

APPROCHES DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE DES MALADIES A PRIONS

Alain Corinus

► **To cite this version:**

Alain Corinus. APPROCHES DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE DES MALADIES A PRIONS. Neurosciences. 2005. <hal-01366986>

HAL Id: hal-01366986

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01366986>

Submitted on 15 Sep 2016

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

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

**MINISTERE DE LA JEUNESSE, DE L'EDUCATION
NATIONALE ET DE LA RECHERCHE**

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

CORINUS Alain

pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**APPROCHES DIAGNOSTIQUE ET
THERAPEUTIQUE DES MALADIES
A PRIONS**

soutenu le 25 octobre 2005 devant le jury suivant :

Monsieur le professeur Thierry Dupressoir	– Président
Monsieur le professeur Jean-Michel Verdier	– Rapporteur
Monsieur le docteur Thierry Baron	– Examineur
Monsieur le docteur Armand Perret-Liaudet	– Examineur

Laboratoire EPHE « vieillissement cérébral et pathogenèse des maladies neurodégénératives » /

INSERM U 710 « mécanismes moléculaires dans les démences neurodégénératives »

Place E. Bataillon, cc 105, 34095 Montpellier cedex 05

Directeur du laboratoire, tuteur de stage EPHE : Dr J.M. VERDIER (verdier@univ-montp2.fr)

Maître de stage : Dr V. PERRIER (Veronique.Perrier@univ-montp2.fr)

MINISTERE DE LA JEUNESSE, DE L'EDUCATION NATIONALE

ET DE LA RECHERCHE

APPROCHES DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE DES MALADIES A PRIONS

CORINUS Alain

RESUME

Dans l'unité INSERM U710 intitulée "Mécanismes moléculaires impliqués dans les démences génératives", un des axes de recherche est la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la formation des prions, agents infectieux non conventionnels qui seraient composés principalement voire uniquement de la protéine du prion PrP.

Au laboratoire, nous accordons une attention particulière à l'extrémité amino-terminale de la PrP. En effet, cette extrémité porte une série de 5 octapeptides qui rend son étude structurale très complexe. Le premier objectif de mon diplôme EPHE a consisté à réaliser une caractérisation de cette extrémité N-terminale par des approches biochimiques.

De même, nous nous intéressons aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans la transconformation de la PrP^{Sc} pour mettre en place des stratégies de diagnostic et de thérapeutiques dans les maladies à prions. Pour ce faire, nous avons mis en place plusieurs types de criblages complémentaires. Tout d'abord un criblage *in silico* en utilisant des techniques de modélisation des interactions ligands-macromolécules (ou docking *in silico*) nous ont permis d'identifier une série de composés susceptibles d'interagir avec la protéine du prion. Afin de valider la pertinence biologique de ce criblage, le deuxième objectif de mon stage EPHE a consisté à procéder à un criblage cellulaire sur un modèle de cellules chroniquement infectées par les prions : les neuroblastomes murins 2L. Suite à ce criblage cellulaire, certains composés se sont révélés être des candidats potentiellement intéressants pour le diagnostic des maladies à prion. Enfin, en vue de mettre en place une stratégie de traitement des maladies à prions via des vecteurs lentiviraux, nous avons mis en place un protocole de microchirurgie stéréotaxie sur des souris C57Bl/6 infectées par la souche Me7 du prion.

clés : Prions, Diagnostic, Thérapeutiques, Mécanismes Moléculaires, Caractérisation, Neuroblastomes, Stéréotaxie.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide déoxyribonucléique

AmB	Amphotéricine B
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionate
ARN	Acide ribonucléique
BCA	Acide bincinchoninique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Albumine serum bovine
C506M3	Souche de tremblante adaptée à la souris sauvage
CD	Dichoïsme circulaire
CINES	Centre informatique national de l'enseignement supérieur
CR	Rouge Congo
Cu	Cuivre
Cys	Cystéine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
Dox	Doxycycline
DPG ₂ -Fe ³⁺	Diphosphoglycerate ferrique
DRM	Microdomaines Résistants aux Détergents
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chimioluminescence
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
EEG	Electroencéphalogramme
EPHE	Ecole pratique des hautes études
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESST	Encéphalopathie Subaiguë Spongiforme Transmissible
fMCJ	Maladie de Creutzfeldt Jakob familiale
Fmoc	Fluoreneméthoxycarbone
FTIR	Infrarouge à transformée de Fournier
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GPI	Glycosyl phosphatidylinositol
GSS	Maladie de Gerstmann-Straüssler-Scheinker
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
huGH	Human growth hormone
HuPrP	Protéine prion recombinante humaine
IC ₅₀	Concentration d'inhibition de 50 %
iMCJ	Maladie de Creutzfeldt Jakob iatrogène
IFF	Insomnie Familiale Fatale
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KDa	Kilodalton
KO	Knock-out

LCR	Liquide céphalo-rachidien
MCJ	Maladie de Creutzfeldt Jakob
ME ₇	Souche de tremblante expérimentale murine
MEM	Modified eagle's medium
MoPrP	Protéine du Prion murine
MRA	Mycoplasma removal agent
N	Normal
N2a	Neuroblastome murin
N2a58/22L	Neuroblastome murin transfecté avec le gène de la PrP et infecté avec la souche 22L du prion
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NSE	Enolase neuronale spécifique
nvMCJ	Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polychain reaction
PcTS	Phthalocyanine tetrasulfonate
Pi	Point isoélectrique
PK	Protéinase K
PM	Poids moléculaire
PMCA	Protein misfolding cycling amplification
PPII	Polyproline de type II
Prnp	Gène codant pour la protéine du prion
PrP	Protéine du Prion
PrP ^C	Forme cellulaire de la protéine du Prion
PrP ^{res}	Forme résistante de la protéine du prion
PrP ^S	Forme mutante de la protéine du Prion
PrP ^{Sc}	Forme scrapie de la protéine du Prion
PS	Pentosane polysulfate
PTP	PBS Tween
PVDF	Polyvinylidène Difluoride
RE	Réticulum endoplasmique
RML	Rocky Mountain Laboratories (souche de tremblante)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAF	Scrapie Associated Fibrils
SDS	Dodécyle Sulfate de Sodium
sMCJ	Maladie de Creutzfeldt Jakob sporadique
SNC	Système Nerveux Central
Souris PrP ^{0/0}	Souris dépourvue du gène <i>Prnp</i> murin endogène

SPR	Résonance Plasmonique de Surface
SVF	Sérum de veau fœtal
TEMED	NNN’N-tetra-methyl-éthylène-diamine
TMPP-Fe ³⁺	Tetra-methoxyphenyl porphyrine ferrique
Tween	Polyéthylène sorbitan monolaurate
vMCJ	Variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION : Les maladies à prions.....	1-2
I) Les ESST animales et humaines.....	3
A) Généralités: Identification d’un agent non conventionnel	3
B) Les ESST animales et humaines.....	4
a) Les ESST animales.....	4
b) Les ESST humaines.....	7
II) Aspects moléculaires des ESST	11
A) Prnp, gène codant pour la protéine du prion PrP.....	11
B) Structure de la PrP ^C	11
C) Rôle de la PrP ^C	13
D) Caractéristiques biochimiques et structurales de la PrP ^{Sc} ...	13

III) Diagnostics des maladies à prion.....	15
A) Diagnostic d'orientation des ESST chez l'homme.....	15
B) Diagnostic de certitude des ESST chez l'homme.....	16
C) Diagnostic des maladies à prion chez l'animal.....	16
D) Techniques existantes.....	17
IV) Thérapeutique des maladies à prions.....	18
A) Anciens composés testés <i>ex vivo</i> et / ou <i>in vivo</i>	19
a) Les polyanions sulfatés.....	19
b) Le rouge congo (RC) et ses analogues.....	21
B) Composés testés récemment comme agents anti-prion.....	21
a) Inhibiteurs développés à partir de données structurales.....	21
b) Peptides b-breaker.....	22
c) Les dérivés tricycliques.....	22
C) Les thérapies anti-prion innovantes.....	23
a) Composés tétrapyroles.....	23
b) Immunisations passives et approches vaccinales.....	24
c) Greffe de cellules et thérapie génique.....	25
BUT DU TRAVAIL.....	26
MATERIELS ET METHODES.....	28
Fiche technique N°1: Docking.....	29
Fiche technique N°2: Culture cellulaire.....	31
Fiche technique N°3: Préparation des échantillons protéiques.....	35
Fiche technique N°4: Analyse par Western Blot ou Immunotransfert.	37
Fiche technique N°5: Analyse par électrophorèse SDS-PAGE	
en tricine.....	44
Fiche technique N°6: Biocapteurs / BIACORE	46
Fiche technique N°7: Dichroïsme Circulaire.....	52

RESULTATS ET DISCUSSION.....58

Approches biophysiques: Caractérisation du N-terminal du PRION..59

I) Synthèse et purification peptidique.....60

II) Caractérisation par dichroïsme circulaire (CD).....62

A) Caractérisation en absence de cuivre.....62

B) Caractérisation en présence de cuivre.....63

III) Caractérisation par BIACORE.....65

A) Immobilisation du peptide 23-94 sur biocapteur CM5.....65

B) Caractérisation du peptide 23-94 par des anticorps spécifiques.....66

C) Etude de l'interaction peptide 23-94 sur le peptide 23-94
en absence de cuivre.....67

D) Effet du cuivre sur l'interaction peptide 23-94 / peptide 23-94.....68

Approches diagnostique et thérapeutique.....70

I-Criblage de composés.....72

I) Docking in silico.....74

II) Criblage cellulaire.....78

II-Mise en place de la microchirurgie par stéréotaxie.....84

I) L'effet dominant négatif dans la thérapeutique.....85

II) Essai de traitement tardif des maladies à prions
par une approche lentivirale «dominante négative»..86

