion protein PrPC interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol* **70**, 4724-8.
- Ehlers, B. and Diringer, H.** (1984). Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol* **65 (Pt 8)**, 1325-30.
- El-Remessy, A. B., Al-Shabrawey, M., Khalifa, Y., Tsai, N. T., Caldwell, R. B. and Liou, G. I.** (2006). Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* **168**, 235-44.
- Elleman, C. J.** (1984). Attempts to establish the scrapie agent in cell lines. *Vet Res Commun* **8**, 309-16.
- Ellis, V., Daniels, M., Misra, R. and Brown, D. R.** (2002). Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. *Biochemistry* **41**, 6891-6.
- Enari, M., Flechsig, E. and Weissmann, C.** (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.
- Epple, G., Schleuning, W. D., Kettelgerdes, G., Kottgen, E., Gessner, R. and Praus, M.** (2004). Prion protein stimulates tissue-type plasminogen activator-mediated plasmin generation via a lysine-binding site on kringle 2. *J Thromb Haemost* **2**, 962-8.
- Esposito, G., De Filippis, D., Maiuri, M. C., De Stefano, D., Carnuccio, R. and Iuvone, T.** (2006). Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett* **399**, 91-5.
- Ettaiche, M., Pichot, R., Vincent, J. P. and Chabry, J.** (2000). In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126. *J Biol Chem* **275**, 36487-90.

- Farquhar, C., Dickinson, A. and Bruce, M.** (1999). Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* **353**, 117.
- Farquhar, C. F. and Dickinson, A. G.** (1986). Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol* **67 (Pt 3)**, 463-73.
- Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A. and Fearon, D. T.** (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4510-4.
- Fioriti, L., Dossena, S., Stewart, L. R., Stewart, R. S., Harris, D. A., Forloni, G. and Chiesa, R.** (2005). Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *J Biol Chem* **280**, 11320-8.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**, 1255-64.
- Fischer, M. B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H. P. and Aguzzi, A.** (2000). Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* **408**, 479-83.
- Fivaz, M., Vilbois, F., Thurnheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P. E., Parton, R. G. and van der Goot, F. G.** (2002). Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J* **21**, 3989-4000.
- Flechsig, E., Hegyi, I., Leimeroth, R., Zuniga, A., Rossi, D., Cozzio, A., Schwarz, P., Rulicke, T., Gotz, J., Aguzzi, A. et al.** (2003). Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *EMBO J* **22**, 3095-101.
- Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (2000). Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* **27**, 399-408.
- Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, S., Chauvin, J. P., Decavel, J. P., Varea, R., Grassi, J., Fontes, M. et al.** (2002). PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *J Virol* **76**, 2434-9.
- Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., Gross, A., Carnaud, C., Kohler, S. and Liautard, J. P.** (2005). Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect Immun* **73**, 6229-36.
- Ford, M. J., Burton, L. J., Li, H., Graham, C. H., Frobert, Y., Grassi, J., Hall, S. M. and Morris, R. J.** (2002). A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* **111**, 533-51.
- Forloni, G.** (1996). Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides. *Curr Opin Neurol* **9**, 492-500.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. and Tagliavini, F.** (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**, 543-6.
- Forloni, G., Iussich, S., Awan, T., Colombo, L., Angeretti, N., Girola, L., Bertani, I., Poli, G., Caramelli, M., Grazia Bruzzone, M. et al.** (2002). Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10849-54.
- Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G. and Lipp, M.** (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* **87**, 1037-47.

- Fournier, J. G., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T. and Robain, O.** (1995). Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III* **318**, 339-44.
- Fraser, H.** (1982). Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* **295**, 149-50.
- Fraser, H. and Dickinson, A. G.** (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature* **226**, 462-3.
- Fraser, H. and Dickinson, A. G.** (1978). Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus. *J Comp Pathol* **88**, 563-73.
- Fraser, H. and Farquhar, C. F.** (1987). Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol* **13**, 211-23.
- Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. and Prusiner, S. B.** (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6617-21.
- Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M. and Ben-Sasson, S. A.** (1993). Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol* **157**, 319-25.
- Gabus, C., Derrington, E., Leblanc, P., Chnaiderman, J., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W. K., Marc, D., Nandi, P. et al.** (2001). The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem* **276**, 19301-9.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. and Alpers, M.** (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**, 794-6.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Jr. and Alpers, M.** (1967). Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* **155**, 212-4.
- Gajdusek, D. C. and Zigas, V.** (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* **257**, 974-8.
- Gao, C., Lei, Y. J., Han, J., Shi, Q., Chen, L., Guo, Y., Gao, Y. J., Chen, J. M., Jiang, H. Y., Zhou, W. et al.** (2006). Recombinant neural protein PrP can bind with both recombinant and native apolipoprotein E in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**, 593-601.
- Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. et al.** (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* **20**, 5863-75.
- Ghetti, B., Dlouhy, S. R., Giaccone, G., Bugiani, O., Frangione, B., Farlow, M. R. and Tagliavini, F.** (1995). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol* **5**, 61-75.
- Gianni, L., Bellotti, V., Gianni, A. M. and Merlini, G.** (1995). New drug therapy of amyloidoses: resorption of AL-type deposits with 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Blood* **86**, 855-61.
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M. and Matthews, W. B.** (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**, 388-9.
- Gidon-Jeangirard, C., Hugel, B., Holl, V., Toti, F., Laplanche, J. L., Meyer, D. and Freyssinet, J. M.** (1999). Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol* **162**, 5712-8.

- Giese, A., Groschup, M. H., Hess, B. and Kretzschmar, H. A.** (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol* **5**, 213-21.
- Gilch, S., Winkhofer, K. F., Groschup, M. H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J. and Schatzl, H. M.** (2001). Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J* **20**, 3957-66.
- Glatzel, M., Abela, E., Maissen, M. and Aguzzi, A.** (2003). Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **349**, 1812-20.
- Glatzel, M. and Aguzzi, A.** (2000). PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* **81**, 2813-21.
- Glatzel, M., Heppner, F. L., Albers, K. M. and Aguzzi, A.** (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**, 25-34.
- Glockshuber, R.** (2001). Folding dynamics and energetics of recombinant prion proteins. *Adv Protein Chem* **57**, 83-105.
- Goldfarb, L. G., Petersen, R. B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A. C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W. W. et al.** (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* **258**, 806-8.
- Goldrath, A. W., Luckey, C. J., Park, R., Benoist, C. and Mathis, D.** (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16885-90.
- Goni, F., Knudsen, E., Schreiber, F., Scholtzova, H., Pankiewicz, J., Carp, R., Meeker, H. C., Rubenstein, R., Brown, D. R., Sy, M. S. et al.** (2005). Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience* **133**, 413-21.
- Gonzalez-Iglesias, R., Pajares, M. A., Ocal, C., Espinosa, J. C., Oesch, B. and Gasset, M.** (2002). Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J Mol Biol* **319**, 527-40.
- Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Forlenza, O. V., Cabral, A. L., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A. et al.** (2000). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* **76**, 85-92.
- Griffith, J. S.** (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-4.
- Grinspoon, L. and Bakalar, J. B.** (1998). The use of cannabis as a mood stabilizer in bipolar disorder: anecdotal evidence and the need for clinical research. *J Psychoactive Drugs* **30**, 171-7.
- Guiroy, D. C., Wakayama, I., Liberski, P. P. and Gajdusek, D. C.** (1994). Relationship of microglia and scrapie amyloid-immunoreactive plaques in kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* **87**, 526-30.
- Guzman, M., Galve-Roperh, I. and Sanchez, C.** (2001). Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 19-22.
- Guzman, M. and Sanchez, C.** (1999). Effects of cannabinoids on energy metabolism. *Life Sci* **65**, 657-64.
- Hadlow, W.** (1959). Scrapie and Kuru. *Lancet* **2**, 289-290.
- Haik, S., Faucheux, B. A., Sazdovitch, V., Privat, N., Kemeny, J. L., Perret-Liaudet, A. and Hauw, J. J.** (2003). The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med* **9**, 1121-3.
- Hainfellner, J. A., Liberski, P. P., Guiroy, D. C., Cervenakova, L., Brown, P., Gajdusek, D. C. and Budka, H.** (1997). Pathology and immunocytochemistry of a kuru brain. *Brain Pathol* **7**, 547-53.

- Hajj, G. N., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., da Silveira, R. B., Santos, T. G., Ribeiro, K. C., Juliano, M. A., Jacchieri, S. G., Zanata, S. M. et al.** (2007). Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J Cell Sci* **120**, 1915-26.
- Halliwell, B.** (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**, 1634-58.
- Hampson, A. J. and Grimaldi, M.** (2001). Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. *Eur J Neurosci* **13**, 1529-36.
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J. and Wink, D.** (1998). Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8268-73.
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Lolic, M., Wink, D., Rosenthal, R. and Axelrod, J.** (2000). Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci* **899**, 274-82.
- Harmey, J. H., Doyle, D., Brown, V. and Rogers, M. S.** (1995). The cellular isoform of the prion protein, PrP_c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 753-9.
- Harris, D. A., Huber, M. T., van Dijken, P., Shyng, S. L., Chait, B. T. and Wang, R.** (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* **32**, 1009-16.
- Haughton, G., Arnold, L. W., Bishop, G. A. and Micolino, T. J.** (1986). The CH series of murine B cell lymphomas: neoplastic analogues of Ly-1+ normal B cells. *Immunol Rev* **93**, 35-51.
- Heckmann, J. G., Lang, C. J., Petruch, F., Druschky, A., Erb, C., Brown, P. and Neundorfer, B.** (1997). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**, 388-90.
- Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Lingappa, V. R.** (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827-34.
- Heggebo, R., Gonzalez, L., Press, C. M., Gunnes, G., Espenes, A. and Jeffrey, M.** (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* **84**, 1327-38.
- Hepner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J. P. and Aguzzi, A.** (2001a). Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* **7**, 976-7.
- Hepner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U. and Aguzzi, A.** (2001b). Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* **294**, 178-82.
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N. and Kretzschmar, H.** (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* **19**, 8866-75.
- Herms, J. W., Tings, T., Dunker, S. and Kretzschmar, H. A.** (2001). Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis* **8**, 324-30.
- Herrmann, L. M., Cheevers, W. P., Davis, W. C., Knowles, D. P. and O'Rourke, K. I.** (2003). CD21-positive follicular dendritic cells: A possible source of PrP_c in lymph node macrophages of scrapie-infected sheep. *Am J Pathol* **162**, 1075-81.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. and Soto, C.** (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* **22**, 5435-45.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. and Lantos, P.** (1997a). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-50, 526.

- Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L. and Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10248-53.
- Hill, A. F., Zeidler, M., Ironside, J. and Collinge, J. (1997b). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* **349**, 99-100.
- Holscher, C., Delius, H. and Burkle, A. (1998). Overexpression of nonconvertible PrPc delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol* **72**, 1153-9.
- Hope, J., Reekie, L. J., Hunter, N., Multhaup, G., Beyreuther, K., White, H., Scott, A. C., Stack, M. J., Dawson, M. and Wells, G. A. (1988). Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* **336**, 390-2.
- Horiuchi, M., Priola, S. A., Chabry, J. and Caughey, B. (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.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R. and Candy, J. M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 621-9.
- Hoshi, K., Yoshino, H., Urata, J., Nakamura, Y., Yanagawa, H. and Sato, T. (2000). Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* **55**, 718-21.
- Houston, F., Foster, J. D., Chong, A., Hunter, N. and Bostock, C. J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**, 999-1000.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R. et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* **54**, 161-202.
- Howlett, A. C., Johnson, M. R., Melvin, L. S. and Milne, G. M. (1988). Nonclassical cannabinoid analgesics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* **33**, 297-302.
- Hsiao, K. K., Groth, D., Scott, M., Yang, S. L., Serban, H., Rapp, D., Foster, D., Torchia, M., Dearmond, S. J. and Prusiner, S. B. (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. K., Scott, M., Foster, D., Groth, D. F., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* **250**, 1587-90.
- Huang, F. P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E. and MacPherson, G. G. (2002). Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* **83**, 267-71.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G. F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G. K. et al. (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* **199**, 303-13.
- Hugel, B., Martinez, M. C., Kunzelmann, C., Blattler, T., Aguzzi, A. and Freyssinet, J. M. (2004). Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2998-3007.
- Hundt, C., Peyrin, J. M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M. L., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. et al. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J* **20**, 5876-86.
- Hunter, N. (2007). Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 619-28.

- Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C. and Houston, F.** (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* **83**, 2897-905.
- Hutter, G., Heppner, F. L. and Aguzzi, A.** (2003). No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem* **384**, 1279-85.
- Ilangumaran, S., He, H. T. and Hoessli, D. C.** (2000). Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins. *Immunol Today* **21**, 2-7.
- Ingrusso, L., Ladogana, A. and Pocchiari, M.** (1995). Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J Virol* **69**, 506-8.
- Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L., Gibbs, N., Waltho, J. P., Clarke, A. R. and Collinge, J.** (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8531-5.
- Jakob, A.** (1921). Über eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomische Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z ges Neurol Psychiatr* **64**, 147-228.
- Jarai, Z., Wagner, J. A., Varga, K., Lake, K. D., Compton, D. R., Martin, B. R., Zimmer, A. M., Bonner, T. I., Buckley, N. E., Mezey, E. et al.** (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14136-41.
- Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T., Jr.** (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-8.
- Jeffrey, M., Halliday, W. G., Bell, J., Johnston, A. R., MacLeod, N. K., Ingham, C., Sayers, A. R., Brown, D. A. and Fraser, J. R.** (2000a). Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**, 41-54.
- Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C. M., Brown, K. L. and Bruce, M. E.** (2000b). Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol* **191**, 323-32.
- Jendroska, K., Heinzl, F. P., Torchia, M., Stowring, L., Kretschmar, H. A., Kon, A., Stern, A., Prusiner, S. B. and DeArmond, S. J.** (1991). Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity. *Neurology* **41**, 1482-90.
- Jimenez-Huete, A., Lievens, P. M., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. and Prelli, F.** (1998). Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am J Pathol* **153**, 1561-72.
- Jones, C. E., Abdelraheim, S. R., Brown, D. R. and Viles, J. H.** (2004). Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein. *J Biol Chem* **279**, 32018-27.
- Jones, S., Batchelor, M., Bhelt, D., Clarke, A. R., Collinge, J. and Jackson, G. S.** (2005). Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem J* **392**, 309-12.
- Jouvin-Marche, E., Attuil-Audenis, V., Aude-Garcia, C., Rachidi, W., Zabel, M., Podevin-Dimster, V., Siret, C., Huber, C., Martinic, M., Riondel, J. et al.** (2006). Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J Immunol* **176**, 3490-7.

- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F. et al.** (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211-20.
- Kanaani, J., Prusiner, S. B., Diacovo, J., Baekkeskov, S. and Legname, G.** (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem* **95**, 1373-86.
- Kaneider, N. C., Kaser, A., Dunzendorfer, S., Tilg, H., Patsch, J. R. and Wiedermann, C. J.** (2005). Neurokinin-1 receptor interacts with PrP(106-126)-induced dendritic cell migration and maturation. *J Neuroimmunol* **158**, 153-8.
- Kaneider, N. C., Kaser, A., Dunzendorfer, S., Tilg, H. and Wiedermann, C. J.** (2003). Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol* **77**, 5535-9.
- Kardos, J., Kovacs, I., Hajos, F., Kalman, M. and Simonyi, M.** (1989). Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci Lett* **103**, 139-44.
- Karniol, I. G., Shirakawa, I., Kasinski, N., Pfeferman, A. and Carlini, E. A.** (1974). Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol* **28**, 172-7.
- Keshet, G. I., Bar-Peled, O., Yaffe, D., Nudel, U. and Gabizon, R.** (2000). The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* **75**, 1889-97.
- Kimberlin, R. H.** (1982). Scrapie agent: prions or virinos? *Nature* **297**, 107-8.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1978). Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J Comp Pathol* **88**, 39-47.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1979a). Antiviral compound effective against experimental scrapie. *Lancet* **2**, 591-2.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1979b). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol* **89**, 551-62.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1983). The antiviral compound HPA-23 can prevent scrapie when administered at the time of infection. *Arch Virol* **78**, 9-18.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1986a). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol* **67 (Pt 2)**, 255-63.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1986b). Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 409-13.
- Kimberlin, R. H. and Walker, C. A.** (1989). The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res* **12**, 201-11.
- Kirby, L., Birkett, C. R., Rudyk, H., Gilbert, I. H. and Hope, J.** (2003). In vitro cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrPres as a model for conversion. *J Gen Virol* **84**, 1013-20.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. and Tateishi, J.** (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* **65**, 6292-5.
- Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Conte da Frota, M. J., Walz, R., Andrades, M. E., da Silva, E. G., Brentani, R. R., Izquierdo, I. and Fonseca Moreira, J. C.** (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* **30**, 1137-44.

- Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M. and Aguzzi, A.** (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390**, 687-90.
- Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C. and Aguzzi, A.** (1998a). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* **4**, 1429-33.
- Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J. et al.** (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* **7**, 488-92.
- Klein, T. R., Kirsch, D., Kaufmann, R. and Riesner, D.** (1998b). Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem* **379**, 655-66.
- Klunk, W. E., Debnath, M. L., Koros, A. M. and Pettegrew, J. W.** (1998). Chrysamine-G, a lipophilic analogue of Congo red, inhibits A beta-induced toxicity in PC12 cells. *Life Sci* **63**, 1807-14.
- Kocisko, D. A. and Caughey, B.** (2006). Mefloquine, an antimalaria drug with antiprion activity in vitro, lacks activity in vivo. *J Virol* **80**, 1044-6.
- Kocisko, D. A., Caughey, W. S., Race, R. E., Roper, G., Caughey, B. and Morrey, J. D.** (2006a). A porphyrin increases survival time of mice after intracerebral prion infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 759-61.
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. and Caughey, B.** (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**, 471-4.
- Kocisko, D. A., Vaillant, A., Lee, K. S., Arnold, K. M., Bertholet, N., Race, R. E., Olsen, E. A., Juteau, J. M. and Caughey, B.** (2006b). Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1034-44.
- Kornblatt, J. A., Marchal, S., Rezaei, H., Kornblatt, M. J., Balny, C., Lange, R., Debey, M. P., Hui Bon Hoa, G., Marden, M. C. and Grosclaude, J.** (2003). The fate of the prion protein in the prion/plasminogen complex. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 518-22.
- Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B.** (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9836-41.
- Krebs, B., Dorner-Ciossek, C., Schmalzbauer, R., Vassallo, N., Herms, J. and Kretzschmar, H. A.** (2006). Prion protein induced signaling cascades in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 13-22.
- Kretzschmar, H. A., Ironside, J. W., DeArmond, S. J. and Tateishi, J.** (1996). Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **53**, 913-20.
- Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B. and Dearmond, S. J.** (1986). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**, 315-24.
- Kristensson, K., Feuerstein, B., Taraboulos, A., Hyun, W. C., Prusiner, S. B. and DeArmond, S. J.** (1993). Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology* **43**, 2335-41.
- Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klohn, P. C., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Collinge, J. and Tabrizi, S. J.** (2005). Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 38851-61.
- Kubosaki, A., Nishimura-Nasu, Y., Nishimura, T., Yusa, S., Sakudo, A., Saeki, K., Matsumoto, Y., Itohara, S. and Onodera, T.** (2003). Expression of normal cellular prion protein (PrP(c)) on T lymphocytes and the

effect of copper ion: Analysis by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 810-3.

