

140 +78

50376
2002
17

Université des Sciences et Technologies de Lille I
UFR de Biologie

Thèse
Pour l'obtention du grade de
Docteur en Biologie et Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Jérôme Follet



Les Cellules de Schwann :
Rôle dans la propagation des prions
et modèle d'étude de la régulation du gène *prp* bovin.

Présentée le 29 janvier 2002 devant la commission d'examen:

Monsieur le Professeur André Capron
Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron
Monsieur le Professeur Dominique Dormont
Monsieur le Docteur Jean Gagnon
Monsieur le Professeur Delanhoye
Madame le Docteur Catherine Lemaire

Président du jury
Directeur de Thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

*Anne,
cette thèse
est pour toi
pour nous
pour lui*

*Alors comme le disait saint Bernard:
"Il n'existe pas de terme à l'Amour".*

*Maman, Papa,
Je vous dédie cette thèse
qu'elle soit la marque de
l'amour que je vous porte.*

Remerciements

Monsieur le Professeur André Capron

Je suis très touché de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être le président de ce jury de thèse. Je tenais également à vous remercier pour la proposition que vous m'avez offerte au sein de l'institut Pasteur. Que cette thèse soit le témoignage de ma très sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Dominique Dormont

Je vous remercie pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie vivement de l'intérêt que vous avez porté à ma thèse et vous prie de trouver ici la marque de ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Jean Gagnon

J'aimerais remercier le Docteur Jean Gagnon tout d'abord d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, mais plus particulièrement, je tiens à le remercier de l'accueil et la disponibilité dont il a fait preuve à mon égard lors de mon séjour sur Grenoble. Je garderai en mémoire une sonorité canadienne de Grenoble.

Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Jean-Yves Cesbron de m'avoir accueilli dans son équipe. La pertinence de ses remarques m'a permis de travailler sur deux sujets fortement concurrentiels au niveau international. Merci également de m'avoir ainsi fait confiance durant ces trois années en m'accordant une autonomie de travail. Par sa mobilité, il m'a également permis de rencontrer de nombreuses personnes compétentes au sein du Service d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, au sein de l'Institut de Biologie de Lille et enfin dans l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. En espérant que cette thèse soit à la hauteur de vos attentes.

Monsieur le Professeur Delannoye

Merci d'avoir accepté avec autant d'entrain de participer à ce jury. Recevez ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

Madame le docteur Catherine Lemaire-Vieille

Catherine, à l'heure où je vais partir dans le grand nord et que tu vas rester dans le sud, il faut se dire au revoir. Toutefois, je ne partirais pas sans te remercier pour l'ensemble de ces trois voire quatre années, si je compte le DEA. Un merci énorme pour le soutien scientifique que j'ai toujours pu trouver auprès de toi, que de questions posées et de problématiques abordées. Merci pour les corrections innombrables aussi bien des articles que de cette thèse. Merci également pour l'encouragement journalier que tu as su me donner quand le raz-le-bol était venu remplacer la motivation. Merci pour tes raquettes qui ont tant fait rêver Jean-Yves. En relisant la thèse de Nadira, elle disait que tu lui manquerais, que dire de plus..... J'espère juste que tu auras de temps à autre une pensée émue pour le CBB que je fus (et que je pense finalement rester). Enfin, si les prions nous amènent à nous rencontrer de nouveau, c'est avec joie que je t'offrirai un café crème sans sucre, même si je sais que C'est Bien Bête...

Madame le Professeur Monique Capron

Merci pour vos encouragements renouvelés qui m'ont soutenu durant ce travail. Initié dans votre structure, que cette thèse soit l'expression de ma profonde estime.

Madame le Docteur Valérie Podevin-Dimster

Un grand merci au Docteur Valérie Podevin, "dit Valou" pour les intimes. Je ne suis pas près d'oublier les heures au FACS et au P3 à s'épancher sur les aléas de la Vie. De même, je ne suis pas près d'oublier ces "Grôles" de soirées passées autour d'un Tabou et d'une collection de liqueurs bien garnie. Vivement notre prochaine rencontre avec Fanck et Charlotte. Enfin, merci Valérie pour ton sourire et ton soutien tout au long de cette aventure.

Madame le Docteur Françoise Blanquet-Grossard

Merci pour tes conseils et analyses devant les Western-Blot. J'ai chouchouté les cellules de Schwann pendant trois ans, à ton tour d'en prendre soin. Je sais que CBB ne te manquera pas, mais une chose me rassure, c'est qu'au P3 tu ne pourras pas faire autrement que de penser à moi devant les cultures. C'est Bien Bête, mais c'est déjà ça. Bon courage

Madame le Docteur Hélène Jouve

Merci pour votre sourire, et pour les heures de permanence au standard de l'IBS. Nos discussions durant les longues journées de Week-end m'ont conforté dans mon désir d'enseigner. Que ces quelques mots soient la marque de l'estime que je vous porte.

Monsieur le Docteur Bertrand Favier

Merci pour les conseils et contrôles de mycoplasmes apportés dans le cadre de nos cultures cellulaires. Bon courage pour les analyses de peau.

Monsieur Jean-Pierre Decavel

Merci Jean-Pierre pour ta disponibilité et ton soutien. Merci également pour l'ensemble de tes conseils techniques qui n'ont pas manqué, à chaque fois, de me faire avancer dans l'expérimentation animale et la manipulation en laboratoire haute sécurité. Notamment, je ne suis pas près d'oublier ta formation à la dure dans les sas du P3. Je suis certain qu'il m'en restera des séquelles. Enfin merci pour tes fous rires. J'ai hâte de savoir si l'on pourra bientôt retravailler ensemble.

Madame Pierrette Gozle

Pierrette, que dire de plus que je ne vous ai déjà dit sur Grenoble. Vous avez été le rayon de soleil du labo quand j'étais dans le Sud. Votre accueil, aussi bien au labo que chez vous, m'a touché. Si j'avais un cadeau souvenir à emmener de là-bas pour "ce plat pays qui est le mien", je pense que c'est vous que j'aurais mis dans le paquet.

Recevez par ces quelques mots la marque de toute mon estime.

Mademoiselle Nathalie Messian

J'aimerais transmettre mes plus vifs remerciements à Nathalie Messian, qui a su tout au long de nos expérimentations animales au P3 prendre le plus grand soin de nos souris. J'aimerais plus particulièrement la remercier pour la rigueur dont elle a fait preuve à l'encontre de notre travail.

Les membres du laboratoire d'écologie du parasitisme

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements au Dr. Eduardo Dei-Cas ainsi qu'à l'ensemble de son équipe le Dr. El Moukhtar Aliouat, le Dr. Cyril Guyard, le Dr. Aurélien Allaert, ainsi que Karine Guyot, Céline Recourt (et à Robert sa moitié qui a pris le temps de relire ce texte) Ludovique Huot et Magali Chabé pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire durant le temps de ma rédaction et m'avoir laissé l'accès à leur structure informatique. J'aimerais également les remercier pour le temps et la patience qu'ils ont accordés à la correction de ce manuscrit. En espérant que ce squat inopiné et les pauses café (court sucré) ne vous auront pas trop dérangés.

Les membres du SIBP

Merci à vous tous, l'histoire de ce travail a commencé avec vous et vous y tenez par conséquent une place de choix. Vous avez tous contribué à l'avancée du DEA, la thèse en étant la suite logique, vous en devenez les premiers participants.

Les membres de l'IBL

Bien que le séjour fût de courte durée, je voudrais présenter mes remerciements les plus vifs pour l'accueil que vous nous avez apporté. Plus particulièrement, j'aimerais remercier monsieur le Docteur Yves Rouille, et Frédérique pour leur accueil au premier étage première dent. Leur sympathie m'a permis de m'adapter rapidement à une nouvelle structure.

Les membres de l'IBS

A vous tous qui avez su m'accueillir avec autant de sympathie: un "Ch'ti" n'aurait pas fait mieux. Que ces quelques mots soient le gage de mon affection et de mon bon souvenir pour ces quelques mois passés à vos côtés.

Enfin, à Marc et Bernadette, mes beaux parents,

Que cette thèse soit aussi un peu à vous qui avez su être présents quand tous les baromètres n'étaient pas au beau fixe. Je tenais à vous remercier pour votre disponibilité, votre soutien constant et vos précieux conseils.

A François, XOF', Sandrine, Bastien, Lolo, Pierre et à tous ceux que j'ai rencontrés au cours de mes pérégrinations qui ont, à leur façon, contribué à ce travail avec leur encouragements renouvelés et sincères.

Abréviations

Abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
CAM:	Molécule d'adhésion cellulaire
CD :	Cellule dendritique
CFD :	Cellule folliculaire dendritique
CMCG:	Complexe des ganglions caeliaques et mésentériques
DL50 :	Dose létale 50%
DMNV:	Noyaux dorsaux médians du nerf Vague
Dpl:	"Protein Dopple"
Egr:	"Early growth responsive gene"
ESB :	Encéphalopathie spongiforme bovine
ESF :	Encéphalopathie spongiforme féline
ESST :	Encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible
FGF:	Facteur de croissance des fibroblastes
FVO:	Farine de viande et d'os
GDNF:	Facteur de croissance des nerfs dérivé des cellules gliales
GFAP :	Protéine gliofibrillaire acide
GFP :	"Green fluorescent protein"
GPI :	Ancre glycosyl-phosphatidyl inositol
GT1:	Lignée de neurones hypothalamiques de souris
HSPG:	Heparan sulphate protéoglycane
ic:	Intra cérébral
IFF :	Insomnie fatale familiale
Il-6 :	Interleukine 6
in:	Intra nerveux
ip:	Intra péritonéal
LB :	Lymphocytes B
LR:	Récepteur de la laminine
LRP:	Précurseur du récepteur de la laminine
LT :	Lymphocytes T
LT-β :	Lymphotoxine Bêta
MAG:	Glycoprotéine associée à la myéline
MCJ :	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MSC-80 :	Cellule de Schwann murine
MSC^{Ch}:	MSC-80 infectée par la souche Chandler
N. :	Nerf

N2a :	Cellule de neuroblastome murine
N-CAM :	Molécule d'adhésion des cellules neuronales
NGF :	Facteur de croissance des nerfs
NSE :	Enolase spécifique des neurones
NTR :	Non traduite
nv-MCJ :	Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
ORF:	Cadre ouvert de lecture
PC12:	Cellule de phéochromocytome de rat
PI-PLC :	Phosphatidylinositol phospholipase C
PK :	Protéinase K
PMH :	Phénocopies de la maladie d'Huntington
PrP^c :	Forme cellulaire de la protéine PrP
PrP^{Sc} :	Forme pathologique de la Protéine PrP
RER :	Réticulum endoplasmique rugueux
RML:	Souche de tremblante issue du Rocky Mountain Laboratory
SAF :	Fibrille associée à la tremblante
SC:	Cellule de Schwann
SCID:	"Severe combined immuno-deficiency"
SGSS :	Syndrome de Gertsman-Strausler-Scheinker
SLR :	Système lymphoréticulaire
SNC :	Système nerveux central
SNE :	Système nerveux entérique
SNP :	Système nerveux périphérique
SNPara :	Système nerveux parasympathique
SNS :	Système nerveux sympathique
SOD:	Super oxyde dismutase
TD:	Tube digestif
TNF:	Facteur de nécrose des tumeur

Résumé

Résumé

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESSTs) pouvant affecter l'homme et l'animal seraient liées à l'isoforme anormale (PrP^{Sc}) d'une protéine codée par l'hôte (PrP^C). La contamination par voie orale, la plus fréquente au niveau des ESSTs naturelles, pose un véritable problème de santé publique. Pour se propager depuis les sites périphériques d'inoculation jusqu'au système nerveux central, l'infection requiert une chaîne continue de cellules exprimant la PrP^C. La réalisation de souris transgéniques pour le gène rapporteur de la " *green fluorescent protein*" placé sous le contrôle du domaine 5' non traduit (NTR) du gène *prp* bovin a permis d'identifier les tissus périphériques exprimant la PrP. L'analyse des nerfs sciatiques dans ce modèle a suggéré que les cellules de Schwann (CS) expriment cette protéine. Nous avons montré *in vivo* et *in vitro* que la PrP est localisée sur la membrane et le cytoplasme des CS. Plus particulièrement, après infection par la souche de tremblante Chandler, nous avons montré que la lignée murine de CS (MSC-80) était capable de répliquer la PrP^{Sc}. Ces cellules contaminées se sont révélées infectieuses après inoculation intracérébrale à la souris. Ces résultats ont fourni, pour la première fois, un modèle de cellules gliales périphériques capables de répliquer *in vitro* les prions. Ces données nous ont permis de proposer un modèle de propagation de l'agent infectieux le long des fibres nerveuses périphériques *via* un mécanisme de réplication/infection d'une CS à une autre. Enfin, par une stratégie de délétions sériées dans un plasmide comprenant le gène rapporteur de la luciférase placé sous le contrôle de la région 5' NTR du gène *prp* bovin et transfection transitoire dans les MSC-80, nous avons caractérisé dans le premier intron du gène une séquence régulatrice de 220pb. Cette région insérée en double copie dans l'intron 1 a induit la surexpression du gène rapporteur.