III) Mise en place de la stéréotaxie.....88

BIBLIOGRAPHIE.....91

Introduction

Les maladies à prions 99

I) Les ESST animales et humaines

A) Généralités: Identification d'un agent non conventionnel

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives qui touchent l'homme et l'animal. Chez l'homme, ces maladies ont une incidence dans la population extrêmement faible, de l'ordre de 1/1 000 000. Elles présentent des caractéristiques cliniques variées et complexes rendant le diagnostic délicat. Les premiers symptômes des ESST humaines sont d'ordre neurologique (perte de concentration et de mémoire), parfois psychologique (apathie, dépression, perte d'intérêt) rapidement suivis de troubles de la motricité (ataxie, perte d'équilibre). La maladie évolue rapidement vers une démence et la mort. Les lésions anatomopathologiques sont exclusivement confinées au niveau cérébral et se caractérisent par une vacuolisation intra-neuronale, une neurodégénérescence, une activation microgliale et une prolifération astrocytaire. Des microfibrilles amyloïdes s'accumulent dans le système nerveux central (SNC). Le composant principal des agrégats est la PrP^{Sc} nommée ainsi pour PrP "*scrapie*" (en référence à la tremblante du mouton). Le terme "prion" a été formulé par Stanley Prusiner en 1982 pour "proteinaceous infectious particle", par analogie avec "virion". En effet, Prusiner formule la théorie de la protéine seule. Pour lui, l'agent infectieux à l'origine des maladies à prions est exclusivement de nature protéique. D'autres hypothèses ont gravité autour de la nature de l'agent infectieux comme l'hypothèse de l'holoprion (Weissmann 1991), du virus filamentaire (Merz et coll. 1981) et du rétrovirus (Murdoch et coll. 1990) mais elles sont aujourd'hui abandonnées, principalement par manque de données expérimentales.

Jamais détectée chez les individus sains, la PrP^{Sc} est la signature incontournable des ESST.

Aujourd'hui encore, plus de 20 ans après sa découverte, la détection de la PrP^{Sc} demeure la base des tests biochimiques permettant le diagnostic d'une ESST humaine ou animale. Cet agent causal des ESST a été baptisé ATNC pour Agent Transmissible Non Conventionnel en raison de sa nature, sa spécificité et ses caractéristiques très particulières en comparaison avec les agents pathogènes classiques. Tout d'abord, la période d'incubation cliniquement silencieuse est exceptionnellement longue. Elle peut atteindre 35 ans chez l'homme. De plus, sa résistance aux procédés habituels de décontamination ou de stérilisation est hors norme. Les ATNC résistent par exemple aux protocoles de stérilisation et d'inactivation par autoclavage habituellement utilisés (121°C pendant 20 minutes, Dickinson et Taylor 1978). Le procédé d'autoclavage en chaleur humide, permettant leur inactivation, est de 134°C pendant 18 minutes sous 3 bars de pression. D'autres procédés tels que la décontamination à la soude 1N pendant une heure ou à l'eau de javel 2% pendant une heure ont trouvé leur efficacité et sont recommandés par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Parmi les méthodes moins drastiques, l'équipe de J-P Deslys (CEA-Fontenay-aux roses) s'est intéressée à une technique utilisée contre la maladie du charbon (anthrax). Il s'agit de la vaporisation de peroxyde d'hydrogène. Cette méthode un peu moins efficace que les méthodes de référence précédemment citées, présente l'intérêt de ne pas endommager les instruments médicaux délicats. Elle est utilisée pour décontaminer les laboratoires L3 alors que la formolisation n'est pas efficace. Si elle est précédée d'un traitement par un détergent alcalin ou par un nettoyant enzymatique, elle devient extrêmement performante. Car en effet, l'agent infectieux persisterait même après un cycle d'autoclavage à 600°C en chaleur sèche (Brown et coll. 2000). Cette étonnante résistance à la désinfection pose un véritable problème de santé publique.

B) Les ESST animales et humaines

a) Les ESST animales

La tremblante du mouton et de la chèvre ou "scrapie" est connue depuis plus de deux siècles. Son caractère infectieux a été démontré dès la fin des années 1930 par Cuillé et Chelle (1936). Bien que chez les animaux il n'y ait pas de cas génétique connu d'ESST, des variations alléliques sont présentes dans le gène codant pour la PrP (le gène *Prnp*). Certains résidus de la séquence protéique de la PrP influencent positivement ou négativement la susceptibilité à l'infection naturelle. Chez le mouton, il existe trois polymorphismes sur le gène *Prnp* donnant naissance à la substitution d'acides aminés en position 136, 154 et 171 (A136V, R154H, Q171R). Plusieurs études ont montré qu'en Grande-Bretagne, la très grande majorité (85%) des moutons atteints de scrapie naturelle étaient de race Suffolk. Pour cette race, le phénotype V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ / V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ et notamment l'homozygotie Q/Q sur le codon 171 de la PrP sont des facteurs de la susceptibilité à la scrapie. A l'inverse, le phénotype A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁ / A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁ et notamment l'homozygotie R/R sur le codon 171 de la PrP semblent être des facteurs de résistance naturelle à la scrapie (Laplanche et coll. 1999). Cependant, cette résistance n'est pas totale. En effet, dans une récente étude, Buschmann et coll. ont mis en évidence des cas atypiques de tremblante ovine. Par le biais de quatre tests de dépistage rapide, cette équipe a démontré que ces formes atypiques n'étaient pas liées à une forme particulière de génotype de la

protéine du prion et pouvaient atteindre les ovins de phénotype ARR (Bruschmann et coll. 2003).

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la "vache folle" a été décrite en Grande-Bretagne en 1986. Dès 1987, des études épidémiologiques concluent que l'apparition de la maladie est vraisemblablement due à l'incorporation dans l'alimentation des ruminants, de farines d'origine animale (essentiellement ovine et bovine) dont les procédés de fabrication ont été modifiés. Il s'agirait notamment d'une diminution de la température et du temps d'autoclavage de ces farines qui a eu pour effet de n'inactiver que partiellement l'agent infectieux. Aujourd'hui encore, l'origine exacte de l'ESB est incertaine. Les farines auraient pu être contaminées par la carcasse d'un mouton atteint de la tremblante ou par celle d'une vache atteinte d'ESB et non identifiée. L'ESB est aussi à l'origine du nouveau variant de la MCJ (vMCJ ou nvMCJ) chez l'homme, apparu également en Grande-Bretagne en 1996. En effet, le nvMCJ a été identifié après la constatation de 10 cas atypiques de MCJ chez des sujets de moins de 40 ans, dont neuf étaient âgés de moins de 30 ans (Will 1996). Hormis leur jeune âge, tous ces malades se caractérisaient par une clinique particulière à début psychiatrique, une durée d'évolution de la maladie anormalement longue (14 mois en moyenne, contre 6 semaines à 6 mois dans les formes habituelles de la maladie de Creutzfeldt-Jakob) et une neuropathologie pathognomonique. Will note, en particulier, la présence de plaques amyloïdes entourées de vacuoles (plaques florides) dont la distribution dans le système nerveux central était étonnamment conservée d'un patient à l'autre ; un fort immunomarquage de la PrP a été identifié dans les zones lésées, et la présence de PrP^{Sc} retrouvée en Western Blot (Zeidler et coll. 1997). Cette forme de MCJ a rapidement été suspectée d'être la conséquence de l'infection de l'homme par l'agent de l'ESB, compte tenu du fait qu'aucune autre hypothèse étiologique ne pouvait être raisonnablement retenue. A noter que les plaques florides n'ont jamais été identifiées dans d'autres ESST humaines, ni même dans d'autres maladies neurodégénératives n'appartenant pas au groupe des maladies à prions. Les études menées depuis la description du nvMCJ ont permis de conforter l'hypothèse d'une transmission à l'homme de l'agent bovin. Quatre séries de résultats sont à prendre en considération :

- l'infection expérimentale de macaques par l'agent de l'ESB conduit à l'apparition d'une maladie mortelle au bout de 36 mois en moyenne, soit plus rapidement que les souches de tremblante inoculées à ce jour. La neuropathologie des animaux malades se caractérise par la présence des mêmes plaques florides typiques du nvMCJ (Lasmézas et coll. 1996) : il existe donc une similitude neuropathologique des conséquences de l'infection du primate par l'agent bovin et de l'infection par l'agent du nvMCJ.

- l'équipe de J. Collinge (1996) a montré que les MCJ pouvaient être différenciées par le profil électrophorétique et le ratio des glycoformes de la PrP^{Sc} (Collinge et coll. 1996). Le nouveau variant se caractérise par une prédominance de la PrP biglycosylée. Ce profil caractéristique du nvMCJ est retrouvé chez les animaux infectés expérimentalement par l'agent de l'ESB, et particulièrement chez le primate.

- les méthodes de typage des propriétés biologiques des souches de prions (Bruce 1997) appliquées au nvMCJ, à des formes sporadiques de la MCJ et à l'ESB ont montré que les propriétés biologiques de l'agent à l'origine du nouveau variant étaient très distinctes de celles des agents retrouvés dans les autres formes de MCJ, mais quasi superposables à celles de l'agent bovin (Bruce 1997).

- des souris transgéniques portant le gène de la PrP bovine ont été construites. Ces souris hautement sensibles à l'infection par l'agent bovin (l'introduction du gène de la PrP bovine facilite le franchissement de la barrière inter-espèces) sont aussi extrêmement sensibles à l'agent du nvMCJ, alors qu'elles sont quasi insensibles à l'infection par les agents à l'origine des formes classiques de MCJ (Scott et coll. 1997).

De nombreuses autres espèces, principalement élevées en captivité (primates, félins, ongulés et chats domestiques) ont également développé la maladie par ingestion de viandes et d'abats bovins contaminés.