Kubosaki, A., Yusa, S., Nasu, Y., Nishimura, T., Nakamura, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Itohara, S. and Onodera, T. (2001). Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 103-7.

Kurschner, C. and Morgan, J. I. (1995). The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 165-8.

Kuwahara, C., Takeuchi, A. M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Yokoyama, T., Itohara, S. and Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**, 225-6.

Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y. G., Masullo, C. and Pocchiari, M. (1992). Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* **73** (Pt 3), 661-5.

Laine, J., Marc, M. E., Sy, M. S. and Axelrad, H. (2001). Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *Eur J Neurosci* **14**, 47-56.

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. and Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* **381**, 743-4.

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J. and Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**, 402-5.

Leclerc, E., Serban, H., Prusiner, S. B., Burton, D. R. and Williamson, R. A. (2006). Copper induces conformational changes in the N-terminal part of cell-surface PrPC. *Arch Virol* **151**, 2103-9.

Lee, H. P., Jun, Y. C., Choi, J. K., Kim, J. I., Carp, R. I. and Kim, Y. S. (2005). The expression of RANTES and chemokine receptors in the brains of scrapie-infected mice. *J Neuroimmunol* **158**, 26-33.

Lee, H. S., Brown, P., Cervenakova, L., Garruto, R. M., Alpers, M. P., Gajdusek, D. C. and Goldfarb, L. G. (2001). Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype. *J Infect Dis* **183**, 192-196.

Legname, G., Nguyen, H. O., Peretz, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (2006). Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19105-10.

Lehmann, S., Milhavel, O. and Mange, A. (1999). Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomed Pharmacother* **53**, 39-46.

Levavasseur, E., Metharom, P., Dorban, G., Nakano, H., Kakiuchi, T., Carnaud, C., Sarradin, P. and Aucouturier, P. (2007). Experimental scrapie in 'plt' mice: an assessment of the role of dendritic-cell migration in the pathogenesis of prion diseases. *J Gen Virol* **88**, 2353-60.

Lewicki, H., Tishon, A., Homann, D., Mazarguil, H., Laval, F., Asensio, V. C., Campbell, I. L., DeArmond, S., Coon, B., Teng, C. et al. (2003). T cells infiltrate the brain in murine and human transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* **77**, 3799-808.

Li, A., Christensen, H. M., Stewart, L. R., Roth, K. A., Chiesa, R. and Harris, D. A. (2007a). Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *EMBO J* **26**, 548-58.

- Li, A. and Harris, D. A.** (2005). Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. *J Biol Chem* **280**, 17430-4.
- Li, A., Piccardo, P., Barmada, S. J., Ghetti, B. and Harris, D. A.** (2007b). Prion protein with an octapeptide insertion has impaired neuroprotective activity in transgenic mice. *EMBO J* **26**, 2777-85.
- Li, R., Liu, D., Zanusso, G., Liu, T., Fayen, J. D., Huang, J. H., Petersen, R. B., Gambetti, P. and Sy, M. S.** (2001). The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol* **207**, 49-58.
- Liberski, P. P., Yanagihara, R., Wells, G. A., Gibbs, C. J., Jr. and Gajdusek, D. C.** (1992). Comparative ultrastructural neuropathology of naturally occurring bovine spongiform encephalopathy and experimentally induced scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Comp Pathol* **106**, 361-81.
- Liemann, S. and Glockshuber, R.** (1999). Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry* **38**, 3258-67.
- Lima, L. M., Cordeiro, Y., Tinoco, L. W., Marques, A. F., Oliveira, C. L., Sampath, S., Kodali, R., Choi, G., Foguel, D., Torriani, I. et al.** (2006). Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry* **45**, 9180-7.
- Liu, L. M. and MacPherson, G. G.** (1993). Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J Exp Med* **177**, 1299-307.
- Liu, T., Li, R., Pan, T., Liu, D., Petersen, R. B., Wong, B. S., Gambetti, P. and Sy, M. S.** (2002). Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**, 47671-8.
- Liu, T., Li, R., Wong, B. S., Liu, D., Pan, T., Petersen, R. B., Gambetti, P. and Sy, M. S.** (2001). Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J Immunol* **166**, 3733-42.
- Lledo, P. M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Nicoll, R. A.** (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2403-7.
- Llewellyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J. and Will, R. G.** (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**, 417-21.
- Lopes, M. H., Hajj, G. N., Muras, A. G., Mancini, G. L., Castro, R. M., Ribeiro, K. C., Brentani, R. R., Linden, R. and Martins, V. R.** (2005). Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuriteogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* **25**, 11330-9.
- Lu, K., Wang, W., Xie, Z., Wong, B. S., Li, R., Petersen, R. B., Sy, M. S. and Chen, S. G.** (2000). Expression and structural characterization of the recombinant human doppel protein. *Biochemistry* **39**, 13575-83.
- Luhr, K. M., Wallin, R. P., Ljunggren, H. G., Low, P., Taraboulos, A. and Kristensson, K.** (2002). Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c(+) myeloid dendritic cells in vitro. *J Virol* **76**, 12259-64.
- Ma, J., Wollmann, R. and Lindquist, S.** (2002). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* **298**, 1781-5.
- Mabbott, N. A., Brown, K. L., Manson, J. and Bruce, M. E.** (1997). T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* **92**, 161-5.

- Mabbott, N. A., Bruce, M. E., Botto, M., Walport, M. J. and Pepys, M. B.** (2001). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* **7**, 485-7.
- Mabbott, N. A., Mackay, F., Minns, F. and Bruce, M. E.** (2000a). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* **6**, 719-20.
- Mabbott, N. A. and MacPherson, G. G.** (2006). Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4**, 201-11.
- Mabbott, N. A., McGovern, G., Jeffrey, M. and Bruce, M. E.** (2002). Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J Virol* **76**, 5131-9.
- Mabbott, N. A., Williams, A., Farquhar, C. F., Pasparakis, M., Kollias, G. and Bruce, M. E.** (2000b). Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol* **74**, 3338-44.
- Mabbott, N. A., Young, J., McConnell, I. and Bruce, M. E.** (2003). Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol* **77**, 6845-54.
- MacGregor, I., Hope, J., Barnard, G., Kirby, L., Drummond, O., Pepper, D., Hornsey, V., Barclay, R., Bessos, H., Turner, M. et al.** (1999). Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox Sang* **77**, 88-96.
- Mackay, F. and Browning, J. L.** (1998). Turning off follicular dendritic cells. *Nature* **395**, 26-7.
- Madore, N., Smith, K. L., Graham, C. H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R.** (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J* **18**, 6917-26.
- Magalhaes, A. C., Silva, J. A., Lee, K. S., Martins, V. R., Prado, V. F., Ferguson, S. S., Gomez, M. V., Brentani, R. R. and Prado, M. A.** (2002). Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**, 33311-8.
- Maignien, T., Shakweh, M., Calvo, P., Marce, D., Sales, N., Fattal, E., Deslys, J. P., Couvreur, P. and Lasmezas, C. I.** (2005). Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm* **298**, 293-304.
- Makrinou, E., Collinge, J. and Antoniou, M.** (2002). Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mamm Genome* **13**, 696-703.
- Malfait, A. M., Gallily, R., Sumariwalla, P. F., Malik, A. S., Andreacos, E., Mechoulam, R. and Feldmann, M.** (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9561-6.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P. C., Brandner, S. and Collinge, J.** (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**, 871-4.
- Mallucci, G. R., Ratte, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G. and Collinge, J.** (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* **21**, 202-10.
- Mallucci, G. R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., Powell, A. D., Brandner, S., Jefferys, J. G. and Collinge, J.** (2007). Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron* **53**, 325-35.