Sommaire

Sommaire

REMERCIEMENTS	4
ABRÉVIATIONS	10
RÉSUMÉ	13
SOMMAIRE	16
1. PROPRIÉTÉS DES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES SUBAIGUËS TRANSMISSIBLES (ESSTS)	21
2. LES MALADIES À PRIONS ANIMALES	22
2.1. LA TREMBLANTE DU MOUTON	22
2.2. L'ENCÉPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE : ESB	23
3. LES ESSTS HUMAINES	24
3.1. LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB (MCJ)	24
3.2. LE NOUVEAU VARIANT DE LA MCJ (NV-MCJ).....	27
3.3. LE KURU.....	29
3.4. LE SYNDROME DE GERSTMANN-STRÄUSSLER-SCHEINKER (SGSS)	29
3.5. L'INSOMNIE FATALE FAMILIALE (IFF)	30
3.6. PHÉNOCOPIES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON (PMH).....	30
4. L'HYPOTHÈSE DU PRION	31
4.1. LES HYPOTHÈSES EN FAVEUR DE LA THÉORIE DU PRION : HISTORIQUE DE LA DÉCOUVERTE.....	31
4.2. LA PrP ^C	33
4.2.1. <i>Modifications post-traductionnelles de la PrP^C</i>	34
4.2.2. <i>Rôle de la PrP^C</i>	35
4.3. LA TRANSCONFORMATION DE LA PrP ^C EN PrP ^{Sc}	38
4.3.1. <i>Transition d'hélices alpha en feuillets plissés Bêta</i>	38
4.3.2. <i>Localisation cellulaire de la transconformation</i>	39
4.3.3. <i>Modèle catalytique ou de repliement</i>	39
4.3.4. <i>Modèle de nucléation-polymérisation</i>	39

5.	LES SOUCHES DE PRIONS	40
5.1.	DESCRIPTION.....	40
5.2.	PROFIL DE SOUCHE.....	41
6.	LA BARRIÈRE D'ESPÈCE.....	41
7.	LES AUTRES HYPOTHÈSES.....	42
7.1.	L'HYPOTHÈSE DU VIRUS CONVENTIONNEL	43
7.2.	L'HYPOTHÈSE RÉTROVIRALE.....	43
7.3.	LES HYPOTHÈSES MIXTES	43
8.	LE GÈNE CODANT POUR LA PRP	44
8.1.	IMPORTANCE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PRP DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MALADIES À PRIONS	44
8.1.1.	<i>Structure des gènes codant la PrP</i>	44
8.1.2.	<i>Polymorphisme et mutations du gène prp</i>	45
8.2.	L'EXPRESSION DU GÈNE PRP EST INDISPENSABLE À LA NEUROPATHOGENÈSE ET LE NIVEAU DE CETTE EXPRESSION MODIFIE LA PÉRIODE D'INCUBATION DE LA MALADIE.....	48
8.2.1.	<i>L'expression de la PrP^c dans le cerveau est indispensable au développement des signes histopathologiques.</i>	48
8.2.2.	<i>La réplication et le transport de la PrP^{Sc} dans les tissus périphériques nécessite l'expression de la PrP^c</i>	48
8.2.3.	<i>Le temps d'incubation est associé au niveau d'expression du gène codant la PrP</i>	49
8.2.4.	<i>L'expression du gène prp est associée à la barrière d'espèce</i>	49
8.3.	L'EXPRESSION DU GÈNE EST RÉGULÉE DURANT L'EMBRYOGENÈSE ET LES PREMIÈRES PHASES DE DÉVELOPPEMENT	50
8.4.	L'EXPRESSION DU GÈNE PRNP EST RÉGULÉE DANS L'ESPACE	50
8.4.1.	<i>Expression de la PrP^c dans les tissus neuronaux</i>	51
8.4.2.	<i>Expression de la PrP^c dans les tissus non neuronaux</i>	52
9.	LA PROPAGATION DES PRIONS DEPUIS LES SITES EXTRA-CÉRÉBRAUX JUSQU'AU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC).....	54
9.1.	LE RÔLE DU SYSTÈME LYMPHORÉCULAIRE DANS LA RÉPLICATION/PROPAGATION DE L'AGENT INFECTIEUX.	54
9.1.1.	<i>Le rôle des lymphocytes</i>	55

9.1.2. <i>Les Cellules Folliculaires Dendritiques</i>	56
9.2. TRANSPORT PAR VOIE SANGUINE.....	58
9.3. RÔLE DU SYSTÈME NERVEUX PÉRIPHÉRIQUE DANS LE TRANSPORT DE L'AGENT	58
9.3.1. <i>Liaison entre le système lymphoréticulaire et le système nerveux périphérique</i>	58
9.3.2. <i>Les voies nerveuses impliquées</i>	59
9.3.3. <i>Mécanisme de propagation dans le SNP</i>	60
10. OBJECTIFS DU TRAVAIL	63
11. RÉSULTATS	65
CHAPITRE I : EPITHELIAL AND ENDOTHELIAL EXPRESSION OF THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN REPORTER GENE UNDER THE CONTROL OF BOVINE PRION PROTEIN (PRP) GENE REGULATORY SEQUENCES IN TRANSGENIC MICE	66
1. INTRODUCTION	67
2. ARTICLE	69
3. DISCUSSION	75
CHAPITRE II : PRP EXPRESSION AND REPLICATION BY SCHWANN CELL: IMPLICATION IN PRION SPREADING	79
1. INTRODUCTION	80
2. ARTICLE	82
3. DISCUSSION	96
CHAPITRE III : IDENTIFICATION OF AN INTRONIC REGULATORY DOMAIN IN THE BOVIN <i>PRP</i> GENE	104
1. INTRODUCTION	105
2. ARTICLE	107
3. DISCUSSION	121
 DISCUSSION PERSPECTIVES	 126
LISTE DES PUBLICATIONS	138
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140

Index des illustrations

Figure 1 : Comparaison des différentes de caractéristiques des MCJ sporadiques, iatrogènes et du nouveau variant de la MCJ.	25
Figure 2 : Mutations du gène <i>prp</i> associées aux ESSTs humaines.	27
Figure 3 : Comparaison de la répartition des patients atteints de MCJ sporadique ou du nvMCJ	28
Figure 4 : Modèle de fonctionnement de la LRP/LR en tant que récepteur de la PrP ^c	37
Figure 5 . Modèles de conversion de la PrP ^c en PrP ^{Sc}	40
Figure 6 : Hypothèses proposées sur la nature de l'agent infectieux responsable des ESSTs.	44
Figure 7 : Polymorphismes du gène <i>prp</i> humain, ovin et murin.	47
Figure 8 : Voies de neuroinvasion des prions.	61
Figure 9 : Modèle cellulaire de propagation de la PrP ^{Sc} le long des fibres nerveuses du SNP.	98
Tableau 1 : Comparaison des propriétés observées entre la PrP ^c et la PrP ^{Sc} d'après Hunter.	33
Tableau 2 : Temps d'incubation des souris <i>prnp</i> ^{+/+} , <i>prnp</i> ^{+/-} , <i>prnp</i> ^{-/-}	49
Tableau 3 : Expression de la PrP ^c dans certains tissus extraneuronaux.	53
Tableau 4 : Effet de la perte de certaines lignées cellulaires lymphoïdes sur le développement des ESSTs.....	56

Introduction générale

1. Propriétés des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESSTs)

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles sont des maladies neurodégénératives toujours fatales affectant les animaux et l'homme. Elles se distinguent des maladies virales et bactériennes par leur double déterminisme génétique et infectieux. Ces maladies sont caractérisées par une phase d'incubation longue (excédant souvent 10 ans et pouvant aller jusqu'à 40 ans dans l'espèce humaine). Cette période est cliniquement asymptomatique et ne présente aucune réponse inflammatoire ou immunitaire spécifique. Au stade final de la maladie, les lésions neuropathologiques (Beck *et al.*, 1966; Fraser & Dickinson, 1967; Gajdusek, 1972) sont caractérisées par une mort neuronale, une astrocytose, une vacuolisation du neuropile et la présence d'une spongiose. Le caractère infectieux de ces maladies a été montré par la transmissibilité de ces affections à l'animal.

Sur le plan biochimique, les ESSTs sont caractérisées par l'accumulation d'une protéine anormale partiellement résistante à la protéinase K : la PrP^{Sc}. Cette protéine est l'isoforme pathologique d'une protéine ubiquitaire de l'hôte : la PrP^C. La PrP^{Sc} est retrouvée en quantité proportionnelle et indissociable du titre infectieux. Cette protéine constitue ainsi le marqueur cardinal de ces maladies (Prusiner *et al.*, 1981b; Prusiner, 1982; Prusiner, 1991). Il a alors été proposé que la PrP^{Sc} soit à elle seule l'agent infectieux responsable des ESSTs, d'où le nom de ces affections : maladies à prions (pour *proteinaceous infectious particle*). La PrP^{Sc} est souvent retrouvée très précocement dans les organes lymphoïdes et le système nerveux périphérique. Elle s'accumule dans les derniers stades de la maladie au sein du système nerveux central (SNC). La localisation de la PrP^{Sc} en périphérie ou dans le SNC dépend à la fois du génotype de l'hôte infecté, de l'origine de l'agent infectieux, et du mode de contamination. Ainsi, en fonction des extraits infectieux inoculés, des variations dans la localisation tissulaire et dans la période d'incubation de la maladie ont permis de définir la notion de souche de prions.

Actuellement, il n'existe aucun traitement reconnu pour traiter les ESSTs. Toutefois, de récents progrès ont été obtenus, sur des cultures cellulaires chroniquement infectées, par l'emploi de molécules qui agissent sur la formation de la PrP^{Sc} (Korth *et al.*, 2001).

Enfin, en l'absence de réponse immunologique, le diagnostic est basé sur l'examen anatomopathologique et sur la détection immunologique *post-mortem* de la PrP^{Sc} dans des tissus nerveux. Un diagnostic de suspicion, *in vivo*, est possible par l'examen du tissu

lymphoïde pour certaines formes de maladies à prions (treblante naturelle du mouton, nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob pour l'homme).

Une étude récente utilisant la technique de "differential display" a permis de mettre en évidence dans la rate des animaux infectés une diminution du taux de transcrit codant pour le facteur lié à la différenciation erythroïde (EDRF) (Miele *et al.*, 2001). Cet effet a été observé dans le cas d'une infestation expérimentale chez le rongeur mais également dans le cas d'ESST naturelle. De plus, le groupe de R. Gabizon a récemment identifié une forme dérivée de la PrP^{Sc} (UPrP) dans les urines d'animaux infectés (Shaked *et al.*, 2001). Ces travaux ouvrent de nouvelles voies de recherche d'un test de dépistage diagnostique sur l'animal pendant la phase d'incubation silencieuse.

2. Les maladies à prions animales

Les maladies à prions touchent un grand nombre d'espèces animales sauvages ou domestiques et regroupent la treblante du mouton et de la chèvre, l'encéphalopathie spongiforme féline, l'encéphalopathie transmissible du vison, le syndrome du dépérissement chronique des cervidés et l'encéphalopathie spongiforme bovine.

2.1. La treblante du mouton

La plus ancienne description d'encéphalopathie spongiforme est la treblante du Mouton (ou Scrapie) qui a été rapportée pour la première fois en 1732. Répartie à travers le monde, cette maladie est particulièrement présente en Grande Bretagne où sa prévalence est estimée à environ 2 cas pour 1000 moutons (Morgan *et al.*, 1990; Nathanson *et al.*, 1997). La période d'incubation de cette maladie est comprise entre 18 mois et 10 ans avec une médiane comprise entre 3 et 4 ans. La mort survient alors après quelques semaines d'évolution (Hauw *et al.*, 1995).

L'infectiosité (ou pouvoir infectieux) a été caractérisée par la capacité de certains tissus, dérivés d'animaux contaminés, à transmettre la maladie après inoculation à des animaux sains. La fréquence et la période d'incubation de la maladie sont directement liées à la dose d'agent infectieux inoculée. Le titre infectieux dérivé de cette propriété se mesure en observant le nombre d'animaux malades en fonction des dilutions successives de l'échantillon. Il se calcule

à partir de la dose létale 50% (DL50), c'est-à-dire la dose qui ne tue que la moitié des animaux.

Les mécanismes de transmission de la tremblante ne sont pas bien connus. Des cas de transmissions maternelles ont été rapportés (Foster *et al.*, 1992), toutefois on considère que la tremblante naturelle se propage après ingestion de matériel contaminé comme les membranes foetales ou le placenta. Dans les premières étapes de la maladie, le pouvoir infectieux est retrouvé dans les organes lymphoïdes de l'oropharynx (amygdales), de l'intestin (plaque de Peyer) (Heggebo *et al.*, 2000) mais aussi dans la rate et les ganglions lymphatiques. Il gagne ensuite le cerveau et la moelle épinière en quelques mois (Hadlow *et al.*, 1982; Kimberlin, 1990). Les lésions histologiques sont strictement localisées dans le système nerveux central. Une spongiose et une astrocytose sont présentes dans le tronc cérébral, dans le diencephalon, dans le système olivo ponto-cérébelleux et dans le système hypothalamo-hypophysaire.

Des inoculations successives chez la souris, de différents échantillons issus de moutons contaminés, ont mis en évidence l'existence d'une vingtaine de phénotypes de souches de tremblante. Les souches se caractérisent par leurs temps d'incubation, la sévérité et la localisation des atteintes cérébrales pour différentes lignées de souris (Bruce, 1993).

2.2. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine : ESB

En 1986, une nouvelle ESST touchant les bovins est apparue en Grande Bretagne. Jusqu'à aujourd'hui, plus de 200 000 cas en Grande-Bretagne et 379 en France au 24 Août 2001 ont été dénombrés. De nouveaux cas sont également apparus en Allemagne, en Suisse, en Belgique, au Danemark, au Portugal, en Espagne (Baron *et al.*, 1995) et plus récemment au Japon.

Parallèlement à l'émergence de l'ESB, de nombreuses nouvelles espèces animales domestiques ou maintenues en captivité ont développé des ESSTs (des chats, des kudus, des nyalas, des oryx, des élans, des bisons, des antilopes, des tigres, des ocelots, des chimpanzés ou des pumas). En 1996, Will *et al.*, (Will *et al.*, 1996) ont décrit chez l'homme une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob qui suggérait la transmission de l'agent de l'ESB à l'homme. Les analyses par typage de souche ont montré que ce nouveau variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob avait les mêmes caractéristiques que l'agent de l'ESB (Collinge *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997a). Le passage de l'ESB à l'homme a soulevé alors un grave problème de santé publique.

Même si l'origine de cette maladie est toujours débattue, les enquêtes épidémiologiques ont conduit à considérer les farines de viandes et d'os (FVO), utilisées dans l'alimentation des bovins, comme l'agent de propagation de l'infection (Wilesmith, 1988; Bradley & Wilesmith, 1993; Kimberlin & Wilesmith, 1994). Aux premiers stades de l'épidémie, il est probable que des carcasses de moutons atteints de tremblante ou des cas sporadiques rares de bovins atteints par l'ESB furent recyclés dans les FVO (Collinge, 1999). Dès 1988, les FVO furent interdites au Royaume-Uni, dans l'alimentation animale. Cette mesure, renforcée en 1996 dans tous les pays européens, a permis de réduire l'incidence de cette maladie. Toutefois, alors que la période d'incubation moyenne de la maladie est de 5 ans, de nouveaux cas sont apparus depuis. Ces données suggèrent soit que l'interdiction des FVO a été mal respectée soit qu'il existe une autre voie de transmission.

Chez les animaux atteints d'ESB, les organes infectieux sont le cerveau, la moelle épinière, la rétine, les ganglions des nerfs paravertébraux et trijumeaux et, à un niveau très inférieur, l'iléon distal (Brown, 2001b). Les modifications neuropathologiques sont principalement localisées dans les noyaux du tractus solitaire et le tractus spinéal du nerf trijumeau. Elles se caractérisent par des plaques amyloïdes et une vacuolisation du neuropile toutefois, la vacuolisation des périkaryons, comme on peut la retrouver dans la tremblante du mouton, est ici assez rare (Baron *et al.*, 1995).

3. Les ESSTs humaines

On compte actuellement six maladies à prions pouvant affecter l'homme : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (nvMCJ), le Kuru, le syndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker (SGSS), l'Insomnie Fatale Familiale (IFF) et certaines Phénocopies de la Maladie de Huntington (PMH).

3.1. La maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)

C'est la plus fréquente des ESSTs humaines. Les premiers cas ont été décrits par Jakob en 1921 chez trois patients rapprochés par la suite d'un cas décrit par Creutzfeldt en 1920. Ce n'est que sur la base de la transmissibilité de la maladie aux primates que l'entité clinique, appelée aujourd'hui maladie de Creutzfeldt-Jakob, a pu être établie. La répartition de la MCJ est mondiale et homogène avec une incidence moyenne de 1,4 cas par an pour 1 million d'individus. Cette répartition est équivalente entre les sexes. En fonction de critères cliniques,

pathologiques et épidémiologiques, cette maladie peut se présenter sous trois formes: sporadique, familiale ou iatrogène.