La maladie du dépérissement chronique des cervidés et l'encéphalopathie du vison sont deux autres exemples d'ESST qui touchent respectivement les cerfs, les élans et les visons d'élevage aux Etats-Unis et au Canada. Leur étiologie et leur mécanisme de transmission naturelle demeurent inconnus. En moins de dix ans, la maladie du dépérissement chronique s'est propagée dans douze états américains et touche maintenant les cervidés sauvages. Cheptels ovin, bovin et cervidés d'élevage partageant les mêmes pâturages, les autorités sanitaires craignent une possible transmission inter-espèces de la maladie. Potentiellement, la maladie du dépérissement chronique pose un problème de santé publique équivalant à celui engendré par la crise de la "vache folle" en Grande-Bretagne dans les années 1990 (<http://biology.usgs.gov/cro/Fact%20Sheets/cwdfinal.pdf>).

-

-

Les encéphalopathies expérimentales obtenues par inoculations de broyats de cerveaux infectés de différentes espèces (homme, mouton, chèvre, vache) à des animaux de laboratoire (souris, hamsters, primates non-humains) a rendu possible l'étude physiopathologique de la transmission des ESST. Au cours de ces expériences, l'établissement de modèles de scrapie chez le lapin et le poulet a été tenté mais s'est toujours révélé infructueux. Le modèle expérimental d'ESST le plus utilisé à ce jour pour les expériences de validation, est la scrapie (tremblante du mouton) adaptée chez le rongeur, en particulier la souche 263 K adaptée chez le hamster, en raison de sa standardisation et de sa reproductibilité en termes de période d'incubation chez les animaux infectés ; celle-ci est également plus courte que chez la souris (70 jours versus 360) (Kimberlin et Walker 1977).

b) Les ESST humaines

Les ESST humaines sont classées en trois groupes : familiales, iatrogènes (ou infectieuses) et sporadiques.

Quelle que soit leur origine ou leur étiologie, les ESST humaines sont toutes transmissibles à des primates par ingestion ou inoculation de broyats de tissus cérébraux. Lors de la première description de **la maladie de Creutzfeldt-Jakob** (MCJ) en 1920, du **syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker** (GSS) en 1936, et du **Kuru** en 1957, le caractère transmissible de ces pathologies n'avait pas été suspecté (Richardson et Masters 1995). William Hadlow releva les similitudes histo-pathologiques existantes entre la scrapie du mouton qu'il étudiait au Rocky Mountain Laboratory et le Kuru. Il proposa d'étudier plus particulièrement la possible transmission de Kuru à des primates (Hadlow 1959). Sept années plus tard, Carleton Gajdusek et ses collaborateurs ont réussi à

transmettre le Kuru puis la MCJ à des chimpanzés (Gajdusek et coll 1966 ; Gajdusek et coll. 1967 ; Gibbs et coll. 1968). A partir de ce moment, les ESST humaines et animales ont été regroupées au sein d'un seul et même groupe de pathologies.

En matière de diagnostic, il est aujourd'hui impossible de poser le diagnostic définitif d'une ESST pendant la phase asymptomatique. Le diagnostic est essentiellement fondé sur les signes cliniques présentés par le patient. Il est renforcé par des analyses biochimiques et électrophysiologiques (dosage de la protéine 14-3-3 dans le liquide céphalo-rachidien, électro-encéphalogramme et électro-rétinogramme). Cependant, dans le cas du nvMCJ la détection de la PrP^{Sc} dans des biopsies d'appendice et d'amygdale est un test fiable (Schreuder et coll. 1996 ; Hilton et coll. 1998).

Les formes familiales de la MCJ (fMCJ), le syndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie familiale fatale (IFF) sont des ESST associées à des mutations dans le gène *Prnp* codant pour la protéine prion. Le mode de transmission a lieu sur un mode autosomique dominant. La quasi-totalité des patients est hétérozygote pour leur mutation. Ces personnes expriment donc conjointement la PrP sauvage (wt) et la PrP mutée. Dans les cerveaux de patients décédés de fMCJ (mutation E200K), la PrP^{Sc} mutée est à la fois insoluble et résistante à la digestion par la protéinase K (PK). En revanche, la PrP^{Sc} sauvage est insoluble mais sensible à la protéolyse (Gabizon et coll. 1996). Le fait de savoir si, *in vivo*, les agrégats de la PrP^{Sc} sont mixtes (PrP wt/ PrP mutée) ou non, n'a pu être déterminé. Il existe une grande variabilité clinique pour ces affections familiales d'une pathologie à l'autre mais également entre deux membres d'une même famille, porteurs de la même mutation. Ces observations suggèrent l'existence de mutations sur d'autres gènes que *Prnp* ou facteurs non génétiques influençant ces maladies (Chapman et coll. 1993). Certains auteurs ont calculé que la pénétration de la maladie de fMCJ (E200K) est de 100% (Chapman et coll. 1994). En d'autres termes, si leur durée de vie est suffisante, tous les individus porteurs de la mutation E200K sur le gène *Prnp* développent la maladie. Compte tenu de la complexité de ce type d'analyses statistiques, ces résultats ont été contestés (Goldfarb et coll. 1991). Si la pénétrance n'est pas complète alors d'autres facteurs génétiques, viraux ou environnementaux sont requis pour que la maladie se manifeste. L'enjeu est crucial pour la validité de l'hypothèse de "la protéine seule".

Les formes iatrogènes ou infectieuses. Elle comprennent le Kuru, dont le cannibalisme tribal a favorisé la propagation en Nouvelle-Guinée au cours des années 1950 à 1970 et les formes iatrogènes de la MCJ (iMCJ) dont la cause principale est l'utilisation d'implants (dure-mère, cornée) ou de produits d'origine humaine (hormone de croissance) provenant de donneurs atteints de MCJ et non suspectés.

Le nvMCJ est vraisemblablement dû à la contamination par consommation de viande bovine infectée par l'agent de l'ESB. Bien que le caractère infectieux de ces affections ne fasse aucun doute, il est intéressant de noter qu'il existe une composante génétique non négligeable. Tous les patients atteints du nvMCJ (150 cas à ce jour) sont homozygotes sur le codon 129 de la PrP (M/M), alors que ce polymorphisme n'est représenté qu'à 37% dans la population caucasienne. La prédiction du nombre total de cas de nvMCJ est complexe en raison du fait que ni la période d'incubation, ni les doses reçues, ni la fréquence des doses ne sont connues. Néanmoins, il semble que le pic d'incidence de la

maladie ait été atteint en 2000-2001. Le nombre de personnes ayant été exposées à l'agent de l'ESB est sans doute considérablement plus important que celui des personnes décédées ou actuellement atteintes. Ceci suggère que l'homme pourrait être résistant à l'agent de l'ESB. Mais il est également possible que des personnes développent des formes asymptomatiques de l'infection. Ces personnes posent un véritable problème de santé publique pour de futures transmissions sanguines, dons d'organes ou examens exploratoires non invasifs (coloscopie, endoscopie, etc). L'existence d'un état silencieux de l'agent infectieux dans certains organismes a été apportée au cours d'expériences de transmission inter-espèces souris/hamster (Race et Chesebro 1998 ; Hill et coll. 2000). L'agent de la "scrapie" murine inoculé à des hamsters n'induit ni le développement de la maladie ni l'apparition de signes neuropathologiques. En revanche, des broyats de cerveaux de ces hamsters demeurent potentiellement infectieux pour l'espèce d'origine, c'est-à-dire la souris, en second passage.

La forme sporadique de la maladie de Creutzfeld-Jakob (sMCJ), qui représente 85 à 90 % des cas de MCJ, a une incidence de 1 à 2 individus/millions et par an. A ce jour, aucune mutation génique ne lui est associée. Cependant, l'hétérozygotie de codon 129 de la PrP (M/V) semble être un facteur de faible risque de développement de la maladie dans les populations caucasiennes. Dans ces population, le polymorphisme sur le codon 129 s'établit comme suit : 51% M/V, 37% M/M et 12% V/V. La quasi-totalité des patients caucasiens atteints de sMCJ est homozygote (V/V ou M/M) sur le codon 129 de la PrP. En revanche, l'hétérozygotie (M/V) sur le codon est plus fréquente chez les patients sMCJ japonais (18%) que dans la population générale où la fréquence des polymorphismes est 0% V/V, 92% M/M et 8% M/V. L'origine des cas sporadiques de MCJ est sujette à spéculation. Les hypothèses invoquées ont été des mutations somatiques dans la phase ouverte de lecture du gène *Prnp* ; l'exposition à un virus non encore identifié ; ou encore la conversion spontanée de la PrP^C en son isoforme PrP^{Sc} en l'absence de toute mutation. A ce jour, il n'existe aucun modèle animal de formation spontanée de PrP^{Sc} à partir de PrP "standard". De plus, le pic d'incidence de sMCJ suit une équation de type gaussien avec une moyenne d'âge de 55-65 ans. Or, si l'événement déclencheur de la pathologie était un repliement aberrant de la PrP en isoforme PrP^{Sc}, l'incidence de la maladie devrait augmenter de façon exponentielle avec l'âge.

II) Aspects moléculaires des ESST

A) *Prnp*, gène codant pour la protéine du prion PrP

La séquence du gène de la PrP (*Prnp*), localisé sur le chromosome 20 chez l'homme, 2 chez la souris, et 13 chez la vache, est très conservée parmi les mammifères (80 % et 90 % d'identité). Chez le hamster et chez l'homme, ce gène est constitué de 2 exons, le premier (56 à 82 pb) non codant est séparé du 2ème exon (2 kb) qui contient la phase ouverte de lecture (Basler et coll. 1986) par un intron de 10 kb. Les gènes de la PrP murine, ovine ou bovine sont constitués de trois exons. Pour ces animaux, c'est l'exon 3 qui contient la phase ouverte de lecture (Goldmann et coll. 1990 ; Westaway et coll. 1994). L'organisation génomique présente peu de différences entre les espèces et l'identité de séquences nucléotidiques est très élevée entre les différents mammifères (de 80 à 90 %). Le promoteur du gène *Prnp* a été identifié chez la souris (Baybutt et coll. 1997), le hamster, le rat (Saeki et coll.