- Mandel, T. E., Phipps, R. P., Abbot, A. and Tew, J. G.** (1980). The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* **53**, 29-59.
- Mander, P. and Brown, G. C.** (2005). Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation* **2**, 20.
- Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y. and Lehmann, S.** (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* **96**, 125-32.
- Mange, A., Milhavel, O., McMahon, H. E., Casanova, D. and Lehmann, S.** (2000a). 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.
- Mange, A., Nishida, N., Milhavel, O., McMahon, H. E., Casanova, D. and Lehmann, S.** (2000b). Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J Virol* **74**, 3135-40.
- Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H. and Hope, J.** (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* **115**, 117-22.
- Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. and Hope, J.** (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**, 121-7.
- Manson, J. C., Hope, J., Clarke, A. R., Johnston, A., Black, C. and MacLeod, N.** (1995). PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* **4**, 113-4.
- Marella, M. and Chabry, J.** (2004). Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* **24**, 620-7.
- Marella, M., Gaggioli, C., Batoz, M., Deckert, M., Tartare-Deckert, S. and Chabry, J.** (2005). Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem* **280**, 1529-34.
- Marella, M., Lehmann, S., Grassi, J. and Chabry, J.** (2002). Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem* **277**, 25457-64.
- Markham, D.** (2000). Prion protein in tonsil and appendix tissue. *Lancet* **356**, 505-6.
- Markovits, P., Dautheville, C., Dormont, D., Dianoux, L. and Latarjet, R.** (1983). In vitro propagation of the scrapie agent. I. Transformation of mouse glia and neuroblastoma cells after infection with the mouse-adapted scrapie strain c-506. *Acta Neuropathol* **60**, 75-80.
- Marsh, R. F. and Bessen, R. A.** (1993). Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. *Dev Biol Stand* **80**, 111-8.
- Marsh, R. F. and Hadlow, W. J.** (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Rev Sci Tech* **11**, 539-50.
- Martin, B. R., Mechoulam, R. and Razdan, R. K.** (1999). Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci* **65**, 573-95.
- Martins, V. R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., de Souza, S. J., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., Zanata, S. M., Neto, V. M. and Brentani, R. R.** (1997). Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* **3**, 1376-82.

- Massi, P., Fuzio, D., Vigano, D., Sacerdote, P. and Parolaro, D.** (2000). Relative involvement of cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors in the Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced inhibition of natural killer activity. *Eur J Pharmacol* **387**, 343-7.
- Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M. P. and Parolaro, D.** (2004). Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 838-45.
- Massimino, M. L., Ballarin, C., Bertoli, A., Casonato, S., Genovesi, S., Negro, A. and Sorgato, M. C.** (2004). Human Doppel and prion protein share common membrane microdomains and internalization pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2016-31.
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J., Jr.** (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* **104**, 559-88.
- Mastrangelo, P. and Westaway, D.** (2001). The prion gene complex encoding PrP(C) and Doppel: insights from mutational analysis. *Gene* **275**, 1-18.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. and Bonner, T. I.** (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561-4.
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganeli, V., Lucania, G., Pavan, A. and Sorice, M.** (2004). Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett* **560**, 14-8.
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Gizzi, C., Mascellino, M. T., Dolo, V., Pontieri, G. M., Sorice, M. and Pavan, A.** (2002). Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochem Res* **27**, 743-9.
- May, B. C., Fafarman, A. T., Hong, S. B., Rogers, M., Deady, L. W., Prusiner, S. B. and Cohen, F. E.** (2003). Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3416-21.
- Mazzoni, I. E., Ledebur, H. C., Jr., Paramithiotis, E. and Cashman, N.** (2005). Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein. *Biochem Cell Biol* **83**, 644-53.
- McBride, P. A. and Beekes, M.** (1999). Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* **265**, 135-8.
- McBride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce, M., Diring, H., Kretzschmar, H. A. and Beekes, M.** (2001). Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* **75**, 9320-7.
- McCoy, K. L., Gainey, D. and Cabral, G. A.** (1995). delta 9-Tetrahydrocannabinol modulates antigen processing by macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 1216-23.
- McCoy, K. L., Matveyeva, M., Carlisle, S. J. and Cabral, G. A.** (1999). Cannabinoid inhibition of the processing of intact lysozyme by macrophages: evidence for CB2 receptor participation. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 1620-5.
- McKenzie, D., Kaczkowski, J., Marsh, R. and Aiken, J.** (1994). Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection. *J Virol* **68**, 7534-6.

- McKinley, M. P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Gonatas, N.** (1991). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* **65**, 622-30.
- McLennan, N. F., Brennan, P. M., McNeill, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K. A., Ritchie, D., Brannan, F., Head, M. W., Ironside, J. W. et al.** (2004). Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* **165**, 227-35.
- Mead, S., Stumpf, M. P., Whitfield, J., Beck, J. A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J. B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E. M. et al.** (2003). Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* **300**, 640-3.
- Mechoulam, R. and Gaoni, Y.** (1965). A Total Synthesis of DL-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* **87**, 3273-5.
- Mechoulam, R., Parker, L. A. and Gallily, R.** (2002). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* **42**, 11S-19S.
- Medori, R., Tritschler, H. J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, P. et al.** (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* **326**, 444-9.
- Meggio, F., Negro, A., Sarno, S., Ruzzene, M., Bertoli, A., Sorgato, M. C. and Pinna, L. A.** (2000). Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. *Biochem J* **352 Pt 1**, 191-6.
- Mercey, R., Lantier, I., Maurel, M. C., Grosclaude, J., Lantier, F. and Marc, D.** (2006). Fast, reversible interaction of prion protein with RNA aptamers containing specific sequence patterns. *Arch Virol* **151**, 2197-214.
- Merlini, G., Ascari, E., Amboldi, N., Bellotti, V., Arbustini, E., Perfetti, V., Ferrari, M., Zorzoli, I., Marinone, M. G., Garini, P. et al.** (1995). Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2959-63.
- Meyer, R. K., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A. and Prusiner, S. B.** (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2310-4.
- Milhavet, O. and Lehmann, S.** (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* **38**, 328-39.
- Milhavet, O., Mange, A., Casanova, D. and Lehmann, S.** (2000). Effect of Congo red on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells. *J Neurochem* **74**, 222-30.
- Miller, A. S. and Walker, J. M.** (1995). Effects of a cannabinoid on spontaneous and evoked neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata. *Eur J Pharmacol* **279**, 179-85.
- Miller, M. W. and Williams, E. S.** (2004). Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol* **284**, 193-214.
- Mironov, A., Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R. A., Burton, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Peters, P. J.** (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* **23**, 7183-93.
- Mishra, R. S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W. Q., Mishra, R., Li, R., Chen, S. G., Gambetti, P., Fujioka, H. et al.** (2004). Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci* **24**, 11280-90.

- Mo, H., Moore, R. C., Cohen, F. E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P. E. and Dyson, H. J.** (2001). Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2352-7.
- Mohan, J., Bruce, M. E. and Mabbott, N. A.** (2005a). Follicular dendritic cell dedifferentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin. *Immunology* **114**, 225-34.
- Mohan, J., Hopkins, J. and Mabbott, N. A.** (2005b). Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure. *Immunology* **116**, 122-33.
- Mohri, S., Handa, S. and Tateishi, J.** (1987). Lack of effect of thymus and spleen on the incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Gen Virol* **68 (Pt 4)**, 1187-9.
- Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P. and Lugaresi, E.** (2003). Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* **2**, 167-76.
- Montrasio, F., Cozzio, A., Flechsig, E., Rossi, D., Klein, M. A., Rulicke, T., Raeber, A. J., Voshenrich, C. A., Proft, J., Aguzzi, A. et al.** (2001). B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4034-7.
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M. A., Mackay, F., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**, 1257-9.
- Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y. et al.** (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* **292**, 797-817.
- Moreira, F. A. and Guimaraes, F. S.** (2005). Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* **512**, 199-205.
- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. and Oesch, B.** (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-17.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. and Kellermann, O.** (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925-8.
- Mouillet-Richard, S., Pietri, M., Schneider, B., Vidal, C., Mutel, V., Launay, J. M. and Kellermann, O.** (2005). Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *J Biol Chem* **280**, 4592-601.
- Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Pradines, E., Pietri, M., Ermonval, M., Grassi, J., Richards, J. G., Mutel, V., Launay, J. M. and Kellermann, O.** (2007). Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* **1096**, 106-19.
- Moya, K. L., Hassig, R., Creminon, C., Laffont, I. and Di Giamberardino, L.** (2004). Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrP^C in peripheral nerve. *J Neurochem* **88**, 155-60.
- Moya, K. L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J. and Di Giamberardino, L.** (2000). Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc Res Tech* **50**, 58-65.
- Muller-Vahl, K. R., Schneider, U., Prevedel, H., Theloe, K., Kolbe, H., Daldrup, T. and Emrich, H. M.** (2003). Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. *J Clin Psychiatry* **64**, 459-65.
- Muller, W. E., Ushijima, H., Schroder, H. C., Forrest, J. M., Schatton, W. F., Rytik, P. G. and Heffner-Laue, M.** (1993). Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* **246**, 261-7.

- Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M.** (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61-5.
- Murakami-Kubo, I., Doh-Ura, K., Ishikawa, K., Kawatake, S., Sasaki, K., Kira, J., Ohta, S. and Iwaki, T.** (2004). Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* **78**, 1281-8.
- Nagayama, T., Sinor, A. D., Simon, R. P., Chen, J., Graham, S. H., Jin, K. and Greenberg, D. A.** (1999). Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* **19**, 2987-95.
- Nagyova, J., Pastorek, J. and Kopacek, J.** (2004). Identification of the critical cis-acting elements in the promoter of the mouse Prnd gene coding for Doppel protein. *Biochim Biophys Acta* **1679**, 288-93.
- Nandi, P. K.** (1997). Interaction of prion peptide HuPrP106-126 with nucleic acid. *Arch Virol* **142**, 2537-45.
- Nandi, P. K. and Leclerc, E.** (1999). Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution. *Arch Virol* **144**, 1751-63.
- Nandi, P. K. and Sizaret, P. Y.** (2001). Murine recombinant prion protein induces ordered aggregation of linear nucleic acids to condensed globular structures. *Arch Virol* **146**, 327-45.
- Narang, H.** (2002). A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 4-19.
- Nazor, K. E., Kuhn, F., Seward, T., Green, M., Zwald, D., Purro, M., Schmid, J., Biffiger, K., Power, A. M., Oesch, B. et al.** (2005). Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* **24**, 2472-80.
- Neutra, M. R., Pringault, E. and Kraehenbuhl, J. P.** (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* **14**, 275-300.
- Nevin, S., Mc, M. W., Behrman, S. and Jones, D. P.** (1960). Subacute spongiform encephalopathy--a subacute form of encephalopathy attributable to vascular dysfunction (spongiform cerebral atrophy). *Brain* **83**, 519-64.
- Nicotera, P.** (2001). A route for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**, 345-8.
- Nieznanski, K., Podlubnaya, Z. A. and Nieznanska, H.** (2006). Prion protein inhibits microtubule assembly by inducing tubulin oligomerization. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 391-9.
- Nishida, N., Harris, D. A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavel, O. and Lehmann, S.** (2000). Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* **74**, 320-5.
- Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoko, R., Atarashi, R., Houtani, T. et al.** (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**, 689-97.
- Nordstrom, E. K., Luhr, K. M., Ibanez, C. and Kristensson, K.** (2005). Inhibitors of the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 signaling pathway clear prion-infected cells from PrPsc. *J Neurosci* **25**, 8451-6.
- Oesch, B., Westaway, D. and Prusiner, S. B.** (1991). Prion protein genes: evolutionary and functional aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**, 109-24.

- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. et al.** (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-46.
- Oishi, T., Hagiwara, K., Kinumi, T., Yamakawa, Y., Nishijima, M., Nakamura, K. and Arimoto, H.** (2003). Effects of beta-sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP(81-145). *Org Biomol Chem* **1**, 2626-9.
- Oldstone, M. B., Race, R., Thomas, D., Lewicki, H., Homann, D., Smelt, S., Holz, A., Koni, P., Lo, D., Chesebro, B. et al.** (2002). Lymphotoxin-alpha- and lymphotoxin-beta-deficient mice differ in susceptibility to scrapie: evidence against dendritic cell involvement in neuroinvasion. *J Virol* **76**, 4357-63.
- Paitel, E., Alves da Costa, C., Vilette, D., Grassi, J. and Checler, F.** (2002). Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem* **83**, 1208-14.
- Paitel, E., Fahraeus, R. and Checler, F.** (2003). Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J Biol Chem* **278**, 10061-6.
- Paitel, E., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Bourdon, J. C., Vincent, B. and Checler, F.** (2004). Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* **279**, 612-8.
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T. and Collinge, J.** (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**, 340-2.
- Paltrinieri, S., Comazzi, S., Spagnolo, V., Rondena, M., Ponti, W. and Cecilian, F.** (2004). Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes. *J Histochem Cytochem* **52**, 1639-45.
- Paltrinieri, S., Spagnolo, V., Giordano, A., Gelmetti, D. and Comazzi, S.** (2006). Bovine prion (PrP) and Doppel (Dpl) proteins expression after in vitro leukocyte activation or Dpl/PrP blocking. *J Cell Physiol* **208**, 446-50.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. et al.** (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-6.
- Pan, T., Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Petersen, R. B. and Sy, M. S.** (2002). Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J* **368**, 81-90.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R. and Shohami, E.** (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* **413**, 527-31.
- Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A. and Raeber, A. J.** (2001). Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *J Biol Chem* **276**, 44627-32.
- Parkin, E. T., Watt, N. T., Turner, A. J. and Hooper, N. M.** (2004). Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein. *J Biol Chem* **279**, 11170-8.
- Pauly, P. C. and Harris, D. A.** (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**, 33107-10.
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E. and Ironside, J. W.** (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**, 527-9.

- Peoc'h, K., Guerin, C., Brandel, J. P., Launay, J. M. and Laplanche, J. L.** (2000). First report of polymorphisms in the prion-like protein gene (PRND): implications for human prion diseases. *Neurosci Lett* **286**, 144-8.
- Peoc'h, K., Serres, C., Frobert, Y., Martin, C., Lehmann, S., Chasseigneaux, S., Sazdovitch, V., Grassi, J., Jouannet, P., Launay, J. M. et al.** (2002). The human "prion-like" protein Doppel is expressed in both Sertoli cells and spermatozoa. *J Biol Chem* **277**, 43071-8.
- Perini, F., Frangione, B. and Prelli, F.** (1996). Prion protein released by platelets. *Lancet* **347**, 1635-6.
- Pertwee, R. G.** (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **74**, 129-80.
- Pertwee, R. G.** (1998). Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem Soc Trans* **26**, 267-72.
- Pertwee, R. G.** (2000). Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 1553-71.
- Pertwee, R. G.** (2001a). Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* **63**, 569-611.
- Pertwee, R. G.** (2001b). Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* **48**, 859-67.
- Pertwee, R. G.** (2002). Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* **95**, 165-74.
- Peters, P. J., Mironov, A., Jr., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S. J., Burton, D. R., Williamson, R. A., Vey, M. et al.** (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* **162**, 703-17.
- Peyrin, J. M., Lasmezas, C. I., Haik, S., Tagliavini, F., Salmona, M., Williams, A., Richie, D., Deslys, J. P. and Dormont, D.** (1999). Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* **10**, 723-9.
- Pillot, T., Drouet, B., Pincon-Raymond, M., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. and Chambaz, J.** (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.
- Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A. and Rodriguez de Fonseca, F.** (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 218-24.
- Pocchiari, M., Casaccia, P. and Ladogana, A.** (1989). Amphotericin B: a novel class of antiscrapie drugs. *J Infect Dis* **160**, 795-802.
- Pocchiari, M., Schmittinger, S. and Masullo, C.** (1987). Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol* **68 (Pt 1)**, 219-23.
- Poli, G., Martino, P. A., Villa, S., Carcassola, G., Giannino, M. L., Dall'Ara, P., Pollera, C., Iussich, S., Tranquillo, V. M., Bareggi, S. et al.** (2004). Evaluation of anti-prion activity of congo red and its derivatives in experimentally infected hamsters. *Arzneimittelforschung* **54**, 406-15.
- Poli, G., Ponti, W., Carcassola, G., Cecilian, F., Colombo, L., Dall'Ara, P., Gervasoni, M., Giannino, M. L., Martino, P. A., Pollera, C. et al.** (2003). In vitro evaluation of the anti-prionic activity of newly synthesized congo red derivatives. *Arzneimittelforschung* **53**, 875-88.
- Politopoulou, G., Seebach, J. D., Schmutge, M., Schwarz, H. P. and Aguzzi, A.** (2000). Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. *Haematologica* **85**, 580-7.
- Poster, D. S., Penta, J. S., Bruno, S. and Macdonald, J. S.** (1981). delta 9-tetrahydrocannabinol in clinical oncology. *JAMA* **245**, 2047-51.

- Premzl, M., Gready, J. E., Jermini, L. S., Simonic, T. and Marshall Graves, J. A.** (2004). Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins--clues from comparative genomic analysis. *Mol Biol Evol* **21**, 2210-31.
- Premzl, M., Sangiorgio, L., Strumbo, B., Marshall Graves, J. A., Simonic, T. and Gready, J. E.** (2003). Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene* **314**, 89-102.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F. L., Fu, Y. X., Lipp, M. and Aguzzi, A.** (2003a). Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* **425**, 957-62.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Schwarz, P., Takeda, K., Akira, S. and Aguzzi, A.** (2003b). Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signalling. *EMBO Rep* **4**, 195-9.
- Prinz, M., Huber, G., Macpherson, A. J., Heppner, F. L., Glatzel, M., Eugster, H. P., Wagner, N. and Aguzzi, A.** (2003c). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol* **162**, 1103-11.
- Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M. A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K. and Aguzzi, A.** (2002). Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 919-24.
- Priola, S. A. and Caughey, B.** (1994). Inhibition of scrapie-associated PrP accumulation. Probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis. *Mol Neurobiol* **8**, 113-20.
- Priola, S. A., Raines, A. and Caughey, W.** (2003). Prophylactic and therapeutic effects of phthalocyanine tetrasulfonate in scrapie-infected mice. *J Infect Dis* **188**, 699-705.
- Priola, S. A., Raines, A. and Caughey, W. S.** (2000). Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**, 1503-6.
- Prusiner, S. B.** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-44.
- Prusiner, S. B.** (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-83.
- Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L. and DeArmond, S. J.** (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10608-12.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. and Hood, L. E.** (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38**, 127-34.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A. et al.** (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-86.
- Qin, K., Coomaraswamy, J., Mastrangelo, P., Yang, Y., Lugowski, S., Petromilli, C., Prusiner, S. B., Fraser, P. E., Goldberg, J. M., Chakrabarty, A. et al.** (2003). The PrP-like protein Doppel binds copper. *J Biol Chem* **278**, 8888-96.
- Qin, K., Zhao, L., Tang, Y., Bhatta, S., Simard, J. M. and Zhao, R. Y.** (2006). Doppel-induced apoptosis and counteraction by cellular prion protein in neuroblastoma and astrocytes. *Neuroscience* **141**, 1375-88.
- Race, R.** (1991). The scrapie agent in vitro. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**, 181-93.

Race, R., Oldstone, M. and Chesebro, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* **74**, 828-33.

Race, R. E., Fadness, L. H. and Chesebro, B. (1987). Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* **68 (Pt 5)**, 1391-9.

Race, R. E., Priola, S. A., Bessen, R. A., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G. F., Mucke, L., Chesebro, B. and Oldstone, M. B. (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* **15**, 1183-91.

Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P., Arlotto, M., Riondel, J., Laude, H., Lehmann, S. and Favier, A. (2003). Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol Chem* **278**, 9064-72.