Les formes sporadiques

Elles représentent 85% des cas de MCJ, et aucune origine ne peut être trouvée pour expliquer l'apparition de la maladie. L'âge moyen des patients est d'environ 65 ans (Delasnerie-Laupretre & Alperovitch, 1995). La plupart d'entre eux succombent 6 mois après l'apparition des premiers signes cliniques. La maladie se présente comme une démence rapidement évolutive du sujet âgé. Les principales caractéristiques des différentes formes de MCJ sont reprises dans la figure 1.

Comme pour les autres ESSTs, le diagnostic de certitude se fait par l'examen neuropathologique post-mortem qui montre, au niveau de la substance grise, la triade : spongieuse, perte neuronale et gliose astrocytaire parfois accompagnée de dépôts de plaques amyloïdes (4 à 5% des cas).

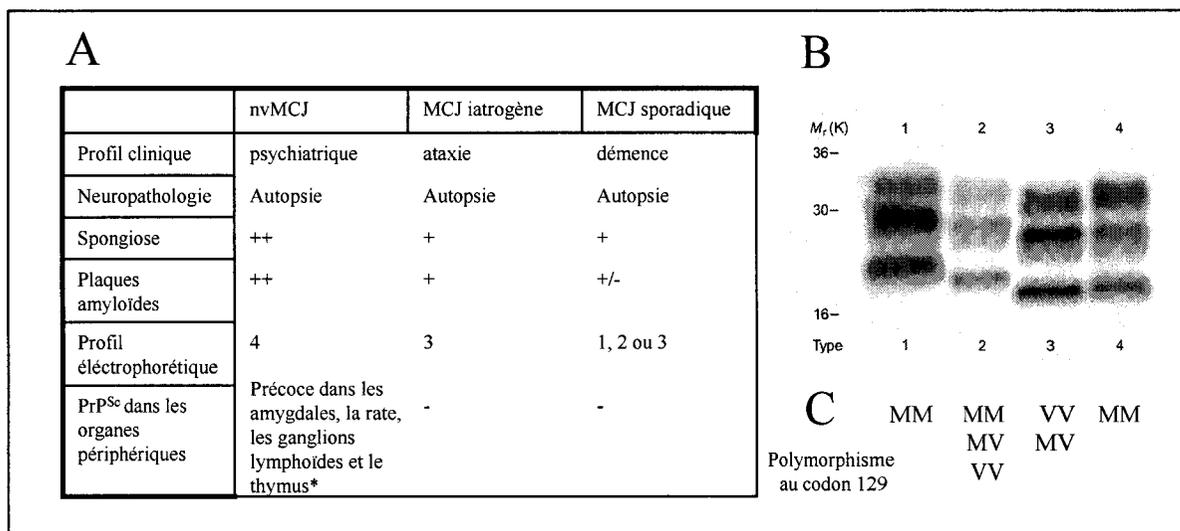


Figure 1 : Comparaison des différentes de caractéristiques des MCJ sporadiques, iatrogènes et du nouveau variant de la MCJ.

(A) La comparaison de ces trois formes de MCJ montre en plus des profils cliniques précoces de ces maladies la présence de peu (+/-), de nombreuses (+) ou de très nombreuses (++) plaques amyloïdes. La PrP^{Sc} dans les organes périphériques a été détectée précocement dans la rate les ganglions lymphoïdes et les amygdales dans tous les cas de nvMCJ. (*) La PrP^{Sc} n'a pas été détectée dans tous les échantillons de thymus testés (Wadsworth *et al.*, 2001). (B) Profils électrophorétiques de la PrP^{Sc} des différentes formes de MCJ après digestion partielle à la PK. Les poids moléculaires sont donnés en kilodalton (K). (C) Polymorphismes au codon 129 associés aux différents types de profil électrophorétique de la PrP^{Sc} humaine.

Les formes familiales

Elles représentent selon les études de 5 à 15% des cas. Elles se transmettent de façon autosomique dominante. Ces formes de MCJ sont associées à des mutations ou des insertions dans le cadre ouvert de lecture du gène codant pour la PrP humaine. Les principales mutations sont retrouvées aux codons 178 (D178N), 180 (V180I), 200 (E200K), 210 (V210I), 232 (M232R). Les insertions correspondent à des séquences de 24 nucléotides codant pour des domaines répétés de 8 acides aminés (Octarepeat). Ces séquences s'insèrent aux codons 53, 67, 75 ou 83 et peuvent être présentes en 2, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 exemplaires (Prusiner, 1996; Prusiner, 1998) (Figure 2).

Ces formes héréditaires diffèrent des cas sporadiques par l'âge précoce des patients et par la l'évolution plus lente des détériorations mentales. La distribution et la sévérité des modifications neuropathologiques dépendent du type de mutation. Les travaux de Antoine *et al.* et de Korczyn *et al.*, ont mis en évidence la présence, dans une forme familiale comprenant la mutation E200K, de neuropathies périphériques comprenant des structures caractéristiques de démyélinisation remyélinisation (Korczyn, 1991; Antoine *et al.*, 1996).

Les formes acquises

Elles comprennent principalement les formes iatrogènes suite à :

- Une greffe de dure-mère. Dans ces cas, la maladie apparaît 7 à 8 ans après l'opération. La transmission est alors due à l'utilisation de greffons contaminés.
- Une intervention neurochirurgicale avec instruments contaminés lors d'une opération précédente sur un patient atteint de MCJ. Les patients développent les premiers signes cliniques 2 à 5 ans après l'opération.
- Un traitement par des hormones de croissance extractives. En effet, certains lots d'hormones avaient été préparés à partir d'hypophyses humaines extraites de cadavres contaminés. En France, 80 adolescents sur environ 1000 enfants traités ont développé une MCJ (résultat au 6 Novembre 2001). La maladie apparaît 10 à 15 ans après le traitement et aboutit à la mort en 17 mois. Les signes neuropathologiques sont marqués par de nombreuses plaques amyloïdes dans le cervelet qui est atrophié (Brown & Gajdusek, 1991).

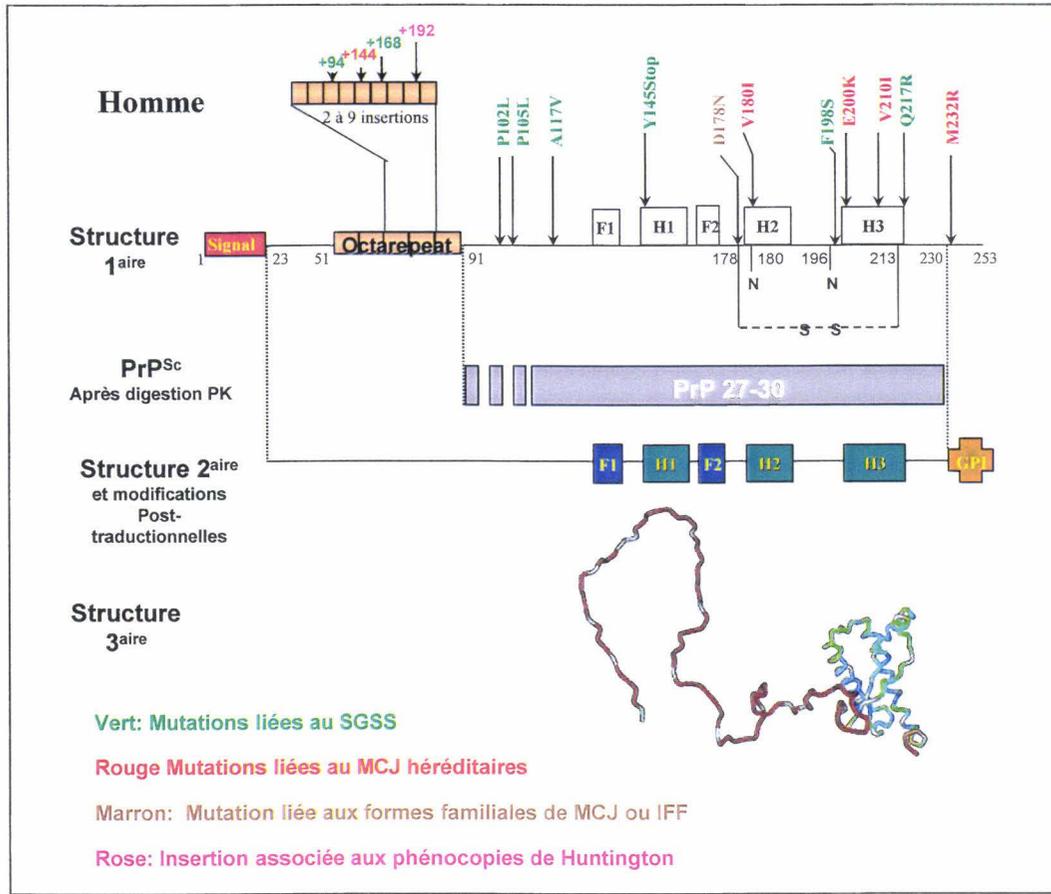


Figure 2 : Mutations du gène *prp* associées aux ESSTs humaines.

Représentation schématique du gène *prp* représentant les mutations associées aux ESSTs humaines et certaines modifications post-traductionnelles. Les oligosaccharides sont liés aux asparagines 180 et 196. Le pont disulfure est représenté entre les résidus 178 et 213. La structure secondaire de la PrP^c est marquée par trois hélices- α (H) et deux feuillets pliés- β (F), identifiés par spectroscopie RMN.

Proline (P), Leucine (L), Alanine (A), Valine (V), Tyrosine (Y), Aspartate (D), Asparagine (N), Isoleucine (I), Threonine (T), Phenylalanine (F), Sérine (S), Glutamate (E), Lysine (K), Glutamine (Q), Méthionine (M), Arginine (R).

3.2. Le nouveau variant de la MCJ (*nv-MCJ*)

En Mars 1996, le gouvernement anglais annonçait que 10 patients étaient atteints d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob au Royaume-Uni (Will *et al.*, 1996). Depuis cette annonce, 111 cas en Grande Bretagne (Medley, 2001) et 4 cas en France ont été déclarés au 1^{er} Novembre 2001. Les analyses épidémiologiques évaluent entre 70 et 136000 le nombre de cas futurs (Ghani *et al.*, 2000). Plus récemment, en estimant l'âge des individus

contaminés comme étant un facteur important, le nombre de cas futurs a été évalué à 205 avec une limite maximale de 403 cas (Valleron *et al.*, 2001).

L'émergence de cette nouvelle maladie, au cœur de l'épidémie d'ESB, a soulevé la question d'une transmission de l'agent infectieux à partir de viande ou de dérivés de viande de bœuf contaminés (Will *et al.*, 1996). Outre les données épidémiologiques, les premiers arguments en faveur d'une contamination de l'homme par l'agent de l'ESB proviennent des travaux de Collinge *et al.*, (Collinge *et al.*, 1996). Les auteurs ont montré que le profil des glycoformes de la PrP^{Sc} est identique à celui retrouvé dans les cas d'ESB et différent de ceux obtenus à partir des cas de MCJ sporadiques ou iatrogènes (Collinge *et al.*, 1996).

La même année, Lasmezas *et al.*, ont réussi à transmettre par voie intracérébrale l'ESB à des macaques. La distribution histologique des lésions et la topologie des dépôts de PrP^{Sc} dans le cerveau de ces animaux sont semblables à celles observées dans le cerveau de patients atteints par le nvMCJ et différents de celles observées pour des macaques inoculés avec du cerveau issu de cas sporadiques de MCJ (Lasmezas *et al.*, 1996b). Par la suite, l'épreuve du typage de souche chez la souris a montré que les isolats présentant les mêmes profils lésionnels étaient identiques (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997a).

Les cas de nvMCJ diffèrent des formes sporadiques de la MCJ : les individus sont plus jeunes (en moyenne 28 ans, Figure. 3), la durée de développement de la maladie est plus longue (14 mois) et les modifications neuropathologiques sont caractéristiques et présentent des dépôts amyloïdes entourant des lésions spongieuses (plaques florides). La période d'incubation du nouveau variant est évaluée à 16,7 ans. Le diagnostic ante-mortem peut être facilité par la détection immunohistochimique de la PrP^{Sc} dans les amygdales des patients (Hill *et al.*, 1997a).

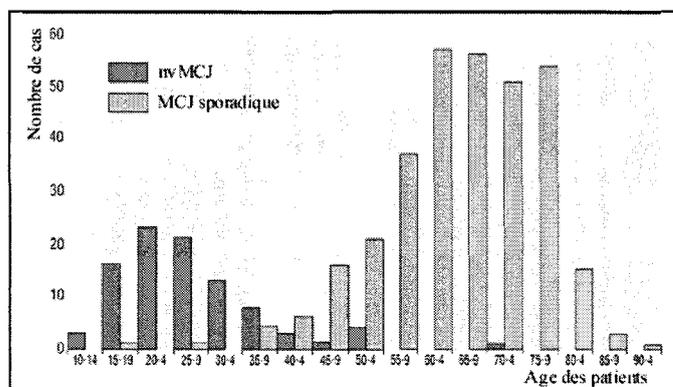


Figure 3 : Comparaison de la répartition des patients atteints de MCJ sporadique ou du nvMCJ

Les résultats sont donnés en fonction de l'âge des patients au Royaume Uni entre 1994 et 2000 d'après Brown (Brown, *et al.* 2001b)

3.3. Le Kuru

Alors que la MCJ a été décrite vers 1920, le Kuru (Alpers & Gajdusek, 1965; Gajdusek, 1967; Zigas, 1970) fut la première encéphalopathie spongiforme humaine dont le caractère transmissible ait pu être démontré (Gajdusek *et al.*, 1966). Au moment de sa description, il s'agissait d'une maladie récente (aucun cas n'était connu avant 1930) au sein d'une peuplade isolée des Fore en Papouasie Nouvelle-Guinée. Cette maladie affectait principalement des enfants des deux sexes et chez les adultes deux fois plus de femmes que d'hommes. Les études épidémiologiques ont permis de mettre en rapport la diffusion de la maladie avec les rites cannibales funéraires. La transmission de la maladie s'effectuait probablement par l'ingestion de cerveaux ou de viscères des défunts. L'arrêt des pratiques cannibales a permis la disparition du Kuru dans les années 1990. L'incidence de cette maladie atteignait jusqu'à 10% de la population dans certaines tribus.

Touchant des individus de 4 à 60 ans, la période d'incubation moyenne du Kuru est estimée entre 12 et 20 ans pouvant parfois aller jusqu'à 30 ans. Après l'apparition des premiers signes cliniques, la maladie évolue vers la mort en un an. L'examen neuropathologique révèle des plaques amyloïdes unicentriques cérébelleuses dans 75% des cas. Les modifications spongiformes observées sont similaires à celles retrouvées dans les cas de MCJ sporadiques.