1996), les bovins (Inoue et coll. 1997) et chez l'homme (Inoue et coll. 1997 ; Mahal et coll. 2001). Dans le promoteur de la PrP, il n'y a pas de TATA box, mais on peut trouver une région riche en CG (Basler et coll. 1986). Cette région riche en CG permet la fixation potentielle de facteurs de transcription comme Sp-1, AP-1 et AP-2 (Mahal et coll. 2001).

B) Structure de la PrP^C

La protéine PrP^C est une sialoglycoprotéine de 33-35 kDa relativement bien conservée entre les espèces. Elle compte 253 acides aminés (aa) chez l'homme, 254 chez la souris et le hamster, 256 chez le mouton et 264 chez le bovin. La séquence primaire de la protéine peut être décomposée en 5 régions distinctes :

-La région 1-22 correspond au peptide signal qui est clivé au moment de la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique (ou RE).

-La région 23-91 contient une répétition d'octapeptides hautement conservés chez les mammifères, riche en proline et glycine. Il a été démontré que cette région lie le cuivre et le zinc. Chez l'homme, cette région est le siège de délétions ou d'insertions en nombre variable du motif d'octapeptides que l'on retrouve dans les ESST familiales. Cette région est clivée lors de la digestion à la protéinase K.

-La région 91-135 est une région hydrophobe largement conservée entre les différentes espèces. Cette région semble jouer un rôle important dans la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} (Wegner et coll. 2002). Une simple mutation au niveau de cette séquence (A117V) peut entraîner la maladie chez l'homme (Mallucci et coll. 1999). De plus, les fragments peptidiques qui correspondent à la séquence 106-126 sont neurotoxiques pour les cultures cellulaires primitives de neurones (Forloni et coll. 1993).

- La région 136-231 contient 2 sites de N-glycosylation (Asn 183 et Asn 199) (Endo et coll. 1989) permettant l'accrochage de sucres responsables des 3 états glycosylés, bi (70 %), mono (25%) ou non glycosylée (5%) (33 à 26 KDa). Cette glycosylation peut varier en fonction des espèces et peut agir sur la barrière inter-espèce conduisant à la contamination entre animaux d'espèces différentes (collinge et coll. 1996 ; Priola et coll. 2001). La séquence présente 136-231 porte aussi deux cystéines en position 179 et 214 permettant la formation d'un pont disulfure intracaténaire (Turk et coll. 1988). La sérine en position 231 permet la liaison d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) responsable de l'ancrage de la PrP à la surface extracellulaire de la membrane plasmique cellulaire (Stahl et coll. 1987).

- La région 232-253 : c'est la séquence C-terminale hydrophobe clivée dans la protéine mature qui sert de signal à l'addition d'une ancre GPI à la sérine 231 (Stahl et coll. 1990).

C) Rôle de la PrP^C

La fonction de la PrP^C reste incertaine. Un des moyens d'appréhender l'étude du rôle d'une protéine *in vivo* est de priver l'organisme de son expression en réalisant le knock-out (KO) du gène correspondant. C'est ce qu'ont réalisé Bueler et Manson en construisant des souris KO pour le gène de la PrP (Bueler et coll. 1992 ; Manson et coll. 1994) par recombinaison homologue de type

insertion-délétion dans l'exon 3 de la PrP murine. Ces souris se développent normalement et présentent un comportement normal sans aucune déficience immunitaire, ni anomalie neurologique. Toutefois, elles présentent une fragmentation du sommeil ainsi qu'une altération du rythme circadien (Tobler et coll. 1996). Dans les neurones, la PrP^C semble favoriser la transmission synaptique. En effet, des tranches d'hippocampe de souris KO montrent une diminution de l'activité GABAergique et une altération du potentiel à long terme (Colling et coll. 1994). La PrP^C pourrait ainsi modifier la fluidité membranaire des neurones en modifiant les propriétés des membranes synaptiques. D'autres études sur ces souris KO ont montré que la PrP^C est impliquée dans l'activation de la microglie (Brown et coll. 1998) et des lymphocytes (Mabbott et coll. 1997). La localisation de la protéine à la surface cellulaire des neurones évoque un rôle possible dans l'adhésion cellulaire, la liaison avec un ligand extracellulaire ou la signalisation. Il a été montré que la PrP^C se lie à la partie C-terminale de la chaîne g de la laminine (Graner et coll. 2000). L'interaction PrP^C-laminine semble jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire, la croissance et le maintien des « neurites » (Graner et coll. 2000 ; Chen et coll. 2003). La PrP^C interagirait également avec le précurseur du récepteur aux laminines de 37-Kda (Rieger et coll. 1997) et le récepteur à la laminine (Gauczynski et coll. 2001 ; Hundt et coll. 2001). Cette interaction entre la PrP et le récepteur de la laminine peut induire un signal nécessaire pour la survie cellulaire. De nombreuses études ont montré par ailleurs que la partie N-terminale de la PrP^C contenait une série d'octapeptides riches en glycine et proline capables de lier le cuivre et le zinc (Brown et coll. 1997). Cette propriété de la PrP^C a été complétée par une étude récente attribuant une action antioxydante *via* une fixation au cuivre (Rachidi et coll. 2003). Ces résultats permettent de considérer que les ions métalliques jouent un rôle clef *via* le stress oxydant dans les maladies à prion (Milhavet et coll. 2002). Des lignées cellulaires neuronales, dérivées des souris KO montrent une réduction importante du taux de cuivre présent au niveau des membranes des cellules, une réduction de l'activité cuivre-zinc superoxyde dismutase, ainsi qu'une résistance au stress oxydatif (Brown et coll. 1997).

D) Caractéristiques biochimiques et structurales de la PrP^{Sc}

La séquence primaire de la PrP^{Sc} est identique à celle de la PrP^C de l'hôte. Au niveau structural, le premier modèle proposé de la structure de la PrP^{Sc} a été obtenu par déduction de données issues de l'infrarouge à transformée de Fournier (FTIR). Ainsi la PrP^{Sc} serait constituée de 2 hélices a et de 4 feuillets b (Riek et coll. 1996). Le dernier modèle structural de la PrP^{Sc} a récemment été proposé par Wille en 2002 (Wille et coll. 2002). Il a été établi à partir de cristaux bidimensionnels de PrP^{Sc} purifiées à partir de cerveaux de souris infectées par des prions et analysés par microscopie électronique. Dans ce modèle, les hélices alpha B et C sont conservées tandis que les brins b et l'hélice A sont modifiés en une b hélice. Les différences entre la PrP^C et la PrP^{Sc} se situent au niveau des structures secondaires, tertiaires et quaternaires. De plus, la PrP^{Sc} se distingue de la PrP^C par de nombreuses propriétés physico-chimiques. Parmi ces propriétés, les plus significatives de la PrP pathologique sont sa résistance partielle à la digestion par les protéases et sa faible solubilité dans les

détergents comparées à la PrP^C.

Ces propriétés seraient dues à la présence de domaines hydrophobes au sein de la PrP^{Sc} (Prusiner et coll. 1981). Cette résistance est dite partielle aux protéases car elle dépend de la concentration en enzyme, de la température et du temps de digestion. En pratique, pour détecter la présence de PrP^{Sc} dans des échantillons, on utilise une concentration en protéinase K permettant une dégradation totale de la PrP^C. La résistance à la digestion par la protéinase K varie en fonction de l'espèce hôte et/ou de la souche considérée. Bien que la PrP^{Sc} soit traditionnellement associée à l'infectiosité (Bolton et coll. 1982), certains échantillons infectieux peuvent être dépourvus de PrP^{Sc} détectable par les méthodes classiquement utilisées (Lasmezas et coll. 1997). De même, dans le système nerveux central, la PrP^{Sc} ne s'accumule pas systématiquement dans les aires cérébrales les plus riches en PrP^C. Ceci suggère un possible transport axonal de la PrP^{Sc}. Dans certaines voies, l'infectivité migre le long des axones selon un profil compatible avec le transport rétrograde (Fraser et Dickinson 1985).

III) Diagnostics des maladies à prion

A) Diagnostic d'orientation des ESST chez l'homme

Le diagnostic biologique ante-mortem actuel des ESST met en jeu des marqueurs d'orientation peu précoces et d'une spécificité souvent réduite. Sauf en de rares cas (mutations familiales et biopsies cérébrales), on ne dispose pas de diagnostic de certitude des ESST du vivant du patient. En effet, les techniques actuelles de mise en évidence de la PrP^{Sc} ne permettent de la détecter que dans les tissus à haute infectiosité (cerveau et tissus lymphoïdes). Les examens biologiques classiques (sang, urines) ne montrent pas d'anomalie caractéristique dans les ESST. Dans le LCR, la protéinorachie est normale à modérément augmentée, mais reste inférieure à 1 g/l et la glycorachie est normale.

Différents marqueurs biologiques ont été proposés dans le cadre du diagnostic de la MCJ (Beaudry et coll. 1999). Pour la plupart d'entre eux, leur détection dans des liquides biologiques, notamment le LCR, semble être la conséquence de lésions histologiques retrouvées dans la MCJ : marqueurs de lyse neuronale et/ou de la prolifération astrocytaire. La protéine 14-3-3, l'énolase neuronale spécifique (NSE), la protéine S-100 (Otto et coll. 1998), la protéine tau (Otto et coll. 1997) font partie des marqueurs dont l'intérêt diagnostique a été évalué. Ils sont encore l'objet d'études cliniques, mais les résultats obtenus jusqu'à présent semblent montrer qu'ils n'ont que peu d'intérêt en raison principalement d'une spécificité insuffisante. Seule la protéine 14-3-3 qui est également un marqueur de lyse neuronale possède à ce jour une utilité diagnostique (Muller et coll. 2000). Ce critère prend place dans la version réactualisée des critères diagnostiques de la MCJ.