Radovanovic, I., Braun, N., Giger, O. T., Mertz, K., Miele, G., Prinz, M., Navarro, B. and Aguzzi, A. (2005). Truncated prion protein and Doppel are myelinotoxic in the absence of oligodendrocytic PrPC. *J Neurosci* **25**, 4879-88.

Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. and O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-8.

Raeber, A. J., Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1999a). PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *Embo J* **18**, 2702-6.

Raeber, A. J., Race, R. E., Brandner, S., Priola, S. A., Sailer, A., Bessen, R. A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M. B. et al. (1997). Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J* **16**, 6057-65.

Raeber, A. J., Sailer, A., Hegyi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Fischer, M., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1999b). Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3987-92.

Rajendran, K. S. and Nagy, P. D. (2003). Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. *J Virol* **77**, 9244-58.

Raman, C., McAllister, S. D., Rizvi, G., Patel, S. G., Moore, D. H. and Abood, M. E. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **5**, 33-9.

Rambold, A. S., Miesbauer, M., Rapaport, D., Bartke, T., Baier, M., Winklhofer, K. F. and Tatzelt, J. (2006). Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* **17**, 3356-68.

Ramirez, B. G., Blazquez, C., Gomez del Pulgar, T., Guzman, M. and de Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* **25**, 1904-13.

Raymond, C. R., Aucouturier, P. and Mabbott, N. A. (2007). In vivo depletion of CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* **179**, 7758-66.

Raymond, G. J., Olsen, E. A., Lee, K. S., Raymond, L. D., Bryant, P. K., 3rd, Baron, G. S., Caughey, W. S., Kocisko, D. A., McHolland, L. E., Favara, C. et al. (2006). Inhibition of protease-resistant prion protein formation in a transformed deer cell line infected with chronic wasting disease. *J Virol* **80**, 596-604.

- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P. and Ricciardi-Castagnoli, P.** (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-7.
- Rezaie, P. and Lantos, P. L.** (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* **35**, 55-72.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I. and Weiss, S.** (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* **3**, 1383-8.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wuthrich, K.** (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-2.
- Robakis, N. K., Sawh, P. R., Wolfe, G. C., Rubenstein, R., Carp, R. I. and Innis, M. A.** (1986). Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6377-81.
- Robertson, C., Booth, S. A., Beniac, D. R., Coulthart, M. B., Booth, T. F. and McNicol, A.** (2006). Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* **107**, 3907-11.
- Roikhel, V. M., Fokina, G. I., Lisak, V. M., Kondakova, L. I., Korolev, M. B. and Pogodina, V. V.** (1987). Persistence of the scrapie agent in glial cells from rat Gasserian ganglion. *Acta Virol* **31**, 36-42.
- Roikhel, V. M., Fokina, G. I. and Pogodina, V. V.** (1984). Influence of aminasine on experimental scrapie in mice. *Acta Virol* **28**, 321-4.
- Romanov, V., Sobel, M. E., Pinto da Silva, P., Menard, S. and Castronovo, V.** (1994). Cell localization and redistribution of the 67 kD laminin receptor and alpha 6 beta 1 integrin subunits in response to laminin stimulation: an immunogold electron microscopy study. *Cell Adhes Commun* **2**, 201-9.
- Rosicarelli, B., Serafini, B., Sbriccoli, M., Lu, M., Cardone, F., Pocchiari, M. and Aloisi, F.** (2005). Migration of dendritic cells into the brain in a mouse model of prion disease. *J Neuroimmunol* **165**, 114-20.
- Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M. A., Rulicke, T., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J* **20**, 694-702.
- Roucou, X., Gains, M. and LeBlanc, A. C.** (2004). Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* **75**, 153-61.
- Roucou, X., Giannopoulos, P. N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C. G. and LeBlanc, A.** (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* **12**, 783-95.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C. G. and LeBlanc, A. C.** (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* **278**, 40877-81.
- Rubenstein, R., Carp, R. I. and Callahan, S. M.** (1984). In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells. *J Gen Virol* **65 (Pt 12)**, 2191-8.
- Russo, E. and Guy, G. W.** (2006). A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses* **66**, 234-46.
- Russo, E. B.** (2004). Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? *Neuro Endocrinol Lett* **25**, 31-9.

- Ryou, C., Prusiner, S. B. and Legname, G.** (2003). Cooperative binding of dominant-negative prion protein to kringle domains. *J Mol Biol* **329**, 323-33.
- Saborio, G. P., Permanne, B. and Soto, C.** (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810-3.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B.** (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* **4**, 1157-65.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**, 967-8.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S. et al.** (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-31.
- Sakurai-Yamashita, Y., Sakaguchi, S., Yoshikawa, D., Okimura, N., Masuda, Y., Katamine, S. and Niwa, M.** (2005). Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* **136**, 281-7.
- Sales, N., Hassig, R., Rodolfo, K., Di Giamberardino, L., Traiffort, E., Ruat, M., Fretier, P. and Moya, K. L.** (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci* **15**, 1163-77.
- Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di Giamberardino, L. and Moya, K. L.** (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* **10**, 2464-71.
- Sanchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P. and Guzman, M.** (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* **436**, 6-10.
- Sanchez, C., Rueda, D., Segui, B., Galve-Roperh, I., Levade, T. and Guzman, M.** (2001). The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol* **59**, 955-9.
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. and Schachner, M.** (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* **169**, 341-54.
- Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., Mobley, W. C. and Prusiner, S. B.** (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* **71**, 8821-31.
- Schmitt-Ulms, G., Hansen, K., Liu, J., Cowdrey, C., Yang, J., DeArmond, S. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. and Baldwin, M. A.** (2004). Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. *Nat Biotechnol* **22**, 724-31.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. et al.** (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (NCAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* **314**, 1209-25.
- Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S. and Kellermann, O.** (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and non-neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13326-31.
- Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barritault, D. and Taraboulos, A.** (2003). Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 473-9.

- Schultz, J., Schwarz, A., Neidhold, S., Burwinkel, M., Riemer, C., Simon, D., Kopf, M., Otto, M. and Baier, M.** (2004). Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am J Pathol* **165**, 671-8.
- Schwaeble, W., Schafer, M. K., Petry, F., Fink, T., Knebel, D., Weihe, E. and Loos, M.** (1995). Follicular dendritic cells, interdigitating cells, and cells of the monocyte-macrophage lineage are the C1q-producing sources in the spleen. Identification of specific cell types by in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *J Immunol* **155**, 4971-8.
- Schwarz, A., Kratke, O., Burwinkel, M., Riemer, C., Schultz, J., Henklein, P., Bamme, T. and Baier, M.** (2003). Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett* **350**, 187-9.
- Scott, J. R., Foster, J. D. and Fraser, H.** (1993). Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease. *Vet Microbiol* **34**, 305-9.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J. et al.** (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**, 847-57.
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B.** (1999). Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15137-42.
- Sepelakova, J., Takacova, M., Pastorekova, S. and Kopacek, J.** (2005). Involvement of upstream stimulatory factor in regulation of the mouse Prnd gene coding for Doppel protein. *Biochim Biophys Acta* **1731**, 209-14.
- Sethi, S., Kerksiek, K. M., Brocker, T. and Kretzschmar, H.** (2007). Role of the CD8+ dendritic cell subset in transmission of prions. *J Virol* **81**, 4877-80.
- Shaked, Y., Engelstein, R. and Gabizon, R.** (2002a). The binding of prion proteins to serum components is affected by detergent extraction conditions. *J Neurochem* **82**, 1-5.
- Shaked, Y., Hijazi, N. and Gabizon, R.** (2002b). Doppel and PrP(C) do not share the same membrane microenvironment. *FEBS Lett* **530**, 85-8.
- Sharma, P., Sabharanjak, S. and Mayor, S.** (2002). Endocytosis of lipid rafts: an identity crisis. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 205-14.
- Shen, M. and Thayer, S. A.** (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol Pharmacol* **54**, 459-62.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C. et al.** (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**, 203-14.
- Shortman, K. and Liu, Y. J.** (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-61.
- Shyng, S. L., Heuser, J. E. and Harris, D. A.** (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **125**, 1239-50.
- Shyng, S. L., Huber, M. T. and Harris, D. A.** (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **268**, 15922-8.
- Shyng, S. L., Lehmann, S., Moulder, K. L. and Harris, D. A.** (1995). Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP^C, in cultured cells. *J Biol Chem* **270**, 30221-9.
- Sigurdson, C. J. and Aguzzi, A.** (2007). Chronic wasting disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 610-8.
- Sigurdson, C. J. and Miller, M. W.** (2003). Other animal prion diseases. *Br Med Bull* **66**, 199-212.