3.4. Le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS)

Cette maladie a été décrite pour la première fois dans une famille autrichienne en 1936. Elle présente une incidence qui varie entre 1 cas pour 10 à 100 millions d'habitants par an. L'âge d'apparition, plus variable que dans la MCJ, est compris entre 30 et 40 ans. La maladie peut ensuite durer plus de 4 ans. Cette maladie chronique familiale très rare qui se transmet sur le mode autosomique dominant, est étroitement liée à des mutations du gène codant pour la PrP humaine notamment aux mutations sur les codons 102 (P102L), 105 (P105L), 117 (A117V), 145 (Y145Stop), 198 (F198S) et 217 (Q217R).

Sur le plan neuropathologique, il s'agit d'une dégénérescence spino-cérébelleuse dont le critère de diagnostic constant est la présence de plaques amyloïdes multicentriques dans le cortex cérébelleux et le tronc cérébral. Ces plaques sont plus rarement présentes dans le cortex cérébral. Des modifications spongiformes sont parfois retrouvées dans le cortex cérébral de certains patients.

3.5. L'insomnie fatale Familiale (IFF)

Décrite pour la première fois en 1986, cette maladie est devenue la troisième forme de d'ESST humaine héréditaire (Medori *et al.*, 1992). Jusqu'à présent, 23 familles et trois cas isolés ont été décrits. Elle est liée à une mutation du gène codant pour la PrP humaine au codon 178 (D178N) (Medori *et al.*, 1992). Cette même mutation est également associée à des cas de MCJ présentant des signes cliniques et pathologiques très différents. L'étude de cette particularité a permis de montrer que l'expression d'une MCJ familiale ou d'une IFF dépendait du polymorphisme présent au codon 129 (M129V) (Gambetti, 1996) (voir Polymorphisme et mutations du gène *prp* page 45 et Figure 7 page 47).

Pour l'IFF, l'âge moyen des patients est de 49 ans. Le décès survient en moyenne 13 mois après l'apparition des premiers signes cliniques. Les lésions anatomiques sont limitées aux noyaux ventro-médians et postérieurs du thalamus avec raréfaction neuronale et astrocytose, sans spongiose.

3.6. Phénocopies de la Maladie de Huntington (PMH)

Cette nouvelle forme a été décrite très récemment (Moore *et al.*, 2001). De nombreuses études ont montré que l'allongement des séquences répétées (CAG)_n dans le gène codant pour la protéine huntingtin est un marqueur spécifique de la maladie de Huntington (Kremer *et al.*, 1994). Toutefois, il existe de nombreux cas de Huntington ne présentant pas ces extensions de domaines (CAG)_n (Andrew *et al.*, 1994). La recherche d'autres gènes impliqués dans ces PMH a mis en évidence chez 4 patients issus d'une même famille, une mutation dans le gène *prp*. Les auteurs ont ainsi caractérisé une insertion de 192 nucléotides dans la région codante du gène qui correspondent à l'ajout de 8 séquences répétées de 8 acides aminés (Figure. 2). Le polymorphisme du codon 129 associé à ces mutations est une méthionine. Tous les patients atteints présentent une hétérozygotie pour ces insertions. Ces maladies, qui se transmettent par un mécanisme autosomique dominant, sont caractérisées par un âge moyen de 23 à 41 ans, avec une médiane à 29,7 ans.

4. L'hypothèse du prion

4.1. Les hypothèses en faveur de la théorie du prion : Historique de la découverte.

La résistance de l'agent responsable de la tremblante (Dickinson & Taylor, 1978) aux procédés habituels d'inactivation des agents pathogènes posa rapidement la question de la nature de l'agent infectieux. En effet, pour réduire de façon significative le pouvoir infectieux d'un échantillon, il faut le traiter par autoclavage 18 minutes à 136°C (Kimberlin *et al.*, 1983b; Brown *et al.*, 1990b)), par la Soude 1N (Brown *et al.*, 1984; Tateishi *et al.*, 1988), ou par l'hypochlorite de sodium 2.5% pendant une heure à 20°C (Kimberlin *et al.*, 1983b; Brown *et al.*, 1986). L'application par Tikvah Alper de rayonnements ionisants pour mesurer la taille de l'agent responsable de la maladie (Alper *et al.*, 1966; Alper *et al.*, 1967; Latarjet *et al.*, 1970) montra de manière surprenante que l'agent infectieux était beaucoup plus petit qu'aucun virus connus.

Les premières expériences entreprises afin de purifier l'agent responsable de la tremblante furent un échec. En effet, les délais très importants des études sur le mouton avaient grandement limité le nombre d'échantillons qui pouvaient être étudiés. Toutefois, la transmission expérimentale de la tremblante à la souris a permis l'obtention d'un plus grand nombre d'échantillons et le développement de courbes de titration standard liant la durée de la période d'incubation à la dose infectieuse (Prusiner *et al.*, 1982b). Chez le Hamster, la transmission de la tremblante à partir d'un inoculum préalablement injecté au rat, a permis le développement de la maladie en 70 jours (Marsh & Kimberlin, 1975). Ces avancées méthodologiques ont ainsi rendu possible le développement de protocoles d'enrichissement des échantillons (Prusiner, 1982; Prusiner *et al.*, 1982a).

A partir de ces échantillons hautement infectieux, les propriétés physico-chimiques de l'agent infectieux impliqué dans les ESSTs ont été recherchées. Tout d'abord, T. Alper irradiia des extraits cérébraux avec des rayons ultraviolets dont la longueur d'onde (254nm) est très proche du pic spécifique d'absorption des acides nucléiques. Elle constata que l'agent de la tremblante n'était pas éliminé à des doses qui détruiraient n'importe quel virus. Il a ensuite été montré que le pouvoir infectieux d'un échantillon est résistant à la digestion par des nucléases (Prusiner *et al.*, 1980a; Prusiner *et al.*, 1980c).

Pourtant, l'existence de différentes souches de tremblante laissait suggérer la présence d'une information génétique codée par un acide nucléique (Kingsbury *et al.*, 1983). Les données obtenues précédemment montraient que s'il ne pouvait pas exister de grands fragments d'acides nucléiques dans les fractions purifiées de l'agent infectieux, de petits oligonucléotides de moins de 50pb pouvaient être trouvés dans ces préparations (Kellings *et al.*, 1992). Toutefois, le clonage de ces résidus d'ADN et d'ARN n'a pas permis l'identification d'un acide nucléique spécifique de la tremblante.

A l'inverse, l'inactivation de l'infectiosité pouvait être obtenue par la digestion totale à la protéinase K des échantillons. Ces derniers, même enrichis et fortement infectieux, présentaient après traitement une perte du pouvoir infectieux allant jusqu'à 99,9%. D'autres réactifs connus pour altérer les protéines comme le Diéthyl Pyrocarbonate (McKinley *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1981a), le Sodium Dodécyl Sulfate, le Thiocyanate de Guanidium 1M (Prusiner *et al.*, 1980b; Prusiner *et al.*, 1981a), l'Urée 6M (Hunter *et al.*, 1969), ou le Phénol (Hunter & Millson, 1967) sont également capables de diminuer significativement le titre infectieux des échantillons.

La recherche d'une protéine responsable de la tremblante s'est alors intensifiée. En 1981, les fibrilles associées à la tremblante (Scrapie Associated Fibrils : SAF) furent identifiées dans des extraits de cerveaux infectés traités par des détergents et par la protéinase K (PK). En 1982, Bolton *et al.*, ont extrait une protéine à partir de fractions de l'agent infectieux fortement purifiées de cerveaux de hamsters inoculés par la tremblante (Bolton *et al.*, 1982). Elle présentait une masse moléculaire apparente de 27-30kDa et était résistante partiellement à une digestion par la Protéinase K. La concentration de cette protéine était proportionnelle au titre infectieux. De même, la cinétique de dégradation de la PrP²⁷⁻³⁰ était équivalente à celle de la baisse de l'infectiosité. Enfin, les anticorps dirigés contre la PrP²⁷⁻³⁰ marquaient les plaques amyloïdes dans des coupes de cerveaux infectés (Bendheim *et al.*, 1984; DeArmond *et al.*, 1985). Par la suite, la déduction de la séquence protéique et les études par immunoblot (Meyer *et al.*, 1986) ont révélé que la PrP²⁷⁻³⁰ était le produit d'une hydrolyse partielle lors de la procédure de purification. Elle dérivait, par élimination des 60 acides aminés N-terminaux, d'une protéine de 33-35kDa: la PrP^{Sc} (Meyer *et al.*, 1986).

S. B. Prusiner définit ainsi les Prions (Prusiner, 1982) (terme dérivé de "*proteinaceous infectious particle*") comme une particule infectieuse protéique qui résiste à l'inactivation par les procédures qui modifient les acides nucléiques. Actuellement, cette définition a évolué vers : "Le prion est une particule protéique infectieuse en l'absence de tout acide nucléique".

4.2. La PrP^c

Oesch *et al.*, ont cloné (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985) l'ADNc codant pour la PrP²⁷⁻³⁰, à partir de cerveau de hamsters infectés. Les auteurs ont ensuite montré que le transcrite codant pour la PrP est présent en quantité identique dans des cerveaux issus d'animaux infectés ou sains (Oesch *et al.*, 1985) et qu'il est codé par le génome de l'hôte et non par un génome exogène. Des anticorps dirigés contre la PrP²⁷⁻³⁰ ont révélé la présence de molécules de PrP de 33-35kDa dans les homogénats de cerveaux sains. Par contre, un traitement à la protéinase K a éliminé totalement l'immunoréactivité des échantillons non infectés. Cette protéine PrP, sensible aux protéases et retrouvée dans les tissus sains, fut appelée PrP cellulaire (PrP^c). Cette protéine présente des propriétés différentes de son homologue infectieux. Par exemple, la PrP^c est soluble dans les détergents tandis que la PrP^{Sc} est insoluble par les mêmes traitements et forme des agrégats amyloïdes (Meyer *et al.*, 1986). Une comparaison des différences de propriétés est résumée dans le tableau 1.

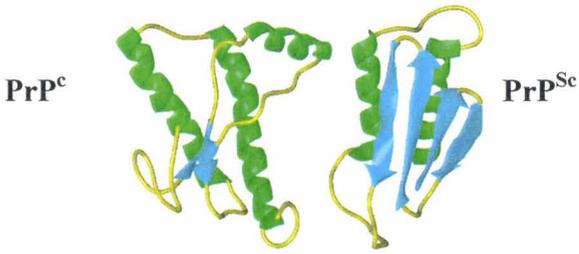
	Normale	Anormale
Nom	PrP ^c	PrP ^{Sc}
Sensibilité à la PK	Sensible	Partiellement résistante
Solubilité dans les détergents	Soluble	Insoluble
Taille	≅250 acides aminés	≅250 acides aminés
Glycosylation	Deux sites	Deux sites
Poids moléculaire avant PK	33-35 kDa	33-35 kDa
Poids moléculaire après PK	dégradée	27-30 kDa
Antigénicité	Accrochage des mêmes anticorps	
Localisation	Surface cellulaire par ancre GPI	Dépôts intracellulaires
Expression durant la maladie	Niveau constant	Niveau en augmentation
Recyclage	Rapide	Lent
Association avec l'infectiosité	Pas de copurification	Copurification
Structure	Hélice alpha majoritaire	Feuillets plissés Bêta
Représentation		

Tableau 1 : Comparaison des propriétés observées entre la PrP^c et la PrP^{Sc} .d'après Hunter (Hunter, 1997)

4.2.1. Modifications post-traductionnelles de la PrP^c

La PrP^c a une demi-vie de trois à six heures en culture cellulaire. Cette synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER). L'alignement des séquences protéiques de différentes espèces montre l'insertion ou la délétion de certains codons entraînant une légère variation du nombre d'acides aminés de la protéine native : 253 chez l'homme, 254 chez la souris et le Hamster, 256 chez le mouton et 269 chez le bovin.

Au niveau de l'appareil de Golgi, la PrP native subit plusieurs modifications post-traductionnelles. Tout d'abord le peptide signal (comprenant les acides aminés de 1 à 22) est clivé en N terminal. Puis, des groupements glycosydiques sont ajoutés au niveau de deux sites de N-glycosylation sur des asparagines (N180 et N196 chez l'homme, et N181 et N197 chez la souris (Walmsley *et al.*, 2001). Les chaînes oligosaccharidiques ajoutées au départ dans le RER sont riches en mannose et sont sensibles à une digestion par l'endoglycosidase H; elles sont ensuite modifiées dans l'appareil de Golgi pour aboutir à des chaînes de type complexe qui contiennent de l'acide sialique et qui sont résistantes à la digestion par l'endoglycosidase H (Caughey *et al.*, 1989). Ensuite, les ponts disulfures se forment pour créer une boucle contenant les asparagines glycosylées.

Enfin, 23 acides aminés sont clivés en C-terminal et une ancre glycosyl-phosphatidy-inositol (GPI) est ajoutée dans le RER. Elle a une structure similaire à celle décrite pour d'autres ancres GPI: un résidu éthanol-amine est fixé à une fonction amide de l'acide aminé placé en C-terminal, trois résidus mannose, un résidu glucosamine non acétylé, et une molécule phosphatidyl inositol. Toutefois, l'ancre de la PrP^c est inhabituelle car elle est modifiée par l'ajout de résidus d'acide sialique. Cette ancre GPI permet ensuite la fixation de la protéine sur la membrane cellulaire (Stahl *et al.*, 1992).

Les altérations de la N-glycosylation peuvent modifier le transport de la PrP^c. La mutation des deux sites de N-glycosylation dans la PrP de rongeur ou du site le plus N-terminal conduit à un mauvais repliement de la protéine et à son accumulation (Rogers *et al.*, 1990; Lehmann & Harris, 1997). La mutation du site de glycosylation en C-terminale ou la synthèse de PrP^c en présence d'un inhibiteur de la glycosylation comme la tunicamycine conduit malgré tout à l'expression d'une certaine quantité de PrP^c à la surface cellulaire (Caughey *et al.*, 1989; Lehmann & Harris, 1997).

A l'issu de ces modifications, la PrP^c est une protéine d'environ 210 acides aminés.

Cette protéine peut alors subir deux types de clivages post-traductionnels. Le premier a lieu dans l'ancre GPI et libère la chaîne polypeptidique dans le milieu extracellulaire (Horiuchi & Caughey, 1999). La localisation cellulaire de ce clivage n'est pas connue. Toutefois, les résultats obtenus à partir d'autres protéines à ancre GPI suggèrent l'implication d'une phospholipase présente à la surface cellulaire. Le second clivage subit par la PrP^c est protéolytique et a lieu dans un segment de 16 acides aminés hydrophobes conservé entre les PrP de différentes espèces. Ce clivage aurait lieu dans un compartiment endocytotique dans les domaines membranaires, riches en cholestérol (RAFT) (Borchelt *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1993a; Taraboulos *et al.*, 1995).

Après avoir été exposée à la surface de la cellule, la PrP^c est reinternalisée, selon une voie probablement dépendante des *caveolae*. A la suite de cette réinternalisation, la PrP^c est soit catabolisée par endocytose et dégradée dans les lysosomes (Harris *et al.*, 1993a) soit recyclée à la surface de la cellule.