En présence de signes cliniques évocateurs de MCJ, deux examens paracliniques sont utiles au diagnostic. L'électroencéphalogramme (EEG) présente un tracé caractéristique mais non spécifique avec présence d'ondes pseudopériodiques, biphasiques ou triphasiques. Chez les malades atteints du vMCJ, l'EEG est en général non contributif, tout comme dans les formes iatrogènes liées à l'hormone

de croissance. Le deuxième examen est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Il peut montrer des hypersignaux T2 de différentes structures, notamment au niveau des noyaux gris centraux dans les formes sporadiques. Cette technique d'exploration est plus intéressante en cas de suspicion de vMCJ car des hypersignaux T2 sont retrouvés au niveau du thalamus postérieur (noyau pulvinar) avec une sensibilité de 75 % et une assez bonne spécificité (Will et coll. 2000).

B) Diagnostic de certitude des ESST chez l'homme

Une preuve incontestable de la présence d'une ESST est la transmission de la maladie par inoculation à l'animal à partir d'extraits cérébraux. Cette approche garantit une spécificité de 100 % mais est longue et lourde à mettre en place et nécessite des modèles expérimentaux adaptés (souris transgéniques) afin d'avoir une sensibilité satisfaisante. Elle est toutefois rarement pratiquée en clinique. C'est pourquoi le diagnostic de certitude repose principalement sur l'analyse histologique et immunologique de tissus cérébraux provenant de biopsie ou de nécropsie. Nous parlerons principalement ici de la mise en évidence de la PrP^{Sc} par les techniques de Western Blot, une technique sensible et pathognomonique des encéphalopathies spongiformes. Plusieurs équipes ont proposé un typage des ESST sur les critères de profil de glycosylation et ont défini un profil caractéristique retrouvé uniquement dans le vMCJ (Parchi et coll. 1997 ; Parchi et coll. 1999). Il est cependant important de noter que ces comparaisons sont délicates à réaliser pour des raisons de reproductibilité et compte tenu des variations de profil constatées entre différentes régions cérébrales (Tatzelt et coll. 1999). Une aide diagnostique très importante pour le vMCJ est en revanche représentée par la détection de la PrP^{Sc} dans les amygdales. Cette dernière est en effet positive dans tous les cas de vMCJ testés, contrairement aux autres formes humaines de la maladie (Will et coll. 2000) et présente l'avantage de pouvoir être réalisée du vivant du patient.

Disons également quelques mots de l'intérêt diagnostique qu'apporte l'étude de la séquence codante de la PrP. Toutes les formes génétiques des ESST identifiées à ce jour sont liées à des mutations du gène codant la PrP (Peoc'h et coll. 2000). Il est donc essentiel de rechercher ces mutations surtout si une histoire familiale permet d'évoquer une forme génétique.

C) Diagnostic des maladies à prion chez l'animal

A l'heure actuelle, il n'existe pas de diagnostic de certitude sur des animaux vivants en incubation. Les diagnostics permettant d'établir avec certitude la présence du prion pathogène responsable de l'ESB sont pratiqués après la mort ou l'euthanasie de l'animal et reposent :

- soit sur un examen histopathologique permettant de mettre en évidence des lésions spongiformes caractéristiques au niveau de l'encéphale ;
- soit sur un test de Western Blot réalisé sur un fragment du tronc cérébral et présentant un résultat positif.

D) Techniques existantes

Le diagnostic des maladies à prions est complexe et varié. Il repose essentiellement sur la détection de la PrP^{Sc}. À l'heure actuelle, plusieurs techniques permettent de mettre en évidence la

PrP^{Sc}. La technique la plus utilisée est le Western Blot, établi à partir d'homogénats de cerveaux humains ou animaux, traités à la protéinase K. D'autres techniques plus ou moins sensibles ont été mises au point comme la technique ELISA, la technique de Slot Blot qui utilise les deux propriétés biochimiques de la PrP^{Sc} que sont la résistance à la digestion par la protéinase K et l'insolubilité dans les détergents (Winklhofer et coll. 2001). Certains chercheurs ont déjà réussi à détecter la protéine PrP anormale dans le sang de moutons exposés à la tremblante (Schmerr et coll. 1999) grâce au test d'électrophorèse capillaire. Il mesure la capacité de la PrP^{Sc}, éventuellement présente dans le sang, à dissocier un complexe moléculaire formé par un peptide fluorescent (dédit de la séquence PrP) et son anticorps. Pour cela, un extrait de leucocytes sanguins, traité au préalable avec la protéinase K, est incubé avec un complexe anticorps-peptides PrP couplé à une molécule de fluorescéine. La PrP^C va se fixer sur le complexe anticorps-peptides PrP. Par électrophorèse capillaire, les deux types de molécules fluorescentes (peptide couplé et peptide libre) vont être séparées en fonction de leur rapport charge/masse. Or seule la PrP^{Sc} peut dissocier par compétition le complexe anticorps-peptide. Ainsi, en présence de PrP^{Sc}, on constatera une diminution du rapport de l'intensité de fluorescence du peptide couplé sur l'intensité de fluorescence du peptide libre (Schmerr et coll. 1999). Un autre test consiste en l'utilisation de la "protein misfolding cycling amplification" (PMCA) (Saborio et coll. 2001, Soto et coll. 2005). Cette technique novatrice permet de détecter des concentrations extrêmement faibles de prion anormal en augmentant le nombre initial de PrP^{Sc} dans l'échantillon. En effet, dans leur publication, Saborio et coll. décrivent comment ils amplifient *in vitro* la protéine prion anormale PrP^{Sc}. Leur technique s'apparente au principe de la PCR, avec une succession de phases d'amplification entre-coupées de phases de sonication. Ces amplifications ont pour résultat de convertir la PrP^C en protéines prions anormales PrP^{Sc}. D'après leurs résultats, 97 % des PrP^{Sc} retrouvées après cette amplification seraient le résultat de protéines nouvellement converties. Cette technique permet donc d'augmenter la quantité de PrP^{Sc} dans un prélèvement et ainsi diminuer indirectement le seuil de détection des tests actuels. Couplée aux méthodes d'immunodétection actuelle, la PMCA pourrait être utilisée pour la détection des protéines prions anormales dans les tissus ou liquides biologiques.

IV) Thérapeutique des maladies à prions

A l'heure actuelle, il n'existe aucune approche thérapeutique efficace permettant de soigner les malades atteints d'une maladie à prions et présentant des signes cliniques. En outre, les origines différentes et les formes cliniques variées des ESST rend très complexe l'approche thérapeutique de ces maladies. Par exemple, il est probable que la sMCJ qui est diagnostiquée tardivement au cours de son développement, demande une approche thérapeutique différente de la fMCJ qui elle est due à une mutation du gène *Prnp*. Afin de développer des thérapeutiques adaptées, plus de 60 composés chimiques différents ont été identifiés *ex vivo* et *in vivo* dans des modèles de cultures cellulaires ou d'animaux atteints d'ESST.

A) Anciens composés testés *ex vivo* et/ou *in vivo*

Les premiers composés potentiellement thérapeutiques ont été testés chez l'animal de laboratoire notamment le hamster et la souris préalablement inoculé par des prions par voie cérébrale ou intrapéritonéale. L'effet de drogues antivirales, des hormones, des antibiotiques, des polyanions sulfatés, des agents antifongiques et des anticancéreux, sur la réplication du prion a été évalué. Par ailleurs, certains de ces composés ont été également testés *ex vivo* sur des modèles de cultures de cellules chroniquement infectées par le prion. Chez l'animal, les critères d'efficacité thérapeutique sont attestés par la quantification de la PrP^{Sc} accumulée dans les organes cibles tels que le cerveau et la rate ainsi que par une augmentation des durées d'incubation de la maladie. De la même façon, en culture cellulaire, la diminution des taux de PrP^{Sc} suggère que le produit utilisé a des propriétés inhibitrices sur la formation des isoformes de PrP^{Sc}.

a) Les polyanions sulfatés

L'Amphotéricine B (AmB) et son dérivé le MS-8209 (Adjou et coll. 2000 ; Demaimay et coll. 1997), le pentosane polysulfate (PS) (Ladogana et coll. 1992) ont montré une relative efficacité *in vivo*. Une plus grande efficacité d'action a été observée lorsque ces agents étaient administrés au moment ou à proximité de l'inoculation par les prions (Aguzzi et coll. 2001). De même, une étude comparative du traitement d'une série de hamster par AmB, MS-8209 ou le rouge congo (RC) révèle que le MS-8209 permet d'augmenter de façon bien plus importante les temps d'incubation de la maladie aux doses administrées (Perrier et coll. 2003). De plus, les auteurs montrent que l'AmB et le MS-8209 prolongent les temps de vie des souris infectées même lorsque ces drogues sont administrées à un stade avancé de la maladie. En effet, le traitement des souris C57Bl/6 avec 25 mg/kg de MS-8209, 80 jours après l'inoculation de prions (c'est-à-dire lorsque l'agent prion a pénétré dans le SNC), augmentent le temps de survie des souris de plus de 40 %.