- Sigurdsson, E. M., Brown, D. R., Daniels, M., Kascsak, R. J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H. C., Frangione, B. and Wisniewski, T.** (2002). Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol* **161**, 13-7.
- Sigurdsson, E. M., Sy, M. S., Li, R., Scholtzova, H., Kascsak, R. J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H. C., Frangione, B. and Wisniewski, T.** (2003). Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci Lett* **336**, 185-7.
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F. and Caughey, B.** (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257-61.
- Silverman, G. L., Qin, K., Moore, R. C., Yang, Y., Mastrangelo, P., Tremblay, P., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. and Westaway, D.** (2000). Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* **275**, 26834-41.
- Simons, K. and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9.
- Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. and Leon, A.** (1996). The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3984-9.
- Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., Chambers, J. K., Randall, A. D. and Davis, J. B.** (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* **129**, 227-30.
- Snow, A. D., Kisilevsky, R., Willmer, J., Prusiner, S. B. and DeArmond, S. J.** (1989). Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases. *Acta Neuropathol* **77**, 337-42.
- Solassol, J., Crozet, C. and Lehmann, S.** (2003). Prion propagation in cultured cells. *Br Med Bull* **66**, 87-97.
- Solassol, J., Crozet, C., Perrier, V., Leclaire, J., Beranger, F., Caminade, A. M., Meunier, B., Dormont, D., Majoral, J. P. and Lehmann, S.** (2004). Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie. *J Gen Virol* **85**, 1791-9.
- Solfrosi, L., Criado, J. R., McGavern, D. B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., Wiseman, E., Abalos, G. et al.** (2004). Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* **303**, 1514-6.
- Soto, C.** (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**, 49-60.
- Soto, C., Kascsak, R. J., Saborio, G. P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kascsak, R., Mendez, E., Harris, D. A., Ironside, J. et al.** (2000). Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* **355**, 192-7.
- Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castano, E. M. and Frangione, B.** (1998). Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* **4**, 822-6.
- Spielhaupt, C. and Schatzl, H. M.** (2001). PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* **276**, 44604-12.

- Spudich, A., Frigg, R., Kilic, E., Kilic, U., Oesch, B., Raeber, A., Bassetti, C. L. and Hermann, D. M.** (2005). Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* **20**, 442-9.
- Srivastava, M. D., Srivastava, B. I. and Brouhard, B.** (1998). Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology* **40**, 179-85.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. and Prusiner, S. B.** (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-40.
- Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S. and Macklis, J. D.** (2006). Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3416-21.
- Steffens, S., Veillard, N. R., Arnaud, C., Pelli, G., Burger, F., Staub, C., Karsak, M., Zimmer, A., Frossard, J. L. and Mach, F.** (2005). Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* **434**, 782-6.
- Stella, N., Schweitzer, P. and Piomelli, D.** (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773-8.
- Stewart, R. S. and Harris, D. A.** (2005). A transmembrane form of the prion protein is localized in the Golgi apparatus of neurons. *J Biol Chem* **280**, 15855-64.
- Stewart, R. S., Piccardo, P., Ghetti, B. and Harris, D. A.** (2005). Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J Neurosci* **25**, 3469-77.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B.** (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* **37**, 7185-93.
- Stuermer, C. A., Langhorst, M. F., Wiechers, M. F., Legler, D. F., Von Hanwehr, S. H., Guse, A. H. and Plattner, H.** (2004). PrP^c capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J* **18**, 1731-3.
- Su, J. Y. and Vo, A. C.** (2007). 2-Arachidonylglyceryl ether and abnormal cannabidiol-induced vascular smooth muscle relaxation in rabbit pulmonary arteries via receptor-pertussis toxin sensitive G proteins-ERK1/2 signaling. *Eur J Pharmacol* **559**, 189-95.
- Sun, G., Guo, M., Shen, A., Mei, F., Peng, X., Gong, R., Guo, D., Wu, J., Tien, P. and Xiao, G.** (2005). Bovine PrP^c directly interacts with alphaB-crystalline. *FEBS Lett* **579**, 5419-24.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M. W. and Morris, R.** (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* **22**, 3591-601.
- Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H. O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J. et al.** (1999a). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* **96**, 869-78.
- Supattapone, S., Nguyen, H. O., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. and Scott, M. R.** (1999b). Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14529-34.
- Supattapone, S., Nishina, K. and Rees, J. R.** (2002). Pharmacological approaches to prion research. *Biochem Pharmacol* **63**, 1383-8.
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F. C., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. and Scott, M. R.** (2001). Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* **75**, 3453-61.

- Swietnicki, W., Petersen, R. B., Gambetti, P. and Surewicz, W. K.** (1998). Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem* **273**, 31048-52.
- Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T. et al.** (2000). Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol* **300**, 1309-22.
- Tagliavini, F., McArthur, R. A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P. M., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P. et al.** (1997). Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* **276**, 1119-22.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Porro, M., Salmona, M., Bugiani, O. and Frangione, B.** (1992). A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 1398-404.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G. et al.** (1993). Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9678-82.
- Takemura, K., Wang, P., Vorberg, I., Surewicz, W., Priola, S. A., Kanthasamy, A., Pottathil, R., Chen, S. G. and Sreevatsan, S.** (2006). DNA aptamers that bind to PrP(C) and not PrP(Sc) show sequence and structure specificity. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 204-14.
- Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D. and Prusiner, S. B.** (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* **3**, 851-63.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. and Prusiner, S. B.** (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* **129**, 121-32.
- Taraboulos, A., Serban, D. and Prusiner, S. B.** (1990). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol* **110**, 2117-32.
- Tateishi, J., Kitamoto, T., Hoque, M. Z. and Furukawa, H.** (1996). Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology* **46**, 532-7.
- Telling, G. C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B.** (1996a). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev* **10**, 1736-50.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. and Prusiner, S. B.** (1996b). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**, 2079-82.
- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B.** (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., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B.** (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90.
- Thackray, A. M., McKenzie, A. N., Klein, M. A., Lauder, A. and Bujdoso, R.** (2004). Accelerated prion disease in the absence of interleukin-10. *J Virol* **78**, 13697-707.

- Thielen, C., Antoine, N., Melot, F., Cesbron, J. Y., Heinen, E. and Tsunoda, R.** (2001). Human FDC express PrPc in vivo and in vitro. *Dev Immunol* **8**, 259-66.
- Tiveron, M. C., Nosten-Bertrand, M., Jani, H., Garnett, D., Hirst, E. M., Grosveld, F. and Morris, R. J.** (1994). The mode of anchorage to the cell surface determines both the function and the membrane location of Thy-1 glycoprotein. *J Cell Sci* **107 (Pt 7)**, 1783-96.
- Tobler, I., Deboer, T. and Fischer, M.** (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* **17**, 1869-79.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. and Manson, J. C.** (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-42.
- Todd, N. V., Morrow, J., Doh-ura, K., Dealler, S., O'Hare, S., Farling, P., Duddy, M. and Rainov, N. G.** (2005). Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect* **50**, 394-6.
- Tranulis, M. A., Espenes, A., Comincini, S., Skretting, G. and Harbitz, I.** (2001). The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression. *Mamm Genome* **12**, 376-9.
- Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C. J., Cohen, P. and Ullrich, A.** (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* **4**, 694-701.
- Tremblay, P., Bouzamondo-Bernstein, E., Heinrich, C., Prusiner, S. B. and DeArmond, S. J.** (2007). Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res* **1139**, 60-7.
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J. and Johnson, E. M., Jr.** (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* **25**, 412-7.
- Tuzi, N. L., Gall, E., Melton, D. and Manson, J. C.** (2002). Expression of doppel in the CNS of mice does not modulate transmissible spongiform encephalopathy disease. *J Gen Virol* **83**, 705-11.
- Uboldi, C., Del Vecchio, I., Foti, M. G., Azzalin, A., Paulis, M., Raimondi, E., Vaccari, G., Agrimi, U., Di Guardo, G., Comincini, S. et al.** (2005). Prion-like Doppel gene (PRND) in the goat: genomic structure, cDNA, and polymorphisms. *Mamm Genome* **16**, 963-71.
- Van Everbroeck, B., Dewulf, E., Pals, P., Lubke, U., Martin, J. J. and Cras, P.** (2002). The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* **23**, 59-64.
- Vaney, C., Heinzl-Gutenbrunner, M., Jobin, P., Tschopp, F., Gattlen, B., Hagen, U., Schnelle, M. and Reif, M.** (2004). Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Mult Scler* **10**, 417-24.
- Vassallo, N., Herms, J., Behrens, C., Krebs, B., Saeki, K., Onodera, T., Windl, O. and Kretzschmar, H. A.** (2005). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 75-82.
- Venderova, K., Ruzicka, E., Vorisek, V. and Visnovsky, P.** (2004). Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms. *Mov Disord* **19**, 1102-6.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. and Prusiner, S. B.** (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14945-9.

- Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E. and Dyson, H. J.** (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2042-7.
- Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S. and Laude, H.** (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.
- Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. and Checler, F.** (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem* **276**, 37743-6.
- Volicer, L., Stelly, M., Morris, J., McLaughlin, J. and Volicer, B. J.** (1997). Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **12**, 913-9.
- Volkel, D., Zimmermann, K., Zerr, I., Bodemer, M., Lindner, T., Turecek, P. L., Poser, S. and Schwarz, H. P.** (2001). Immunochemical determination of cellular prion protein in plasma from healthy subjects and patients with sporadic CJD or other neurologic diseases. *Transfusion* **41**, 441-8.
- Wade, D. T., Makela, P., Robson, P., House, H. and Bateman, C.** (2004). Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Mult Scler* **10**, 434-41.
- Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B., Casareno, R. L., Prohaska, J. R., Gitlin, J. D. and Harris, D. A.** (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* **275**, 7455-8.
- Wallace, M. J., Martin, B. R. and DeLorenzo, R. J.** (2002). Evidence for a physiological role of endo-cannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur J Pharmacol* **452**, 295-301.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K. and Stella, N.** (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* **23**, 1398-405.
- Warner, R. G., Hundt, C., Weiss, S. and Turnbull, J. E.** (2002). Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**, 18421-30.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S. and Katamine, S.** (2003). Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J Exp Med* **198**, 5-17.
- Watts, J. C., Drisaldi, B., Ng, V., Yang, J., Strome, B., Horne, P., Sy, M. S., Yoong, L., Young, R., Mastrangelo, P. et al.** (2007). The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J* **26**, 4038-50.
- Watts, J. C. and Westaway, D.** (2007). The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 654-72.
- Weil, A. T., Zinberg, N. E. and Nelsen, J. M.** (1968). Clinical and psychological effects of marihuana in man. *Science* **162**, 1234-42.
- Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I. and Bahr, M.** (2006). Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**, 1296-300.
- Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M. H., Kretzschmar, H. A., Famulok, M. and Winnacker, E. L.** (1997). RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* **71**, 8790-7.
- Weissmann, C.** (1996). PrP effects clarified. *Curr Biol* **6**, 1359.