4.2.2. Rôle de la PrP^c

Malgré de nombreux travaux, la fonction précise de cette protéine n'a toujours pas été identifiée. Des souris transgéniques dont le gène codant pour la protéine PrP a été inactivé (PrP^{0/0}) par l'insertion d'une cassette *neo* dans le cadre ouvert de lecture (ORF), ont un phénotype globalement normal (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994a). Des études électrophysiologiques sur des coupes d'hippocampe de souris PrP^{0/0} ont toutefois montré une altération de la transmission synaptique GABAergique et une diminution de la potentialisation à long terme (Collinge *et al.*, 1994; Manson *et al.*, 1994a) laissant supposer un rôle de la PrP^c dans la transmission synaptique. Par la suite, une altération du rythme veille/sommeil (Tobler *et al.*, 1996; Tobler *et al.*, 1997) et des modifications au niveau de l'apprentissage et de la mémoire (Nishida *et al.*, 1997) ont été décrites sur ces mêmes modèles de souris. Sakaguchi *et al.*, (Sakaguchi *et al.*, 1996) ont construit une lignée de souris PrP^{0/0} par délétion d'une séquence de 2,1kb comprenant l'ORF complet du gène *prp*, une partie de l'intron 2, du domaine 5' non traduit (NTR) et de la région 3' NTR. Lors du vieillissement, ces souris présentaient un syndrome cérébelleux dû à une dégénérescence des cellules de Purkinje. L'analyse fine de ces animaux a montré que cette anomalie ne résultait pas de l'absence d'activité du gène *prnp* mais de l'expression par épissage intergénique du gène *Dopple* (*prnd*) situé en aval du gène *prnp*. Ce gène code pour une protéine qui présente une structure proche de la PrP^c (Moore *et al.*, 1999) et dont le rôle dans la physiopathogenèse n'est pas connue.

La localisation de la PrP^c à la surface de la cellule évoque à l'instar des protéines d'adhésion cellulaire (CAM) un rôle possible dans le développement et le maintien de l'architecture complexe du système nerveux. La production, par des lignées cellulaires établies à partir de cerveaux infectés, de facteurs augmentant la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) et la gliose qui accompagne la neuropathologie des ESSTs sont en faveur d'une intervention de la PrP^c dans la prolifération des cellules gliales.

Des neurones ou des astrocytes dérivés de souris PrP^{0/0} ont été caractérisés: ils présentent une diminution de réponse aux stress oxydants (en présence de cuivre ou de peroxyde d'hydrogène) (Brown *et al.*, 1997a; Herms *et al.*, 1999) et une diminution de la viabilité en l'absence de sérum dans le milieu (Kuwahara *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que la PrP^c pourrait être impliquée dans la protection des cellules aux atteintes environnementales (Kretzschmar *et al.*, 2000; Brown, 2001a).

Les études structurales et fonctionnelles de la PrP^c ont montré que cette protéine est capable de fixer 5 atomes de cuivre dans sa partie N terminale au niveau des domaines répétés de huit acides aminés (Hornshaw *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997a). Les études *in vitro* et *in vivo* dérivées de souris PrP^{0/0} ou de souris sauvages ont mis en évidence que le cuivre était moins bien incorporé en l'absence de la PrP^c. De même, l'exposition de cellules exprimant la PrP^c à des doses croissantes de cuivre provoque une augmentation de la reinternalisation de cette protéine (Pauly & Harris, 1998). Ces données suggèrent un rôle de récepteur extracellulaire du cuivre pour la PrP^c. Ces données associées à l'étude du trafic intracellulaire de la PrP^c supportent l'hypothèse selon laquelle la PrP^c interviendrait dans l'homéostasie du cuivre.

Ainsi, les neurones dépourvus de PrP^c sont plus sensibles aux stress oxydants mais également plus sensibles à la toxicité du cuivre (Brown *et al.*, 1998). La réponse aux stress oxydants et à la toxicité du cuivre peuvent être liés. En effet, le cuivre peut catalyser l'interconversion de radicaux d'oxygène libres ou générer les radicaux hydroxyl directement à partir de l'eau. Des molécules de PrP^c recombinantes capables de fixer deux atomes de cuivre ont mis en évidence que cette protéine contribuait directement à l'activité superoxyde dismutase (SOD) des cellules (Hornshaw *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997a; Brown *et al.*, 1997c).

Finalement, les travaux réalisés à partir de cellules microgliales ont montré qu'un peptide dérivé de la PrP (la PrP106-126) induirait la production de radicaux d'oxygène toxiques pour les neurones (Brown *et al.*, 1996). D'autre part, cette fraction protéique diminuerait la résistance des neurones aux stress oxydatifs en agissant sur les superoxydes dismutases Zinc/Cuivre (SOD Zn/Cu) (Brown *et al.*, 1997c).

Le groupe d'Odile Kerlerman a mis quant à lui en évidence un rôle de la PrP^c dans la transmission des signaux externes au niveau des neurones (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). La PrP agirait alors en coopération avec des molécules transductrices de signaux comme la tyrosine kinase Fyn. Les récents travaux de Spielhauer (Spielhauer & Schatzl, 2001) ont également montré l'interaction de la PrP^c avec deux molécules de signalisation dans les neurones: la Synapsin I et Grb2. Les travaux de l'équipe de Weiss (Rieger *et al.*, 1997; Gauczynski *et al.*, 2001; Hundt *et al.*, 2001) ont permis de caractériser le récepteur de la laminine (LR) et son précurseur (LRP) comme un récepteur de la PrP^c à la surface des cellules. L'interaction entre la PrP et le récepteur de la laminine interviendrait dans la signalisation impliquée pour la survie cellulaire. Les auteurs ont également proposé qu'un récepteur LRP/LR d'une cellule puisse fixer la PrP^c d'une autre cellule et ainsi contribuer à la communication intercellulaire. Cette interaction, à l'image du récepteur du facteur de croissance des fibroblastes, fait intervenir les héparanes sulphates protéoglycanes comme co-récepteur (Figure. 4).

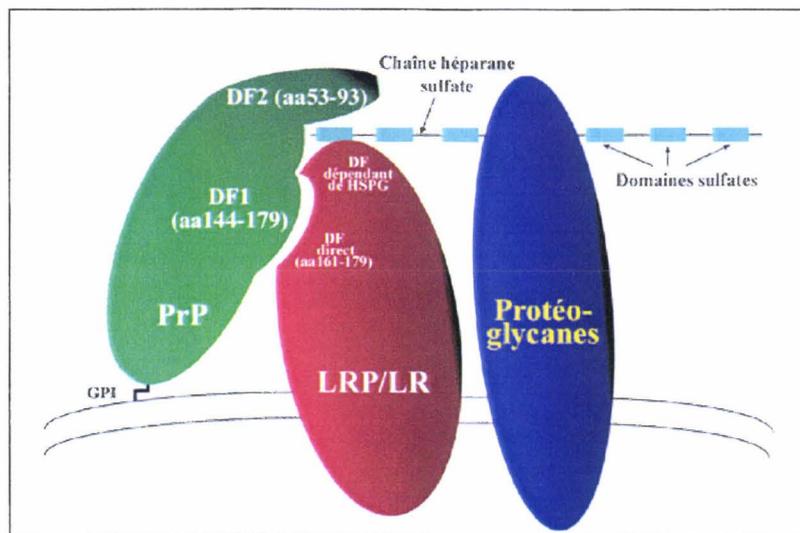


Figure 4 : Modèle de fonctionnement de la LRP/LR en tant que récepteur de la PrP^c.

La PrP s'accroche au LRP/LR *via* ses domaines de fixation (DF) DF1 (aa 144-179) et DF2 (aa 53-93). Ce second domaine de fixation dépend de la présence d'une extension héparane sulphate venant d'une protéoglycane héparane sulphate (HSPG). La présence simultanée des deux domaines de fixation DF1 et DF2 stabiliserait considérablement l'accrochage de la PrP à son récepteur. La fixation directe du LRP/LR à la PrP^c a lieu *via* un site d'accrochage direct situé entre les aa 161-179 du LRP/LR. Le domaine indirect de fixation nécessitant l'interaction avec une HSPG serait situé entre les aa 101-160 ou entre les aa 180-285 (Hundt *et al.*, 2001).

4.3. La transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc}

La PrP^c et la PrP^{Sc} sont codées par le même gène. La détermination de la structure de ce gène a montré que la totalité du cadre ouvert de lecture est contenue dans le dernier exon. Cette donnée a permis d'éliminer l'hypothèse selon laquelle les deux protéines sont issues d'un épissage alternatif. Prusiner a donc reconsidéré une hypothèse émise en 1967 suggérant que les deux isoformes ne différeraient que par leur conformation (Griffith, 1967; Prusiner, 1982). En effet, aucune modification post-traductionnelle n'a pu jusqu'à présent être proposée pour expliquer les propriétés différentes de la PrP^c et de la PrP^{Sc} (Stahl *et al.*, 1993).

4.3.1. Transition d'hélices alpha en feuillets plissés Bêta

L'analyse par spectroscopie infra-rouge et les données de dichroïsme circulaire ont montré que la PrP^c comprend 40% d'hélices alpha (α) et peu de feuillets plissés bêta (β). A l'inverse, la PrP^{Sc} comprend une majorité de feuillets plissés β (45%) et seulement 30% d'hélices α (Pan *et al.*, 1993; Pergami *et al.*, 1996). Les points de mutation du gène *prp* associés aux ESSTs familiales se situent au sein ou à proximité de domaines impliqués dans la structure secondaire de la PrP^c. Ces mutations pourraient ainsi déstabiliser la conformation de la PrP^c (Huang *et al.*, 1994; Riek *et al.*, 1996).

Sous certaines conditions de détergents et de protéolyse ménagée, la PrP^{Sc} peut se polymériser *in vitro* en agrégats ou en fibrilles (McKinley *et al.*, 1991a) présentant les propriétés caractéristiques des fibres amyloïdes. En effet, ils fixent le rouge Congo et présentent une biréfringence verte sous lumière polarisée. La modélisation structurale de la PrP^c prévoit une structure secondaire avec 4 hélices α (Huang *et al.*, 1994). Les peptides correspondant à ces quatre régions pour la protéine PrP de hamster ont été synthétisés. Trois des quatre domaines (109-122, 178-191 et 202-218) ont formé spontanément des structures amyloïdes (Gasset *et al.*, 1992) caractérisées par un grand nombre de feuillets plissés β .

Ces résultats suggèrent que la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} impliquerait la transition d'une ou plusieurs hélices α en feuillets plissés β .

4.3.2. Localisation cellulaire de la transconformation

Les auteurs s'accordent aujourd'hui sur le fait que la transformation de la PrP^c en PrP^{Sc} s'effectue au cours des processus qui conduisent à la réinternalisation de la PrP (Borchelt *et al.*, 1992). En effet, le blocage de la synthèse ou de la réinternalisation (par coupure de l'ancre GPI par exemple) conduit à un arrêt de l'accumulation de la PrP^{Sc} dans les cellules chroniquement infectées. Actuellement deux modèles de transition sont proposés:

4.3.3. Modèle catalytique ou de repliement

Ce modèle postule qu'un nombre relativement faible de PrP^c et de PrP^{Sc} s'oligomérisent probablement avec l'aide d'une protéine chaperonne (Huang *et al.*, 1996). La PrP^{Sc} servirait de catalyseur ou de matrice pour imprimer sa conformation sur la PrP^c ou sur un composé intermédiaire partiellement converti appelé PrP*. Dans ce cas, la barrière cinétique entre la PrP^c et la PrP^{Sc} est surmontée par l'action catalytique de la PrP^{Sc}, probablement en coordination avec une molécule chaperonne (Figure. 5A).

4.3.4. Modèle de nucléation-polymérisation

Le modèle de polymérisation nucléaire propose que la PrP^c soit en état d'équilibre avec la PrP^{Sc}. La conversion spontanée de monomères de PrP^c en PrP^{Sc} serait stabilisée par l'addition de ce monomère à l'extrémité d'un polymère de PrP^{Sc} déjà existant appelé noyau (Come *et al.*, 1993; Gajdusek, 1994; Caughey *et al.*, 1997; Harper & Lansbury, 1997). Ce processus est similaire à celui de l'actine ou de la tubuline (Figure. 5B).

Ces deux modèles qui ne sont pas mutuellement exclusifs peuvent s'appliquer pour les formes familiales tout comme pour les formes infectieuses des maladies à prions, puisqu'une mutation pathogène pourrait favoriser la formation spontanée des noyaux de PrP^{Sc} ou la PrP*.

La simple dimérisation ne suffirait pas à la transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc}. Un facteur complémentaire, appelé le facteur X serait donc nécessaire pour assurer la transconformation après la dimérisation. La nature du facteur X n'est pas connue, mais son caractère de protéine chaperonne a été proposé (Telling *et al.*, 1995).

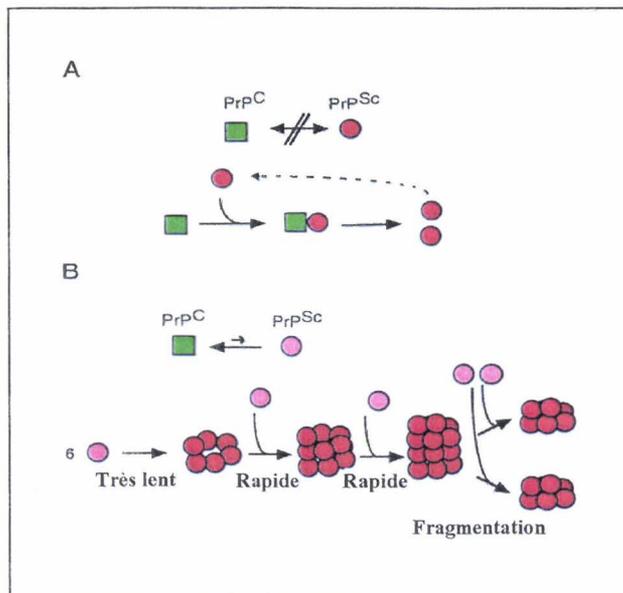


Figure 5 . Modèles de conversion de la PrP^c en PrP^{Sc}

(A). Le modèle de repliement. Le changement conformationnel est cinétiquement contrôlé. Une haute barrière énergétique empêche la conversion spontanée à des taux détectables. L'interaction avec des molécules de PrP^{Sc} exogènes provoque la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc}. Cette réaction nécessite un dépliement et un repliement de la protéine assistée par des molécules chaperonnes pour expliquer la forte barrière énergétique. Dans ce cas, les mutations du gène *prp* pourraient conduire à la conversion rare et spontanée en PrP^{Sc}.

(B) la modèle de la matrice. La PrP^c et la PrP^{Sc} sont en équilibre fortement en faveur de la PrP^c. La PrP^{Sc} est stabilisée quand un cristal ou un agrégat de PrP^{Sc} est ajouté. La formation de ces grains de PrP^{Sc} est un phénomène rare mais quand une de ces matrices est présente, l'addition des monomères de PrP^{Sc} néoformés est rapide. Pour expliquer le taux de conversion exponentielle, il faut considérer que ces agrégats sont continuellement fragmentés pour présenter une surface d'accrétion augmentées (Weissmann, 1999).