Le mécanisme d'action de l'AmB, du MS-8209 et du RC a été étudié à plusieurs reprises, à la fois pour déterminer leur action dans le cycle de réplication du prion mais aussi dans le but d'étudier les processus de neuroinvasion. Au niveau moléculaire, il a été suggéré que l'AmB pouvait former des complexes stables avec les stérols (Adjou et coll. 1997). Mangé et coll. (2000) ont montré que l'AmB modifie les propriétés des Detergent-Resistant Microdomains (DRM) localisés à la membrane cellulaire en entraînant probablement une désorganisation de la membrane lipidique. Par ailleurs, une étude récente a décrit un mécanisme d'action via une liaison directe de l'AmB à la PrP^C, ainsi que le RC (Hartsel et coll. 2003 ; Milhavet et coll. 2000). Le MS-8209 semble quant à lui prévenir la réplication de l'agent pathogène au niveau du site d'inoculation. En effet, il agirait plus précisément au niveau du compartiment lysosomal des astrocytes lorsqu'il est administré intracérébralement (Grigoriev et coll. 2002). Lors d'un traitement par voie périphérique, il semble interférer à un stade précoce de la neuroinvasion, principalement durant la réplication du prion dans le système lymphoréticulaire, empêchant ainsi sa propagation dans le système nerveux périphérique (Adjou et coll. 2000). Enfin, l'effet anti-prion du RC et des polyanions semble correspondre à une interaction directe

avec la PrP^{Sc} ce qui permettrait de stabiliser sa conformation et de prévenir son interaction avec la PrP^C et le processus de conversion (Hartsel et coll. 2003). Le RC est également capable d'interagir avec la PrP^C et de modifier son cheminement intracellulaire interférant ainsi sur sa conversion en PrP^{Sc}. Jusqu'à présent, le traitement de patients avec l'AmB ne s'est pas révélé efficace. Toutefois, l'utilisation de MS-8209 pourrait être considérée avec intérêt dans le traitement après une contamination iatrogène.

b) Le rouge congo (RC) et ses analogues

Rudyk et coll. (2000) ont étudié l'effet anti-prion des analogues du RC dans lesquels l'activité carcinogène du noyau benzidine a été remplacée tout en essayant de favoriser une meilleure pénétration des molécules au travers de la barrière hémato-encéphalique (ou BHE). Vingt-deux analogues du RC ont été testés. Pour certains d'entre eux, les auteurs ont noté des niveaux de PrP^{Sc} plus élevés que dans les souris contrôles non traitées. De façon surprenante, les courbes dose-réponses révèlent qu'à des concentrations faibles des dérivés du RC, le niveau de PrP^{Sc} peut augmenter jusqu'à atteindre 270 % par rapport à celui des souris non traitées. Dans le même sens, Beringue et coll. (1999) ont observé une augmentation de la PrP^{Sc} dans la rate de souris inoculées par voie intra-péritonéale avec des homogénats de cerveau C506M3 co-incubés avec le RC. Le RC semble donc avoir peu de chance d'être utilisé un jour pour le traitement de la pathologie humaine.

B) Composés testés récemment comme agents anti-prion

a) Inhibiteurs développés à partir de données structurales

Le manque de connaissance quant à la nature de l'agent prion ainsi que son mode de réplication représente un problème important pour le développement de stratégies thérapeutiques, notamment pour un criblage de drogue à haut débit. En 1996, la première structure de PrP (90-321) a été publiée (Riek et coll. 1996). Bien que l'information structurale était alors limitée à la structure monomérique de la protéine PrP normale, cela a permis le développement de stratégies de recherche de drogues. Dans ce contexte, Perrier et coll. (2000) ont développé une approche originale basée sur la mise en évidence de composés mimant une région critique pour le processus de réplication et présente à la surface de la PrP. Quatre-vingt composés ont été testés dans des essais *ex vivo* pour leur capacité à réduire la propagation du prion. Deux molécules ont été sélectionnées : Cp60 et Cp62. Ces molécules présentent une IC₅₀ de 18 et 30 μM respectivement. Toutefois, le comportement de ces agents *in vivo* n'a pas été testé car la commercialisation de ces composés a été arrêtée.

b) Peptides "b-breaker"

Une approche utilisant le principe d'une interférence d'un composé peptidique avec la protéine prion a été employée (Reilly 2000). L'équipe de Soto a en effet montré qu'un peptide de 13 résidus, appelé "b-breaker" pouvait changer la conformation anormale au niveau des feuilletts b et les propriétés biochimiques de la PrP^{Sc} présente dans des homogénats de cerveaux de souris infectés ou de cerveaux

humains de patients atteints de vMCJ ou de MCJ sporadique (Soto 1999). Ce peptide peut également agir sur la conversion des PrP mutées en culture cellulaire (Soto et coll. 2000).

L'utilisation des peptides comme agents thérapeutiques des maladies neurodégénératives s'est souvent montrée inefficace car ces derniers ne passant pas la BHE, principalement à cause de leur rapide dégradation par les enzymes protéolytiques. Toutefois le peptide b-breaker utilisé dans les ESST semble ne pas souffrir de ces inconvénients comme en atteste l'étude sur les souris (Soto, et coll. 2000).

c) Les dérivés tricycliques

Étant donné que la barrière hémato-encéphalique (BHE) réduit l'accessibilité d'un grand nombre de drogues au système nerveux central (SNC), Korth et coll. (2001) ont proposé un criblage à grande échelle de molécules commercialisées comme médicament et connues pour traverser facilement cette barrière. Ils ont ainsi pu montrer que la quinacrine (Mepacrine®) et la chlorpromazine (Largactil®), antimalarien et antipsychotique déjà commercialisés, avaient une activité anti-prion. Ces composés tricycliques possédant plusieurs chaînes aliphatiques présentaient une forte activité anti-prion avec des IC₅₀ de l'ordre de 0,3 et 3 mM. L'activité anti-prion de la quinacrine avait par ailleurs été déjà montrée par une autre équipe (Doh-Ura, et coll. 2000). Cette drogue possède plusieurs activités :

- Action intercalante entre les paires adjacentes de l'ADN ;
- Inhibition de la transcription de l'ARN ;

Bien que ces drogues présentent une forte activité inhibitrice *ex vivo*, les essais chez l'animal se sont révélés décevants (Collins et coll. 2002). Neuf dérivés de la quinacrine ont été synthétisés et testés en culture cellulaire par l'équipe de Prusiner dont les bi-acridines et tri-acridines (May et coll. 2003). Une étude structurale récente montre que ces molécules se fixent au niveau des résidus Tyr225, Tyr226, et Gln227 de l'hélice alpha 3 de la PrP^C (Vogtherr et coll. 2003) ; à proximité du site de fixation de la protéine X. La protéine X est un hypothétique facteur supposé participer *in vivo* à la transconformation de la PrP^C en une PrP intermédiaire qui évoluerait vers la PrP^{Sc}. Dans ce cadre, la quinacrine et ses dérivés agiraient dans la thérapeutique anti-prion en rentrant en compétition avec la protéine X (Vogtherr et coll. 2003). Ces drogues ont été testées chez l'homme mais sans entraîner d'amélioration clinique durable (Kobayashi et coll. 2003). L'équipe du Pr. Stanley PRUSINER a utilisé la quinacrine, avec certains résultats, chez une jeune malade anglaise qui aurait été atteinte du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Toutefois, ces résultats n'ont pas été confirmés, et la malade est décédée. Par ailleurs, un deuxième patient, atteint d'une forme classique de maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique, n'aurait pas répondu au traitement. A ce stade, ces résultats ne permettent donc pas de conclusions définitives. Ajouté à cela, la quinacrine qui au départ est un anti-parasitaire, est susceptible de provoquer des effets indésirables rares mais graves : aplasie médullaire, psychose, convulsions, hépatites, atteintes oculaires. Un possible effet cancérigène a aussi été évoqué.

C) Les thérapies anti-prion innovantes

a) Composés tétrapyroles

Les tétrapyroles cycliques appartiennent à une classe de composés biologiques capables d'induire un changement conformationnel des protéines. Ils ont donc été rapidement considérés comme de bons candidats pour interférer avec la formation des PrP^{Sc}. Vingt-deux dérivés des porphyrines et phthalocyanines ont été testés sur des cellules ScN2a (Caughey et coll. 1998). Parmi ces dérivés, le PcTS, le DPG2-Fe³⁺ ainsi que le TMPP-Fe³⁺ sont capables d'inhiber la formation de PrP^{Sc} dans les cellules ScN2a avec des concentrations de l'ordre du micromolaire (Caughey et coll. 1998). Ils permettent également le prolongement de la période d'incubation de la maladie chez des souris traitées le jour de leur inoculation avec des homogénats infectieux de scrapie (Priola et coll. 2000). Des injections répétées quotidiennement de faibles doses intra-péritonéales de PcTS (0.25 mg/animal) augmentent la période d'incubation de 165 % comparée aux souris non traitées. Toutefois, l'effet de ces drogues semble disparaître si le traitement est débuté 28 jours après l'inoculation (Priola et coll. 2000).

b) Immunisations passives et approches vaccinales

L'utilisation d'anticorps (Ac) anti-PrP dans une stratégie thérapeutique a récemment fait son apparition dans la thématique des thérapeutiques anti-prion et semble être une approche très prometteuse pour les années à venir. En empêchant la liaison de la PrP^C aux molécules essentielles au processus de réplication, Peretz et coll. ont émis l'hypothèse que les anticorps anti-PrP pouvaient inhiber la réplication des prions (Peretz et coll. 2001). Deux Ac –le D18 et le D13- ont la capacité non seulement d'inhiber la réplication de la PrP^{Sc} mais également d'abolir l'infectiosité des cellules ScN2a. Ces Ac ont des IC₅₀ de 9 nM pour le D18 et de 12 nM pour le D13. Il s'agit d'un effet dose- dépendant. Parallèlement, il a été montré que l'Ac monoclonal anti-PrP 6H4, qui reconnaît l'épitope 144-152 de la protéine PrP empêche l'infection des cellules ScN2a (Enari et coll. 2001). Par ailleurs, les souris transgéniques exprimant l'Ac anti-PrP 6H4 dans leur rate, ne tombent pas malades posant ainsi les premières pierres d'une stratégie vaccinale (Heppner et coll. 2001). Une récente étude chez l'animal vient renforcer l'intérêt grandissant de ces traitements par anticorps. White et coll. ont montré que les Ac monoclonaux anti-PrP ICSM35 et ICSM18, reconnaissant les épitopes (91-110) et (146-159) de la protéine PrP réduisent non seulement de façon efficace le taux de PrP^{Sc} dans la rate, mais également augmentent le délai d'apparition de la maladie sur des souris FVB inoculées avec la souche RML par voie intrapéritonéale (White et coll. 2003).