- Weissmann, C. and Aguzzi, A.** (1999). Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. *Science* **286**, 914-5.
- Weissmann, C., Enari, M., Klohn, P. C., Rossi, D. and Flechsig, E.** (2002). Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**, 16378-83.
- Weissmann, C. and Flechsig, E.** (2003). PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* **66**, 43-60.
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M. and Bradley, R.** (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**, 419-20.
- White, A. R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J. and Hawke, S.** (2003). Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**, 80-3.
- Whittle, I. R., Knight, R. S. and Will, R. G.** (2006). Unsuccessful intraventricular pentosan polysulphate treatment of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurochir (Wien)* **148**, 677-9; discussion 679.
- Whyte, S. M., Sylvester, I. D., Martin, S. R., Gill, A. C., Wopfner, F., Schatzl, H. M., Dodson, G. G. and Bayley, P. M.** (2003). Stability and conformational properties of doppel, a prion-like protein, and its single-disulphide mutant. *Biochem J* **373**, 485-94.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. and Hueston, W. D.** (1992). Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sci* **52**, 325-31.
- Will, R. G.** (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* **66**, 255-65.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. and Smith, P. G.** (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-5.
- Will, R. G., Zeidler, M., Stewart, G. E., Macleod, M. A., Ironside, J. W., Cousens, S. N., Mackenzie, J., Estibeiro, K., Green, A. J. and Knight, R. S.** (2000). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **47**, 575-82.
- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D. and Bruce, M.** (1997a). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* **144**, 433-8.
- Williams, A., Van Dam, A. M., Ritchie, D., Eikelenboom, P. and Fraser, H.** (1997b). Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res* **754**, 171-80.
- Williams, A. E., Lawson, L. J., Perry, V. H. and Fraser, H.** (1994). Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* **20**, 47-55.
- Williams, E. S.** (2005). Chronic wasting disease. *Vet Pathol* **42**, 530-49.
- Williamson, R. A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Burton, D. R.** (1996). Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7279-82.
- Winkhofer, K. F. and Tatzelt, J.** (2000). Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{Sc} in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol Chem* **381**, 463-9.

- Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Pan, T., Petersen, R. B., Smith, M. A., Gambetti, P., Perry, G., Manson, J. C., Brown, D. R. et al.** (2001a). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* **76**, 565-72.
- Wong, C., Xiong, L. W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B. and Caughey, B.** (2001b). Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J* **20**, 377-86.
- Wong, K., Qiu, Y., Hyun, W., Nixon, R., VanCleave, J., Sanchez-Salazar, J., Prusiner, S. B. and DeArmond, S. J.** (1996). Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP3 release. *Neurology* **47**, 741-50.
- Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Hewitt, P. et al.** (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**, 2061-7.
- Wurm, S., Paar, C., Sonnleitner, A., Sonnleitner, M., Höglinger, O., Romanin, C. and Wechselberger, C.** (2004). Co-localization of CD3 and prion protein in Jurkat lymphocytes after hypothermal stimulation. *FEBS Lett* **566**, 121-5.
- Wuthrich, K. and Riek, R.** (2001). Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv Protein Chem* **57**, 55-82.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C. and MacPherson, G. G.** (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* **161**, 1313-9.
- Xi, Y. G., Ingrosso, L., Ladogana, A., Masullo, C. and Pocchiari, M.** (1992). Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature* **356**, 598-601.
- Yadavalli, R., Guttman, R. P., Seward, T., Centers, A. P., Williamson, R. A. and Telling, G. C.** (2004). Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrP^{Sc} modulates scrapie prion propagation. *J Biol Chem* **279**, 21948-56.
- Yehiely, F., Bamborough, P., Da Costa, M., Perry, B. J., Thinakaran, G., Cohen, F. E., Carlson, G. A. and Prusiner, S. B.** (1997). Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Dis* **3**, 339-55.
- Yoshida, K., van den Berg, T. K. and Dijkstra, C. D.** (1993). Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* **80**, 34-9.
- Yu, P., Wang, Y., Chin, R. K., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Kosco-Vibois, M. H., Cyster, J. and Fu, Y. X.** (2002). B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J Immunol* **168**, 5117-23.
- Yudovin-Farber, I., Azzam, T., Metzger, E., Taraboulos, A. and Domb, A. J.** (2005). Cationic polysaccharides as antiprion agents. *J Med Chem* **48**, 1414-20.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K.** (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 145-50.
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A. and Thompson, A.** (2003). Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **362**, 1517-26.

Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R., Cabral, A. L., Lee, K. S., Juliano, M. A. et al. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* **21**, 3307-16.

Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S. and Lodish, H. F. (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2184-9.

Zuardi, A. W., Morais, S. L., Guimaraes, F. S. and Mechoulam, R. (1995). Antipsychotic effect of cannabidiol. *J Clin Psychiatry* **56**, 485-6.

Zygmunt, P. M., Andersson, D. A. and Hogestatt, E. D. (2002). Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol activate capsaicin-sensitive sensory nerves via a CB1 and CB2 cannabinoid receptor-independent mechanism. *J Neurosci* **22**, 4720-7.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. and Hogestatt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452-7.

Rôle des cellules immunitaires et effets des cannabinoïdes dans la physiopathologie des maladies à prions

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) regroupent un ensemble de maladies neurodégénératives dont l'issue est toujours fatale. L'évènement moléculaire clé des EST est la conversion de la protéine prion cellulaire (PrP_c) en une isoforme anormale et pathologique, la protéine prion "Scrapie" (PrP_{sc}). La PrP_{sc} est considérée aujourd'hui comme l'agent infectieux des EST. Au cours d'une infection par voie périphérique, le système immunitaire participe activement à la pathogenèse des EST en accumulant des quantités importantes de PrP_{sc} dans les compartiments lymphoïdes. Cette accumulation est en partie dépendante de l'expression de la PrP_c dont la fonction physiologique dans le système immunitaire est encore inconnue. Dans ce contexte, nous avons caractérisé à l'aide d'anticorps spécifiques les populations cellulaires spléniques exprimant la PrP_c et son homologue Doppel (Dpl). Les deux protéines ont des profils d'expression extrêmement proches.

Afin de détecter les sites de liaison ou partenaires de PrP et Dpl, nous avons produit dans un système d'expression eucaryote, les protéines PrP et Dpl recombinantes et biotinylées. Après formation d'un complexe tétramérique stable avec la streptavidine fluorescente, les tétramères de PrP et Dpl ont été utilisés comme traceurs fluorescents. Nous avons mis en évidence l'existence de nombreux sites de liaison à la surface des splénocytes notamment les lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques, et les granulocytes; en revanche, les cellules Natural Killer et les lymphocytes T en sont dépourvus. La liaison du tétramère PrP sur des lignées immortalisées de cellules B entraîne l'activation de la voie des MAP kinase et l'élévation transitoire de la concentration calcique intra-cellulaire suggérant que la liaison de la PrP à ses sites de liaison est fonctionnelle. Le rôle physiologique de ces interactions reste à être déterminé.

La période d'incubation asymptomatique des EST est caractérisée par l'accumulation de la PrP_{sc} dans les tissus lymphoïdes, en particulier dans la rate, et par la neuroinvasion, processus permettant à la PrP_{sc} d'atteindre le système nerveux central à partir du site d'entrée périphérique. De nombreuses études suggèrent la participation des cellules du système immunitaire dans le transport de la PrP_{sc} du site d'entrée jusqu'à la rate. En raison de leur mobilité et leur spécialisation dans la capture d'antigènes, les cellules dendritiques font parties des candidats possibles dans le transport de la PrP_{sc}. Grâce à un modèle de souris transgéniques permettant la déplétion transitoire des cellules dendritiques (*DTR^{+/+}*), nous avons montré que ces cellules jouent un rôle crucial dans la lymphoinvasion après infection par voie intra-péritonéale mais pas après infection par voie orale.

Les lésions histo-pathologiques observées dans le cerveau de patients atteints d'EST sont intimement liées à l'accumulation de la PrP_{sc}. La recherche de molécules capables d'inhiber l'accumulation de PrP_{sc} est donc une stratégie thérapeutique envisageable. Nous nous sommes intéressés à des molécules cycliques de faible toxicité et surtout capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Les cannabinoïdes répondent à l'ensemble de ces critères. Nous avons démontré que le cannabidiol, composé non-psychoactif de la plante *Cannabis Sativa*, inhibe efficacement l'accumulation de PrP_{sc} dans des cellules chroniquement infectées ainsi que dans le cerveau de souris infectées. De plus, le cannabidiol permet, de façon dose-dépendante, un allongement significatif du temps de survie des souris infectées. Ce composé, bien connu pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-émétique pourrait se révéler prometteur dans la thérapie des EST.