5. Les souches de prions

5.1. Description

La transmission de l'agent infectieux d'un animal à un autre fait apparaître un profil phénotypique spécifique et constant (temps d'incubation, profil lésionnel, tropisme de l'agent pour certains types cellulaires intra et extracérébraux et propriétés physico-chimiques (Mabbott *et al.*, 2000)). Ces propriétés définissent la notion de souche dans les maladies à prions. Plus de vingt souches de tremblante ont été identifiées chez la souris. Chez le vison, deux souches distinctes ont été caractérisées (Bessen & Marsh, 1992b).

Ces caractéristiques de l'agent infectieux pourraient être facilement expliquées par la présence d'un acide nucléique spécifique. La notion de souche serait alors le résultat d'un polymorphisme au sein de ce matériel génétique. Seulement aucun acide nucléique n'a jusqu'à présent pu être identifié. Etant donné que plusieurs souches de prions peuvent être maintenues dans la même lignée de souris, la structure primaire de la PrP endogène ne doit pas contribuer

à supporter les propriétés spécifiques des souches. Il a alors été postulé que les différentes souches sont caractérisées par différents conformères de la PrP^{Sc}. Chacun d'entre eux est alors capable d'imprimer sa propre structure tridimensionnelle à la PrP^c de l'hôte.

5.2. Profil de souche

Pour définir les souches d'ESST, les auteurs utilisent plusieurs lignées de souris incluant différents polymorphismes du gène *prnp* (voir le chapitre : Polymorphisme du gène *prnp*). Les souches de prions diffèrent par le temps d'incubation dans les différentes lignées de souris. Les atteintes neuropathologiques sont mesurées de manière semi-quantitative en mettant un indice de vacuolisation dans 9 régions cérébrales définies. Cette signature est reproductible et caractéristique de chaque souche (Bruce *et al.*, 1994). C'est ainsi que les chercheurs ont pu montrer que les souches de l'ESB prélevées chez les bovins et celles de patients atteints par le nvMCJ présentaient des profils lésionnels identiques, démontrant le passage de l'agent du bovin à l'homme (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997a; Bruce, 2000).

Une deuxième méthode d'identification des souches a apporté les premiers arguments visant à montrer que la spécificité de souche est contenue dans la structure de la PrP^{Sc}. Bessen *et al.*, (Bessen & Marsh, 1992a; Bessen & Marsh, 1994) ont montré un profil de mobilité électrophorétique de PrP^{Sc} différent entre les deux souches de prion de vison. Collinge *et al.*, ont montré que ces profils étaient le reflet de la combinaison des glycoformes et qu'ils sont maintenus à travers les transmissions successives à la souris (Collinge *et al.*, 1996).

Enfin, partant du principe que l'information relative à la souche est fonction du repliement particulier de la PrP^{Sc} (Safar *et al.*, 1998), il a été montré que la fixation d'anticorps anti-PrP sur des protéines natives ou dénaturées varie en fonction de la souche de prion étudiée.

6. La barrière d'espèce

L'existence d'une barrière inter-espèce a été mise en évidence quand l'agent infectieux d'une espèce a été transmis expérimentalement à une autre espèce. Il s'agit d'un processus stochastique lent et inefficace, caractérisé par une augmentation du temps d'incubation de la maladie quand l'agent est inoculé à une espèce hétérologue (Gajdusek *et al.*, 1966; Pattison & Jones, 1968a). La PrP^{Sc} synthétisée *de novo* reflète la séquence du gène *prp* de l'hôte et non celle des molécules de PrP^{Sc} présentes dans l'inoculum. (Bockman & Kingsbury, 1988). De plus, lors du passage suivant dans un hôte homologue, le temps d'incubation est réduit à une

durée caractéristique de l'espèce et devient constant pour les passages suivants. La transmission devient alors un processus non stochastique.

Les expériences effectuées par Prusiner *et al.*, (Prusiner *et al.*, 1990) à l'aide de souris transgéniques pour le gène *prp* de hamster ont montré que le gène *prp* semble jouer un rôle important dans la barrière inter-espèces. L'inoculation par voie intra-cérébrale de l'agent infectieux isolé du hamster, à ces souris transgéniques, entraîne le développement de la maladie en 75 jours alors que la même injection à une souris non transgénique ne provoque la maladie qu'au bout de 700 jours et dans quelques cas seulement. De plus, le temps de latence après infection des souris transgéniques est inversement proportionnel au nombre de copies du gène *prp* de hamster et de son taux d'expression dans la souris. L'agent produit alors est infectieux pour le hamster comme l'était l'isolat de départ, et les profils lésionnels observés correspondent aux mêmes profils que ceux des souches utilisées initialement pour l'inoculation.

Au niveau moléculaire, cette barrière serait due à des différences dans la structure tridimensionnelle entre la PrP de l'hôte et la PrP de l'inoculum. Les protéines PrP de souris (mPrP), de hamster (haPrP), d'humain (hPrP) et de bovin (bPrP) ont été analysées et sont très conservées au niveau de leur repliement global. De manière générale, la protéine PrP présente une fraction N-terminale non-structurée de 100 acides aminés et un domaine globulaire en C terminal. Le domaine globulaire se caractérise par trois hélices alpha et deux feuillets plissés bêta. Toutefois, la superposition de ces structures en C-terminal a montré des différences entre les espèces, au sein de la première hélice α et à la fin de la troisième hélice α , ainsi qu'à proximité de la boucle formée par les résidus 166 à 172 (Riek *et al.*, 1996; Billeter *et al.*, 1997). En accord avec l'hypothèse protéique seule, la barrière d'espèce serait ainsi liée directement au niveau d'homologie de structure entre les différentes protéines prion (Hôte/Inoculum).

7. Les autres hypothèses

Les hypothèses virologiques classiques (Virus / Retrovirus) sont essentiellement soutenues par la grande variabilité biologique des souches de prions identifiées à ce jour.

7.1. L'hypothèse du virus conventionnel

Elle a peu de défenseurs aujourd'hui. En effet, l'importance des titres infectieux mesurés dans les cerveaux des animaux atteints est en contradiction avec l'absence d'identification du virus en microscopie électronique. Toutefois, il faut rappeler que l'identification du virus de l'hépatite C a nécessité plus de 10 ans, malgré la présence de titres infectieux parfois important chez les sujets atteints. De plus, l'absence de réponse immune et de signes biologiques de virose chronique (hypergammaglobulinémie, syndrome inflammatoire) ainsi que l'insensibilité des fractions infectieuses aux traitements dénaturant les acides nucléiques n'est pas en faveur de cette hypothèse.

7.2. L'hypothèse rétrovirale

Cette hypothèse (Manuelidis *et al.*, 1988) a été avancée en raison de la potentialité de certains rétrovirus neurotropes à induire des modifications membranaires sans réponse inflammatoire (Figure 6). C'est notamment le cas de la polioencéphalite spongiforme liée au cycle de réplication abortif du rétrovirus Cas-BrE dans les motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et de certaines zones du cerveau. Par ailleurs, des séquences d'acides aminés potentiellement rétrovirales ont été mises en évidence dans les fractions infectieuses du cerveau de patients atteints de MCJ (Manuelidis *et al.*, 1995). Ces données restent toutefois préliminaires et nécessitent d'être confirmées.

7.3. Les hypothèses mixtes

Le virino (Kimberlin, 1982), est une particule infectieuse pouvant se répliquer activement ou passivement (Figure. 6). Il serait constitué d'une information génétique propre entourée de molécules protéolipidiques appartenant à l'hôte et de la molécule PrP^{Sc} dérivée de l'hôte. Cette hypothèse permet d'expliquer la variabilité des souches intrinsèques et les mutations familiales. Elle implique la présence d'une molécule support de l'information génétique, et dont on ne connaît pas encore la nature. Charles Weissmann (Weissmann, 1991; Weissmann *et al.*, 1993) a actualisé la notion de Virino et proposé le concept d'holoprion. Un holoprion est un élément infectieux composé de PrP^{Sc} ou apoprion, à l'origine des phénomènes neuropathologiques, et d'un acide nucléique ou coprion, support du pouvoir infectieux et de la diversité des souches. Le coprion pourrait être d'origine étrangère ou être sous la dépendance du génome de l'hôte. La réplication de l'holoprion serait sous la dépendance d'un double

mécanisme : l'acide nucléique serait polymérisé grâce à la machinerie cellulaire et la PrP^{Sc} proviendrait de l'interaction PrP^c/PrP^{Sc}.

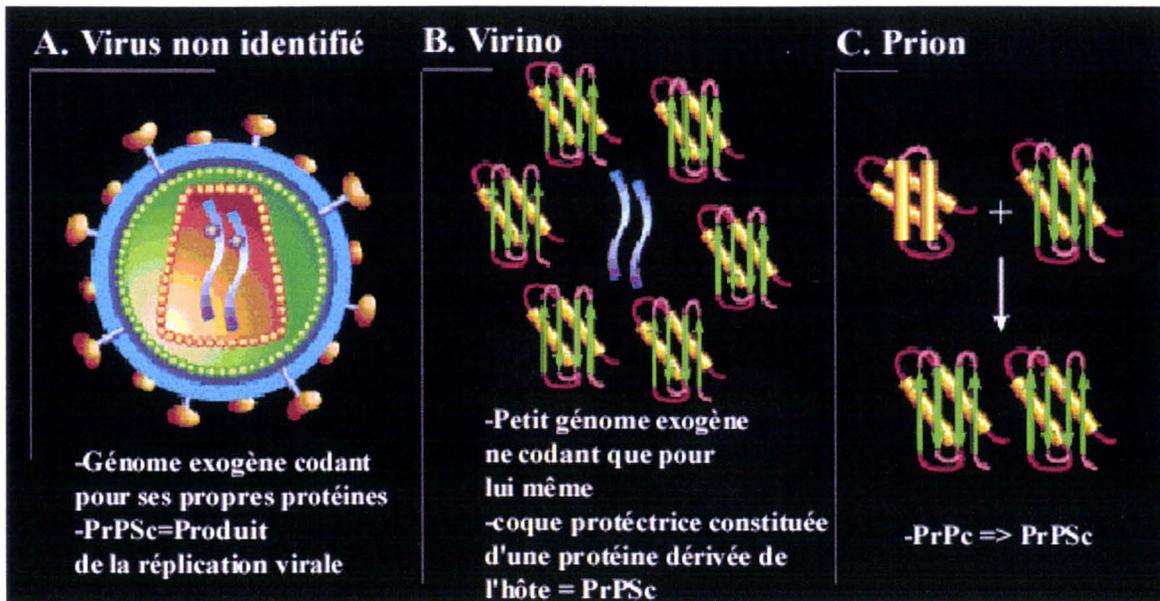


Figure 6 : Hypothèses proposées sur la nature de l'agent infectieux responsable des ESSTs.

8. Le gène codant pour la PrP

8.1. Importance de l'expression du gène de la PrP dans la physiopathologie des maladies à prions

8.1.1. Structure des gènes codant la PrP

En 1985, Oesch, *et al.* ont montré que la protéine PrP^{Sc} constitue l'isoforme anormale d'une protéine cellulaire, la protéine PrP^c codée par le génome de l'hôte (Oesch *et al.*, 1985). La structure des gènes codant pour la PrP^c de souris (Westaway *et al.*, 1994a), de hamster (Li & Bolton, 1997), de rat (Saeki *et al.*, 1996a), de mouton (Westaway *et al.*, 1994c), et de l'homme (Lee *et al.*, 1998) est fortement conservée entre les espèces. Ce gène est composé de trois ou quatre exons (chez le bovin) (Horiuchi *et al.*, 1997) et dans tous les cas, la totalité de la séquence codante est contenue dans le dernier exon (Hsiao *et al.*, 1989; Gabriel *et al.*, 1992).

Sa taille varie de 759 à 768 nucléotides et sa séquence présente 80 à 90% d'homologie entre les différentes espèces de mammifères.

Les exons non codants sont séparés de l'exon codant par un large intron de plus de 12kb. Chez le bovin, il existe un épissage alternatif des exons 1a et 1b (Horiuchi *et al.*, 1997).

Les régions promotrices minimales du gène *prp* ont été étudiées chez la souris (Baybutt & Manson, 1997), le rat (Saeki *et al.*, 1996b), le bovin (Inoue *et al.*, 1997) et l'homme (Funke-Kaiser *et al.*, 2001; Mahal *et al.*, 2001). Dans tous les cas, ces promoteurs ne présentent pas de boîte TATA et contiennent de nombreux nanomères de GC qui peuvent former des sites de fixation pour le facteur de transcription SP-1. Des régions promotrices putatives ont été décrites chez le rat, la souris et le bœuf. Ces domaines contiennent des sites de fixation pour les facteurs de transcription AP-1 et AP-2. L'absence de boîte TATA couplée à la présence de sites GC est fortement évocatrice d'un gène dit "de ménage". Chez la souris, un deuxième promoteur présent dans le premier intron a été observé par Baybutt *et al.* (Baybutt & Manson, 1997), et des tests effectués par transfection dans des cellules de neuroblastome de souris ont permis de montrer la présence, dans la région 3' non traduite, d'un site alternatif de polyadénylation qui régule l'expression du gène (Goldmann *et al.*, 1999).

Enfin, si le taux de transcrit n'est pas modifié au cours de l'infection, l'expression du gène *prp* est régulée dans le temps et dans l'espace notamment lors de l'embryogenèse (Manson *et al.*, 1994b). Cependant, la régulation d'expression du gène *prp* demeure très mal connue et l'identification de facteurs permettant une expression tissulaire spécifique au niveau biomoléculaire n'a pas encore été obtenue.

8.1.2. Polymorphisme et mutations du gène *prp*

Les polymorphismes et les mutations du gène *prp* sont associés directement à certaines maladies (IFF, MCJ familiales ou SGSS chez l'homme). Chez le mouton, le polymorphisme du gène *prp* modifie la susceptibilité d'un animal aux ESSTs, tandis que chez la souris, il est associé à des périodes d'incubation différentes.

8.1.2.1. Chez l'homme

Chez l'homme, 10% des cas de Creutzfeldt-Jakob et tous les cas de SGSS sont d'origine familiale. La découverte du gène *prp* a permis de mieux comprendre les implications génétiques qui pouvaient exister.

Les mutations ponctuelles

En 1989, Hsiao *et al.*, (Hsiao *et al.*, 1989; Hsiao & Prusiner, 1990) ont montré une liaison entre la forme ataxique de SGSS et la présence d'une mutation sur le gène *prp* conduisant à la substitution d'une Proline (P) par une Leucine (L) en position 102. Onze mutations différentes dans le gène *prp* ont été décrites dans des familles atteintes de MCJ ou de SGSS (Résumées sur la Figure. 1). Elles ont en commun d'être toutes localisées dans des régions très conservées de la séquence codante. Aucune mutation n'a pu être associée aux cas sporadiques qui représentent la majorité des cas de MCJ.