Toutefois plusieurs problèmes subsistent :

- Les anticorps ne sont pas spécifiques de la forme pathogène. On peut donc se demander s'ils ne risquent pas d'altérer la fonction normale de la PrP.
- Des anticorps injectés au niveau périphérique ne franchissent pas la BHE. Peut-on et comment les introduire dans le cerveau ?
- Le prion est une protéine normale de l'organisme. En cherchant à déclencher une réponse contre cette protéine "du soi", on risque en théorie de provoquer une maladie auto-immune.

c) Greffe de cellules et thérapie génique

Cette stratégie a été utilisée avec succès par l'équipe du Dr Fraser dans des expériences de

transplantation réalisées par injection intracérébrale de cellules embryonnaires de souris knock-out pour le gène de la PrP (PrP^{0/0}) (Brown et coll. 2001). L'idée est que comme la protéine PrP est essentielle pour la réplication du prion, la greffe de cellules PrP knock-out pourrait empêcher la réplication de l'agent dans ces cellules. Dans leur modèle de souris infectées (C57Bl/6), les cellules fœtales ont été injectées 150 jours après l'infection par la scrapie. Les résultats observés montrent une survie neuronale 54 % plus importante dans les souris traitées que dans les souris contrôles.

Ainsi, la transplantation de cellules embryonnaires représente une stratégie très prometteuse et sera probablement étudiée, sous différentes approches, dans les années à venir.

De même, le développement de la thérapie génique utilisant des vecteurs lentiviraux est un moyen thérapeutique qui semble efficace dans la lutte contre les maladies à prions. En effet, dans une récente étude, Crozet et coll. ont développé un outil thérapeutique utilisant les propriétés dominantes négatives de protéines prions de phénotype ARR/ARR (Crozet et coll. 2004). Dans cette étude, le docteur Crozet montre que les mutants dominants négatifs sont capables d'abolir la réplication de PrP^{Sc} endogènes dans des cellules chroniquement infectées par les prions. De même, injectés à des souris C57Bl/6 infectées par la souche Me7 du prion, ces vecteurs lentiviraux portant les mutants dominants négatifs sont capables d'allonger le délai d'incubation de la maladie de 11,4% chez ces souris. Ces résultats sont très prometteurs pour le développement, dans un avenir proche, de la thérapie génique dans la lutte contre les ESST.

But du travail

Dans l'unité INSERM U710 intitulée "Mécanismes moléculaires impliqués dans les démences neurodégénératives", un des axes de recherche est la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la réplication des prions, agents infectieux non conventionnels qui seraient composés principalement voire uniquement de la protéine du prion PrP.

Au laboratoire, nous accordons une attention particulière à l'extrémité amino-terminale de la PrP. En effet, cette extrémité porte une série de 5 octapeptides qui rend son étude structurale très complexe. Le premier objectif de mon diplôme EPHE a consisté à réaliser une caractérisation de cette extrémité N-terminale par des approches biophysiques.

De même, nous nous intéressons aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans la transconformation de la PrP^C en PrP^{Sc} pour mettre en place des stratégies de diagnostic et de thérapeutique dans les maladies à prions. Pour ce faire, nous avons mis en place plusieurs types de criblages complémentaires. Tout d'abord un criblage virtuel en utilisant des techniques de modélisation des interactions ligands-macromolécules (ou docking *in silico*) qui nous ont permis d'identifier une série de composés susceptibles d'interagir avec la protéine du prion. Afin de valider la pertinence biologique de ce criblage, le deuxième objectif de mon stage EPHE a consisté à procéder à un criblage cellulaire sur un modèle de cellules chroniquement infectées par les prions : les neuroblastomes murins N2a58/22L. Suite à ce criblage cellulaire, certains composés se sont révélés être des candidats potentiellement intéressants pour le diagnostic des maladies à prion.

Enfin, en vue de mettre en place une stratégie de traitement tardif des maladies à prions via des vecteurs lentiviraux, nous avons mis en place un protocole de microchirurgie par stéréotaxie sur des souris C57Bl/6 infectées par la souche Me7 du prion.

Bibliographie

A / B

- Adjou KT, Deslys JP, Demaimay R, Dormont D: Probing the dynamics of prion diseases with amphotericin B. *Trends Microbiol* 1997, 5:27-31.
- Adjou KT, Privat N, Demart S, Deslys JP, Seman M, Hauw JJ, Dormont D: 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* 2000, 122:3-8.
- Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS: Prions: health scare and biological challenge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:118-126.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C: Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986, 46:417-428.
- Baybutt H, Manson J: Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in

neuronal cells. *Gene* 1997, 184:125-131.

- Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Richard S, Launay JM, Laplanche JL: 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999, 10:40-46.
- Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA: Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 1995, 76 (Pt 3):509-517.
- Beringue V, Lasmezas CI, Adjou KT, Demaimay R, Lamoury F, Deslys JP, Seman M, Dormont D: Inhibiting scrapie neuroinvasion by polyene antibiotic treatment of SCID mice. *J Gen Virol* 1999, 80 (Pt 7):1873-1877.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB: Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982, 218:1309-1311.
- Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB: Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 1990, 110:743-752.
- Bosque PJ, Prusiner SB: Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol* 2000, 74:4377-4386.
- Brown DR, Besinger A, Herms JW, Kretzschmar HA: Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* 1998, 9:1425-1429.
- Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA: Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 1997, 146:104-112.
- Brown KL, Brown J, Ritchie DL, Sales J, Fraser JR: Fetal cell grafts provide long-term protection against scrapie induced neuronal loss. *Neuroreport* 2001, 12:77-82.
- Brown P, Rau EH, Johnson BK, Bacote AE, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC: New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:3418-3421.
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ: Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997, 389:498-501.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992, 356:577-582.
- Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Luhken G, Baron T, Groschup MH: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* 2004, 117:27-36.
- Butler DA, Scott MR, Bockman JM, Borchelt DR, Taraboulos A, Hsiao KK, Kingsbury DT, Prusiner SB: Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* 1988, 62:1558-1564.

C

- Caughey B, Ernst D, Race RE: Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol* 1993, 67:6270-6272.
- Caughey B, Race RE: Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem* 1992, 59:768-771.
- Caughey B, Raymond GJ: Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 1993, 67:643-650.
- Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B: Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:12117-12122.
- Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, Kolchinsky S, McShane L, Drohan WN, Brown P: Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003, 43:1687-1694.
- Chapman J, Ben-Israel J, Goldhammer Y, Korczyn AD: The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the *PRNP* gene codon 200 point mutation. *Neurology* 1994, 44:1683-1686.
- Chapman J, Brown P, Goldfarb LG, Arlazoroff A, Gajdusek DC, Korczyn AD: Clinical heterogeneity and unusual presentations of Creutzfeldt-Jakob disease in Jewish patients with the *PRNP* codon 200 mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993, 56:1109-1112.
- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M: Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 2003, 22:227-233.
- Colling SB, Wheal HV: Fast sodium action potentials are generated in the distal apical dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neurosci Lett* 1994, 172:73-96.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996, 383:685-690.
- Collins SJ, Lewis V, Brazier M, Hill AF, Fletcher A, Masters CL: Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* 2002, 52:503-506.
- Crozet C, Lin YL, Mettling C, Mourton-Gilles C, Corbeau P, Lehmann S, Perrier V: Inhibition of PrP^{Sc} formation by lentiviral gene transfer of PrP containing dominant negative mutations. *J Cell Sci* 2004, 117:5591-5597.
- Cuillé J, Chelle PL: La maladie dite "tremblante du mouton" est-elle inoculable? *C R Acad Sci (Paris)* 1936, 203:1552-4.

D / E / F

- Demaimay R, Adjou KT, Beringue V, Demart S, Lasmezas CI, Deslys JP, Seman M, Dormont D: Late

treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol* 1997, 71:9685-9689.

- Demaimay R, Chesebro B, Caughey B: Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red and other Congo Red analogs. *Arch Virol Suppl* 2000:277-283.
- Dickinson AG, Mackay JM: Genetical Control of the Incubation Period in Mice of the Neurological Disease, Scrapie. *Heredity* 1964, 19:279-288.
- Dickinson AG, Meikle VM, Fraser H: Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol* 1968, 78:293-299.
- Dickinson AG, Taylor DM: Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med* 1978, 299:1413-1414.
- Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B: Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 2000, 74:4894-4897.
- Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Androletti O, Eychenne F, Khang JV, Poivey JP, Lantier F, Laplanche JL: Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* 1999, 144:431-445.
- Enari M, Flechsig E, Weissmann C: Scrapie prion protein accumulation by scrapieinfected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:9295-9299.
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F: Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1993, 362:543-546.
- Fraser H, Dickinson AG: Targeting of scrapie lesions and spread of agent via the retinotectal projection. *Brain Res* 1985, 346:32-41.

G

- Gabizon R, Telling G, Meiner Z, Halimi M, Kahana I, Prusiner SB: Insoluble wild-type and protease-resistant mutant prion protein in brains of patients with inherited prion disease. *Nat Med* 1996, 2:59-64.
- Gajdusek C: Discussion on kuru, scrapie and the experimental kuru-like syndrome in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* 1967, 40:59-63.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M: Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966, 209:794-796.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Alpers M: Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* 1967, 155:212-214.
- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S: The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* 2001, 20:5863-5875.

- Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 1968, 161:388-389.
- Goldfarb LG, Brown P, Mitrova E, Cervenakova L, Goldin L, Korczyn AD, Chapman J, Galvez S, Cartier L, Rubenstein R, et al.: Creutzfeldt-Jacob disease associated with the *PRNP* codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* 1991, 7:477-486.
- Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J: Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87:2476-2480.
- Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J: PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol* 1994, 75 (Pt 5):989-995.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR: Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 2000, 482:257-260.
- Greenfield NJ: Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem* 1996, 235:1-10.
- Grigoriev VB, Adjou KT, Sales N, Simoneau S, Deslys JP, Seman M, Dormont D, Fournier JG: Effects of the polyene antibiotic derivative MS-8209 on the astrocyte lysosomal system of scrapie-infected hamsters. *J Mol Neurosci* 2002, 18:271-281.

H / I / J

- Hartsel SC, Weiland TR: Amphotericin B binds to amyloid fibrils and delays their formation: a therapeutic mechanism? *Biochemistry* 2003, 42:6228-6233.
- Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A: Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 2001, 294:178-182.
- Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J: Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:10248-10253.
- Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J: Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1998, 352:703-704.
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH: Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 214:993-999.
- Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S: Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J* 2001, 20:5876-5886.
- Inoue S, Tanaka M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M: Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J Vet Med Sci* 1997, 59:175-183.

- Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J: Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:8531-8535.
- Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J: Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:8531-8535.
- Johnson WC, Jr.: Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1988, 17:145-166.

K / L

- Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB: Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:10069-10074.
- Kimberlin RH, Walker CA: Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* 1978, 39:487-496.
- Kobayashi Y, Hirata K, Tanaka H, Yamada T: [Quinacrine administration to a patient with Creutzfeldt-Jakob disease who received a cadaveric dura mater graft--an EEG evaluation]. *Rinsho Shinkeigaku* 2003, 43:403-408.
- Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B: New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol* 2003, 77:10288-10294.
- Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB: Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:9836-9841.
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretschmar H: Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* 2001, 276:16711-16719.
- Kuwajima K: Circular dichroism. *Methods Mol Biol* 1995, 40:115-135.
- Ladogana A, Casaccia P, Ingrosso L, Cibati M, Salvatore M, Xi YG, Masullo C, Pocchiari M: Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* 1992, 73 (Pt 3):661-665.
- Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ: BSE transmission to macaques. *Nature* 1996, 381:743-744.
- Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D: Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997, 275:402-405.
- Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, Ford EK, Cai K, Miller JL, Gilligan KJ, Rubenstein R, Fournel M, Petteway SR, Jr.: Monitoring plasma processing steps with a sensitive Western blot assay for the detection of the prion protein. *J Virol Methods* 2000, 84:77-89.

M / N

- Mabbott NA, Brown KL, Manson J, Bruce ME: T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 1997, 92:161-165.
- Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J: Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 2001, 268:105-114.
- Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J: Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 2001, 268:105-114.
- Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP: Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 1999, 80 (Pt 11):3035-3042.
- Mallucci GR, Campbell TA, Dickinson A, Beck J, Holt M, Plant G, de Pauw KW, Hakin RN, Clarke CE, Howell S, Davies-Jones GA, Lawden M, Smith CM, Ince P, Ironside JW, Bridges LR, Dean A, Weeks I, Collinge J: Inherited prion disease with an alanine to valine mutation at codon 117 in the prion protein gene. *Brain* 1999, 122 (Pt 10):1823-1837.
- Mange A, Nishida N, Milhavet O, McMahon HE, Casanova D, Lehmann S: Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J Virol* 2000, 74:3135-3140.
- Markovits P, Dautheville C, Dormont D, Dianoux L, Latarjet R: 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 (Berl)* 1983, 60:75-80.
- May BC, Fafarman AT, Hong SB, Rogers M, Deady LW, Prusiner SB, Cohen FE: Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:3416-3421.
- Merz DC, Scheid A, Choppin PW: Immunological studies of the functions of paramyxovirus glycoproteins. *Virology* 1981, 109:94-105.
- Milhavet O, Lehmann S: Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* 2002, 38:328-339.
- Milhavet O, Mange A, Casanova D, Lehmann S: Effect of Congo red on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells. *J Neurochem* 2000, 74:222-230.
- Muller WE, Laplanche JL, Ushijima H, Schroder HC: Novel approaches in diagnosis and therapy of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mech Ageing Dev* 2000, 116:193-218.
- Murdoch GH, Sklaviadis T, Manuelidis EE, Manuelidis L: Potential retroviral RNAs in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 1990, 64:1477-1486.
- Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavet O, Lehmann S: Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* 2000, 74:320-325.

O / P

- Otto M, Beekes M, Wiltfang J, Bahn E, Poser S, Diringer H: Elevated levels of serum S100 beta protein in scrapie hamsters. *J Neurovirol* 1998, 4:572-573.
- Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S: Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997, 225:210-212.
- Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretzschmar H: Typing prion isoforms. *Nature* 1997, 386:232-234.
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H: Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999, 46:224-233.
- Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, Attane F, Besson G, Hannequin D, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL: Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (*PRNP*) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. *Hum Mutat* 2000, 15:482.
- Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 2001, 412:739-743.
- Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:13079-13084.
- Perrier V, Wallace AC, Kaneko K, Safar J, Prusiner SB, Cohen FE: Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:6073-6078.
- Priola SA, Raines A, Caughey WS: Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* 2000, 287:1503-1506.
- Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982, 216:136-144.
- Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR: Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78:6675-6679.

R

- Race R, Chesebro B: Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 1998, 392:770.
- Race RE, Fadness LH, Chesebro B: Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* 1987, 68 (Pt 5):1391-1399.
- Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riandel J, Laude H, Lehmann S, Favier A: Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper

- delivery. *J Biol Chem* 2003, 278:9064-9072.
- Reilly CE: Beta-sheet breaker peptides reverse conformation of pathogenic prion proteins. *J Neurol* 2000, 247:319-320.
- Richardson EP, Jr., Masters CL: The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. *Brain Pathol* 1995, 5:33-41.
- Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S: The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 1997, 3:1383-1388.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K: NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 1996, 382:180-182.
- Rudyk H, Vasiljevic S, Hennion RM, Birkett CR, Hope J, Gilbert IH: Screening Congo Red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells. *J Gen Virol* 2000, 81:1155-1164.

S

- Saborio GP, Permanne B, Soto C: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001, 411:810-813.
- Saeki K, Matsumoto Y, Onodera T: Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 219:47-52.
- Schagger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987, 166:368-379.
- Schmerr MJ, Jenny AL, Bulgin MS, Miller JM, Hamir AN, Cutlip RC, Goodwin KR: Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatogr A* 1999, 853:207-214.
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA: Preclinical test for prion diseases. *Nature* 1996, 381:563.
- Scott MR, Safar J, Telling G, Nguyen O, Groth D, Torchia M, Koehler R, Tremblay P, Walther D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB: Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:14279-14284.
- Shaked Y, Rosenmann H, Hijazi N, Halimi M, Gabizon R: Copper binding to the PrP isoforms: a putative marker of their conformation and function. *J Virol* 2001, 75:7872-7874.
- Shibuya S, Higuchi J, Shin RW, Tateishi J, Kitamoto T: Codon 219 Lys allele of *PRNP* is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998, 43:826-828.
- Soto C: Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches. *J Mol Med* 1999, 77:412-418.
- Soto C, Kascsak RJ, Saborio GP, Aucouturier P, Wisniewski T, Prelli F, Kascsak R, Mendez E, Harris DA, Ironside J, Tagliavini F, Carp RI, Frangione B: Reversion of prion protein conformational

changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* 2000, 355:192-197.

Soto C, Anderes L, Suardi S, Cardone F, Castilla J, Frossard MJ, Peano S, Saa P, Limido L, Carbonatto M, Ironside J, Torres JM, Pocchiari M, Tagliavini F: Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett* 2005, 579:638-642.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB: Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 1987, 51:229-240.

Stahl N, Borchelt DR, Prusiner SB: Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 1990, 29:5405-5412.

Stenland CJ, Lee DC, Brown P, Petteway SR, Jr., Rubenstein R: Partitioning of human and sheep forms of the pathogenic prion protein during the purification of therapeutic proteins from human plasma. *Transfusion* 2002, 42:1497-1500.

Supattapone S, Nguyen HO, Cohen FE, Prusiner SB, Scott MR: Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:14529-14534.

T / V

Tatzelt J, Groth DF, Torchia M, Prusiner SB, DeArmond SJ: Kinetics of prion protein accumulation in the CNS of mice with experimental scrapie. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58:1244-1249.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC: Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 1996, 380:639-642.

Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB: Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* 1988, 176:21-30.

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB: Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:14945-14949.

Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ: Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:2042-2047.

Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H: Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:4055-4059.

Vogtherr M, Grimme S, Elshorst B, Jacobs DM, Fiebig K, Griesinger C, Zahn R: Antimalarial drug quinacrine binds to C-terminal helix of cellular prion protein. *J Med Chem* 2003, 46:3563-3564.

W / Z

- Wegner C, Romer A, Schmalzbauer R, Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA: Mutant prion protein acquires resistance to protease in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* 2002, 83:1237-1245.
- Weissmann C: A 'unified theory' of prion propagation. *Nature* 1991, 352:679-683.
- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB: Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:6418-6422.
- White AR, Hawke SH: Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2003, 87:801-808.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996, 347:921-925.
- Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, Cousens SN, Mackenzie J, Estibeiro K, Green AJ, Knight RS: Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2000, 47:575-582.
- Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB: Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:3563-3568.
- Winklhofer KF, Hartl FU, Tatzelt J: A sensitive filter retention assay for the detection of PrP(Sc) and the screening of anti-prion compounds. *FEBS Lett* 2001, 503:41-45.
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K: NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:145-150.
- Zeidler M, Stewart GE, Barraclough CR, Bateman DE, Bates D, Burn DJ, Colchester AC, Durward W, Fletcher NA, Hawkins SA, Mackenzie JM, Will RG: New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 1997, 350:903-907.