Le polymorphisme au codon 129

Un seul polymorphisme lié au Kuru, à la MCJ, au nvMCJ et à l'IFF a été décrit au niveau du gène *prp* humain. Il s'agit d'une Méthionine (M) ou d'une Valine (V) au codon 129 (Owen *et al.*, 1990) (Figure 6A). Une analyse de ce polymorphisme a montré que les cas sporadiques ou iatrogènes sont essentiellement retrouvés chez des individus homozygotes au codon 129 (MM ou VV). Par contre, jusqu'à présent, tous les cas de nvMCJ ont été caractérisés pour des patients porteurs de l'homozygotie MM au codon 129 (Figure 1: Comparaison MCJ sporadique et nvMCJ). Ce polymorphisme influence également le développement clinique de la maladie. Ainsi, les patients porteurs d'une même mutation substituant une Asparagine (N) à une Aspartate (D) au codon 178 ne vont développer une IFF ou une MCJ en fonction du polymorphisme présent au codon 129. Ainsi, une Méthionine du codon 129 va être liée à une MCJ familiale tandis qu'une Valine en position 129 va être observée chez les patients développant une IFF (Goldfarb *et al.*, 1992; Gambetti, 1996.).

Finalement, l'équipe de P. Brown a montré chez des patients atteints du Kuru qu'une homozygotie au codon 129 (MM ou VV) est liée à une apparition plus précoce des signes cliniques et probablement à une durée de développement de la maladie plus courte (Cervenakova *et al.*, 1998).

Les insertions

Huit additions et une délétion de 24 nucléotides répétés ont été décrites. On trouve ainsi de deux à neuf insertions de ces séquences entre les codons 51 et 91 du cadre ouvert de lecture. Les maladies dans ces groupes de patients débutent 20 à 30 ans plus tôt et durent 4 à 8 ans plus longtemps que pour les autres cas de maladies familiales. Très récemment, une insertion de huit répétitions a été caractérisée chez des patients porteurs d'une phénocopie de la maladie

de Huntington (Moore *et al.*, 2001) faisant entrer ces formes particulières dans le groupe des maladies à prions.

8.1.2.2. Chez le mouton

Il existe une variabilité génétique de la sensibilité aux ESSTs chez les ovins, en grande partie expliquée par le polymorphisme du gène au niveau des codons 136, 154 et 171. Les codons 136 codant pour une Alanine (A) ou une Valine (V), 154 codant pour une Arginine (R) ou une Histidine (H), et le codon 171 pour une Glutamine (Q) ou une Arginine (R) sont étroitement liés au phénotype de la maladie (Figure 6B). L'allèle ARR confère une résistance à la tremblante. Les ovins homozygotes ARR/ARR sont considérés comme entièrement résistants, quelle que soit la souche de l'agent infectieux. Par contre, l'allèle 136, lorsqu'il est porteur d'une Valine, est associé à une augmentation de la susceptibilité à la tremblante expérimentale. L'homozygotie 136 VV et l'hétérozygotie 136 AV sont donc identifiées dans certains troupeaux comme un facteur majeur de risque.

8.1.2.3. Chez la souris

Deux polymorphismes du gène *prp* murin (*prnp*) liés à la susceptibilité des souris ont été décrits. Ces polymorphismes contrôlent la susceptibilité (Brown *et al.*, 2000) de ces animaux à la tremblante du mouton ainsi que le temps d'incubation de la maladie (Dickinson *et al.*, 1968; Carlson *et al.*, 1986). L'allèle du gène *prnp* comprenant les acides aminés Leucine en position 108 et Thréonine en position 189 (Figure. 6C) est associé à un temps d'incubation court après inoculation par la souche Chandler (allèle *prnp^a*). A l'inverse, l'allèle comprenant une Phénylalanine en position 108 et une Valine en position 189 (*prnp^b*) est associé à une courte période d'incubation pour le même isolat (Westaway *et al.*, 1987).

Toutefois, pour d'autres souches de prions, ces différences liées peuvent être inversées.

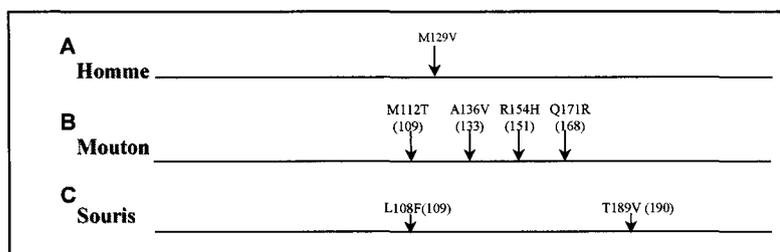


Figure 7 : Polymorphismes du gène *prp* humain, ovin et murin.

La numérotation entre parenthèse est donnée en référence à la numérotation sur le gène *prp* humain.

8.2. L'expression du gène *prp* est indispensable à la neuropathogénèse et le niveau de cette expression modifie la période d'incubation de la maladie.

L'utilisation des modèles murins surexprimant le gène *prnp* ou ne l'exprimant plus a permis, par des techniques de reconstitution sélective de faire exprimer le gène *prp* dans des régions spécifiques du cerveau ou dans des populations cellulaires spécifiques. Ces expériences ont permis d'aborder la fonction de la protéine PrP et d'apporter des informations quant aux mécanismes moléculaires permettant la propagation de l'agent infectieux depuis la périphérie vers le SNC. Ainsi des souris invalidées pour le gène *prnp* par recombinaison homologue ont non seulement montré un développement phénotypique normal mais aussi une totale résistance à l'infestation par les prions.

8.2.1. L'expression de la PrP^c dans le cerveau est indispensable au développement des signes histopathologiques.

L'implantation de greffons nerveux surexprimant la PrP^c dans des cerveaux de souris PrP^{0/0} a été réalisée par l'équipe d'Adriano Aguzzi. Après inoculation intracérébrale de ces greffons, ces souris n'ont pas développé de signes cliniques caractéristiques de la maladie alors que le greffon nerveux présentait les modifications histopathologiques caractéristiques des ESSTs. Par ailleurs, en dépit de l'accumulation de la PrP^{Sc} provenant du greffon infecté dans le tissu cérébral PrP^{0/0}, aucune modification histopathologique n'a pu être observée (Brandner *et al.*, 1996a). L'expression du gène codant pour la PrP de l'hôte est donc nécessaire à la neurotoxicité induite par l'agent infectieux.

8.2.2. La réplication et le transport de la PrP^{Sc} dans les tissus périphériques nécessite l'expression de la PrP^c

Les travaux de Bueler *et al.*, sur des souris PrP^{0/0} ont montré que l'expression de la PrP^c était indispensable à la réplication de l'agent infectieux dans les organes périphériques. En effet, l'accumulation de l'agent infectieux dans la rate qui peut être précocement observée chez des souris sauvages inoculées par voie intrapéritonéale (Hotchin *et al.*, 1983), est absente chez ces souris PrP^{0/0} (Bueler *et al.*, 1993). Blattler *et al.*, ont montré, après inoculation périphérique de souris PrP^{0/0} possédant un greffon nerveux PrP^{+/+}, que le greffon ne développe pas de signe histopathologique (Blattler *et al.*, 1997) même après reconstitution de ces souris avec des cellules de moelle osseuse dérivées de souris PrP^{+/+}. Toutefois, ces souris reconstituées présentent un pouvoir infectieux au niveau de la rate. Par conséquent, le transfert de l'agent

infectieux depuis la rate jusqu'au SNC est dépendant de l'expression du gène *prnp* par des tissus non reconstitués par la moelle osseuse.

8.2.3. Le temps d'incubation est associé au niveau d'expression du gène codant la PrP

Des souris transgéniques (Tga20) surexprimant le gène *prnp* présentent un temps d'incubation de la maladie plus court que pour des souris sauvages (Fischer *et al.*, 1996). Des souris hétérozygotes ($PrP^{+/-}$) montrent une augmentation du temps d'incubation (Bueler *et al.*, 1993; Bueler *et al.*, 1994) sans modification de localisation des zones touchées par l'accumulation de la PrP^{Sc} , ni modification du taux de PrP^{Sc} détecté dans le cerveau des souris au stade final de la maladie (Manson *et al.*, 1994b). Ces observations suggèrent une corrélation négative entre le taux d'ARNm de PrP et le temps d'incubation de la maladie. Toutefois, si l'augmentation des délais d'incubation reste évidente, la mesure par laquelle le temps d'incubation est augmenté varie en fonction de la souche de tremblante utilisée pour l'inoculation (Tableau 2).

Souches	<i>prnp</i> +/+	<i>prnp</i> +/-	<i>prnp</i> -/-
ME7	147± 2	293± 4	>500
301C	154± 1	230± 2	>500
301V	227± 3	320± 3	>500

D'après Bueler *et al.*, (Bueler *et al.*, 1994)

Tableau 2 : Temps d'incubation des souris *prnp*+/+, *prnp* +/-, *prnp* -/-

Il a également été montré qu'une surexpression du gène *prnp* sauvage peut conduire spontanément à une maladie neurologique létale avec des lésions cérébrales spongiformes, des dégénérescences musculaires (Westaway *et al.*, 1991), et des démyélinisations périphériques (Westaway *et al.*, 1994b). Toutefois, les modèles de neurodégénérescence obtenus n'ont pas montré de caractère infectieux.

8.2.4. L'expression du gène *prp* est associée à la barrière d'espèce

Le franchissement de la barrière d'espèce hamster/souris est difficile. Toutefois, l'introduction du gène *prp* de hamster chez la souris a permis d'augmenter la sensibilité de ces souris transgéniques au prion de hamster (Scott *et al.*, 1989). A nouveau, l'augmentation du taux d'expression du gène codant pour la protéine PrP de hamster (haPrP) permet de réduire la

période d'incubation. Ces souris transgéniques ont permis de montrer que l'expression du gène *prp* de hamster était, dans ce cas, le principal support de la barrière d'espèce.

8.3. L'expression du gène est régulée durant l'embryogenèse et les premières phases de développement

Les techniques d'hybridation *in situ* ont permis de mettre en évidence une régulation temporelle et spatiale de l'expression du gène *prnp* au cours du développement embryonnaire chez la souris.

L'ARNm de la PrP est détecté dans le cerveau de souris et de poulet au début de l'embryogenèse et son taux s'accroît au court du développement (Manson *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1993b). Dans le système nerveux central, l'expression de la PrP^c est détectée depuis le 13^{ième} jour dans les zones prolifératives comprenant des populations cellulaires non encore différenciées et dans des régions comprenant des neurones et des cellules gliales différenciées. L'épithélium olfactif et le plexus nerveux sous-muqueux de la langue montrent une expression de la PrP^c à partir du 13^{ième} jour tandis que la couche nucléaire interne de la rétine ne présente qu'un marquage à partir du 16^{ième} jour. Dans le rein, des cellules en stade précoce de différenciation dans le néphron embryonnaire expriment de la PrP^c dès le 16^{ième} jour (Manson *et al.*, 1992).

Dans le système nerveux périphérique, des transcrits ont été retrouvés dans les ganglions crâniens et sympathiques, dans le tronc sympathique et dans les ganglions des racines dorsales (zone riche en neurones sensitifs et en cellules de Schwann qui constitue la limite entre le SNC et le SNP).

8.4. L'expression du gène *prnp* est régulée dans l'espace

L'importance de la PrP^c dans la pathogenèse est bien documentée toutefois, nos connaissances sur l'expression tissulaire et cellulaire de cette protéine sont encore incomplètes. Chez toutes les espèces, elle est fortement exprimée dans les neurones et à un moindre niveau dans les autres cellules du système nerveux central (astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales). Les différences dans les sensibilités des techniques employées pour analyser l'expression de la PrP^c et les possibles différences entre les espèces sont à l'origine de descriptions assez hétérogènes.

8.4.1. Expression de la PrP^c dans les tissus neuronaux

Le profil d'expression de la PrP^c dans les cerveaux de hamster et de primates a été étudié par Salès *et al.* (Sales *et al.*, 1998). Par Western Blot, ils ont mis en évidence des différences de niveaux d'expression dans le cerveau. Les plus forts taux de PrP^c sont trouvés dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le *striatum*. Une expression plus modérée a été localisée dans le bulbe olfactif, l'hypothalamus, le cerveau moyen, le cervelet et le niveau le plus bas dans l'hypophyse.

L'analyse par immunohistochimie sur des coupes flottantes de cerveaux de hamster a mis en évidence, que pour chaque structure montrant un fort marquage (le *neocortex*, le *striatum* et l'hippocampe), il existait également des disparités dans le niveau d'expression. Plus particulièrement, le marquage au niveau de l'hippocampe a été retrouvé dans les couches synaptiques. Par contre, les cellules somatiques pyramidales et granulaires du gyrus denté n'ont pas présenté de marquage particulier. Autour de l'hippocampe, un fort marquage a été observé dans le neuropile de la queue du putamen et dans le *globus pallidus* mais un marquage encore plus intense a été retrouvé dans le *pallidus* ventral (Sales *et al.*, 1998). On constate ainsi que le niveau d'expression du gène codant pour la PrP^c peut varier en fonction des structures étudiées et donc des types cellulaires observés.

Toujours chez le hamster, une forte expression de la PrP^c a été observée dans les segments externes de cellules photoréceptrices de la rétine. Par contre, le tractus optique a présenté peu de PrP^c (Chishti *et al.*, 1997). Dans le cervelet, la couche moléculaire est faiblement immunoréactive mais un marquage léger a pu être observé dans la couche de cellules granulaires.

Au niveau cellulaire, chez la souris (Brown *et al.*, 1990a), et le hamster (Kretzschmar *et al.*, 1986), l'ARNm de la PrP a été détecté par hybridation *in situ* dans les cellules du canal de l'épendyme, dans l'épithélium du plexus choroïd, les astrocytes, les pericytes, les cellules endothéliales, les méninges et la microglie.

L'ensemble de ces résultats montre de légères différences dans le profil d'expression tissulaire ou cellulaire pour une même espèce. Chez le hamster, les principales différences concernent le cortex cérébral et l'hippocampe qui révèlent de forts taux de PrP^c dans certaines études (Bendheim *et al.*, 1992; DeArmond *et al.*, 1998) alors qu'un faible immunomarquage a pu être visualisé lors d'autres investigations (Sales *et al.*, 1998). De même, les cellules de Purkinje ont été rapportées pour être positives à la PrP^c (Bendheim *et al.*, 1992) alors que d'autres auteurs

n'ont pas observé de marquage dans ces mêmes cellules (Sales *et al.*, 1998). Ces différences sont dues aux techniques employées et aux anticorps utilisés pour la détection de la PrP^c.

Des différences dans la localisation de l'expression de la PrP^c ont également été retrouvées entre différentes espèces. Par exemple, dans la moelle épinière de rat (DeArmond *et al.*, 1998), de faibles taux d'ARNm de la PrP ont été décrits après hybridation *in situ*. De même, la PrP^c a été détectée par immunohistochimie dans les neurones des ganglions des racines dorsales. Par contre, aucun marquage n'a été observé dans les cellules de la corne antérieure ou d'autres sections de la moelle épinière de hamster (Bendheim *et al.*, 1992).

Cependant, l'expression de la PrP^c dans le cerveau de souris (Hope & Manson, 1991), de rat (Tanji *et al.*, 1995), et de primate semble être similaire à celle observée chez le hamster. De plus, les études d'expression de la PrP^c chez le mouton (Horiuchi *et al.*, 1995) et la vache (Horiuchi *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1997) confirment la positivité des tissus cérébraux sans plus d'informations au niveau de la distribution cellulaire.

8.4.2. Expression de la PrP^c dans les tissus non neuronaux

La PrP^c s'exprime également dans de nombreux tissus extra neuronaux.

- L'appareil digestif et l'appareil respiratoire.

Bendheim *et al.*, ont montré que, les cellules épithéliales, pariétales et glandulaires de l'estomac expriment la PrP. Dans le pancréas, l'immunomarquage est visualisé sur les cellules qui sont confinées dans les îlots de Langerhans tandis que les cellules exocrines sont non marquées (McBride *et al.*, 1992).

Au sein de l'appareil respiratoire, un marquage très fort est observé à proximité de la surface luminale de l'épithélium bronchique et dans les cellules de Clara (Kadoya *et al.*, 2001). Par contre, les épithélium alvéolaires ne présentent pas de marquage.

- Système lymphoréticulaire (SLR)

Dans la rate de hamster, les splénocytes sont positifs pour la PrP^c (Bendheim *et al.*, 1992). Dans le thymus de souris, le marquage dirigé contre la PrP^c est localisé à la surface des cellules interdigitées au niveau de la jonction cortico-médullaire. Dans les follicules de la pulpe blanche de la rate, comme dans les centres germinatifs des noyaux lymphatiques, la PrP^c est observée au niveau des cellules folliculaires dendritiques (CFD). Chez l'homme, la PrP^c est détectée à la surface des monocytes, des lymphocytes, des plaquettes et des cellules souches multipotentes CD34⁺ mais pas dans les érythrocytes ni dans les granulocytes (Dodelet &

Cashman, 1998). A l'exception des plaquettes, les mêmes résultats ont été obtenus chez le mouton (Herrmann *et al.*, 2001). L'expression et la localisation de la PrP^c dans les plaques de Peyer ont été étudiées chez le mouton (Heggebo *et al.*, 2000). La PrP^c a ainsi été observée dans la *lamina propria*, le dôme et les régions interfolliculaires de ces plaques. Au sein des follicules, la PrP^c est retrouvée dans la capsule et dans les cellules associées aux structures vasculaires.

- Le système nerveux périphérique

La PrP^c a enfin été identifiée dans le système nerveux entérique innervant la paroi du tube digestif chez le hamster et le mouton (Beekes & McBride, 2000; Heggebo *et al.*, 2000). De même, elle a été observée par immunomarquage à la jonction neuromusculaire (Askanas *et al.*, 1993). Enfin, l'étude des nerfs périphériques a montré la présence de PrP^c dans les flux axonaux antérogrades rapides (Rodolfo *et al.*, 1999).

De l'ensemble de ces données, il demeure que, même si la PrP^c est détectée dans les tissus extraneuronaux, de grandes variations de profil d'expression peuvent apparaître en fonction des études (Tableau 3).

	Hamster		Souris		Mouton		Vache	
	ARNm	PrP ^c	ARNm	PrP ^c	ARNm	PrP ^c	ARNm	PrP ^c
Noyau lymphatique				++	++	+		+
Rate	+	++	+	++	++	++		++
Thymus		++		++				
Intestin		++			++			
Pancréas		+		++	-	-		
Foie	+	+	+		-	-		
Muscle		++	+		++	++		+
Poumon		++	+		++	++		
Rein	+	++	+		++	+		
Glandes surrenales					++	+		++
Testicules		++						
Bibliographie	(Caughey <i>et al.</i> , 1988; Brown <i>et al.</i> , 1990a)	(Bendheim <i>et al.</i> , 1992)	(Caughey <i>et al.</i> , 1988; Brown <i>et al.</i> , 1990a)	(McBride <i>et al.</i> , 1992)	(Horiuchi <i>et al.</i> , 1995)	(Horiuchi <i>et al.</i> , 1995)	(Inoue <i>et al.</i> , 1997)	

++ : PrP^c ou ARNm de la PrP détectée. + : faible détection de la PrP^c ou de son ARNm. - : pas de détection.

Tableau 3 : Expression de la PrP^c dans certains tissus extraneuronaux.

9. La propagation des prions depuis les sites extra-cérébraux jusqu'au système nerveux central (SNC).

La voie orale est la route naturelle d'infection pour les maladies à prions. Chez l'animal, elle est impliquée dans la transmission de la tremblante et de l'ESB. Chez l'homme, elle est responsable de la transmission de l'ESB (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997a) et du Kuru. L'agent infectieux se propage alors depuis le tractus gastrointestinal jusqu'au système nerveux central. Le temps d'incubation très long pourrait s'expliquer par la nécessité d'une réplication de l'agent dans des tissus périphériques. Le système lymphoréticulaire (SLR) et le système nerveux périphérique (SNP) sont impliqués dans cette propagation.

9.1. Le rôle du système lymphoréticulaire dans la réplication/propagation de l'agent infectieux.

Chez la souris (Eklund *et al.*, 1967), le hamster (Kimberlin & Walker, 1986) et le mouton (Hadlow *et al.*, 1982), on observe une réplication précoce de l'agent infectieux dans les organes lymphoïdes après inoculation de l'agent par voie périphérique (intrapéritonéale, orale, ou scarification). Pour la plupart des modèles expérimentaux, l'infectiosité peut s'accumuler dans toutes les composantes du SLR, notamment dans la rate (Kimberlin & Walker, 1989b), les noyaux lymphatiques, les plaques de Peyer intestinales (Kimberlin & Walker, 1989a), les amygdales (Hill *et al.*, 1997b; Hill *et al.*, 1999) et l'appendice (Hilton *et al.*, 1998).

Cependant, ce pouvoir infectieux des tissus lymphoïdes périphériques dépend de l'hôte et de la souche de prions. Ainsi chez le bovin, l'ESB ne s'accompagne pas d'accumulation de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoïdes périphériques. Par contre, la PrP^{Sc} est retrouvée dans ces tissus lors de la transmission de cette souche au mouton. De même, chez les patients atteints du nvMCI, le prion s'accumule dans les amygdales (Hill *et al.*, 1997b).

L'infestation par voie intrapéritonéale de souris ayant une sévère déficience immunitaire combinée (Souris SCID), ne conduit pas à la réplication de l'agent infectieux dans la rate ni dans le cerveau (Muramoto *et al.*, 1993). Cependant, la reconstitution du système immunitaire de ces souris restaure la susceptibilité de ces animaux à une inoculation par voie périphérique (Lasmezas *et al.*, 1996a). Ces données suggèrent qu'un système immunitaire fonctionnel est

requis pour la réplication et le transfert de l'agent infectieux depuis les sites périphériques jusqu'au SNC.

Toutefois, l'étude de souris qui ont subi une thymectomie ou qui sont génétiquement dépourvues de thymus (Souris *nude*) n'a pas fait apparaître de variations particulières dans le temps d'incubation de la maladie après inoculation périphérique (Mohri *et al.*, 1987), (Fraser & Dickinson, 1978). L'ablation de la rate avant l'inoculation intrapéritonéale conduit à une augmentation du temps d'incubation de la maladie chez la souris (Fraser & Dickinson, 1970; Fraser & Dickinson, 1978). Suite à ces observations, la question du type cellulaire impliqué dans ces mécanismes s'est donc posée.

9.1.1. Le rôle des lymphocytes

Afin d'identifier les cellules lymphoïdes responsables de l'accumulation et du transport de l'agent infectieux, l'équipe d'Adriano Aguzzi a inoculé différentes lignées de souris déficientes pour les lignées lymphocytaires B ($\mu\text{MT}^{-/-}$) ou T ($\text{CD}_4^{-/-}$) (Tableau 4). Après inoculation intracérébrale, toutes les souris sont mortes en présentant les signes cliniques et biochimiques des ESSTs. Ce premier résultat montre que le développement de la maladie induite par voie intracérébrale n'est pas tributaire du SLR. Par contre, après inoculation périphérique, les souris immunodéficientes affectant la différenciation des lymphocytes B (LB) présentent un allongement du délai d'incubation voire même une certaine résistance à l'infection (Klein *et al.*, 1997) tandis que les lignées de souris, dont la voie lymphocytaire T est atteinte, ne présentent pas ces altérations (Tableau 4). Ces résultats ont montré le rôle clé des LB dans la neuroinvasion tout en soulevant d'autres questions: "Comment l'agent parvient il aux LB ?"

D'un point de vue physiologique, il est très peu probable que les lymphocytes B puissent transporter les prions depuis la périphérie jusqu'au cerveau puisque les lymphocytes ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique à moins d'un désordre majeur de cette dernière (comme dans le cas d'une réaction inflammatoire). De plus, le niveau d'infection des cellules B circulantes est très bas tandis que celui retrouvé dans la rate est très élevé. Par ailleurs, il a été montré que plus de 30% des souris déficientes pour les lymphocytes B accumulent de la PrP^{Sc} sans présenter de signes cliniques de la maladie (Frigg *et al.*, 1999). De ce fait, les lymphocytes B auraient un rôle d'effecteur secondaire ou de cofacteur dans la pathogenèse (périphérique) des maladies à prions.

Développement de la maladie après inoculation par voie :			
Déficit	génotype	Intracérébrale	Intrapéritonéale
T	CD4 ^{0/0} (a)	Oui	Oui
T	CD8 ^{0/0} (a)	Oui	Oui
T	β_2 microglobuline ^{0/0} (a)	Oui	Oui
T	Perforine ^{0/0} (a)	Oui	Oui
T et B	SCID (a)	Oui	75%
T et B	SCID (d)	Oui	25%
T et B	RAG ^{0/0} (a)	Oui	Non
T et B	TAG1 ^{0/0} (a)	Oui	Non
T et B	RGR ^{0/0} (c)	Oui	Non
B	μ MT (a)	Oui	Non
IgG	t11 μ MT (a)	Oui	Oui
CFD	TNFR1 ^{0/0} (b)	Oui	Oui
Témoins	129Sv	Oui	Oui
	C57BL/6	Oui	Oui

Tableau 4 : Effet de la perte de certaines lignées cellulaires lymphoïdes sur le développement des ESSTs.

a: fond génétique C57BL/6, b: fond génétique 129Sv, c: fond génétique C57BL/6 x 129Sv, d: fond génétique CB17. D'après Klein et al, (Klein et al., 1997). Les souris RAG^{0/0} sont déficientes pour le gène *rag2* et pour les récepteurs pour l'interféron α et γ . Les souris μ MT, dont l'exon codant pour la région transmembranaire de la chaîne μ des immunoglobulines a été supprimé par recombinaison homologue, présentent un déficit complet de la différenciation des LB, la fonction T étant préservée. Les souris t11 μ MT sont des souris μ MT transgéniques pour un gène d'une IgM réarrangée reconnaissant une glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire. La différenciation des LB est complète mais le répertoire B de la réponse immunitaire est limité à l'expression de l'immunoglobuline M du transgène. Les isotypes D, G, E ou A ne sont pas produits. Les souris TNFR1^{0/0} sont déficientes pour le récepteur 1 du facteur de nécrose des tumeurs (TNF). Chez ces animaux, le centre germinatif des ganglions lymphatiques est virtuellement absent, les CFD sont très rares, malgré le développement des lignées B et T.

9.1.2. Les Cellules Folliculaires Dendritiques

Les études réalisées sur des souris irradiées ont montré que les cellules impliquées dans la réplication périphérique de l'agent de la tremblante expérimentale ont une faible activité mitotique (Fraser & Farquhar, 1987), suggérant que les cellules folliculaires dendritiques (CFD) peuvent jouer un rôle dans sa réplication. Il a été montré par la suite que les CFD accumulent la PrP^{Sc} dans des souris sauvages ou dans des souris *nude* (Kitamoto et al., 1991; McBride et al., 1992; Montrasio et al., 2000).

Le rôle essentiel des CFD dans la réplication de l'agent infectieux a été démontré par la création de souris chimériques reconstituées avec de la moelle osseuse PrP^{+/+} ou PrP^{0/0}. Ces souris présentent une différence de statut pour la PrP exprimée au sein des CFD vis à vis des autres cellules du système immunitaire. Dans cette étude, il a été montré que la réplication ou

du moins l'accumulation de la PrP^{Sc} dans la rate, dépend de l'expression de la PrP^C par les CFD (Brown *et al.*, 1999).

Au niveau de la rate, la maturation des centres germinatifs et des CFD est directement tributaire de l'action des lymphocytes B (Kapasi *et al.*, 1993). Cette maturation fait appel à des voies de signalisation impliquant les cytokines TNF α et IL-6 (Kopf *et al.*, 1998) et d'autres effecteurs cellulaires comme la lymphotoxine β . Les souris déficientes pour le TNF α (TNF α ^{-/-}) ou son récepteur (TNF α R1^{-/-}) n'ont pas de CFD matures mais possèdent des LB et LT. Après inoculation périphérique, la plupart de ces souris knock-out ne développent pas d'ESST et les rares qui succombent aux signes cliniques de la maladie présentent une augmentation de la période d'incubation (Mabbott *et al.*, 2000). D'autres expériences éliminant les CFD par un traitement utilisant des récepteurs solubles de la lymphotoxine β (LT- β Ig) (Montrasio *et al.*, 2000) montrent également un arrêt de l'accumulation de la PrP^{Sc} dans la rate et un ralentissement de la neuroinvasion.

Toutefois, les résultats observés sont différents en fonction de la souche de prions employée (ME7 ou RML). En effet, après inoculation intrapéritonéale, les souris TNF α R1^{-/-} sont totalement susceptibles à la souche RML mais partiellement résistante à la souche ME7 (Mabbott *et al.*, 2000). Des souris génétiquement déficientes pour la LT- β (LT β ^{-/-}) (Manuelidis *et al.*, 2000) inoculées avec la souche de MCJ Fukuoka, ne présentent qu'un très faible rallongement de temps d'incubation. Ce résultat suggère qu'au niveau périphérique comme au niveau central, les souches de prions peuvent avoir des tropismes cellulaires différents.

Ces données n'expliquent toutefois pas le passage de l'agent au niveau de la barrière intestinale. Dans les modèles naturels et expérimentaux de tremblante chez le mouton, l'infectiosité est observée dans les plaques de Peyer [Heggebo, J Gen Virol 2000]. Dans ces structures lymphoïdes, les cellules M ont été proposées comme la porte d'entrée majeure de pathogènes *via* un transport transépithélial (Neutra *et al.*, 1996). *In vitro*, l'insertion de cellules B dans une monocouche de cellules épithéliales intestinales humaines (Caucasian Colon Adenocarcinome: Caco-2) conduit à la différenciation de quelques Caco-2 en cellules M. Ce modèle, incubé avec la souche de prion RML, a permis de montrer un passage de l'agent par transport trans-épithélial *via* les cellules M. *In vivo*, les prions pourraient ainsi exploiter la transcytose *via* les cellules M pour accéder au système immunitaire (Heppner *et al.*, 2001).

9.2. Transport par voie sanguine

La transmission au mouton de l'agent de la tremblante par l'injection intraveineuse de sang issu d'un mouton contaminé a suggéré qu'un passage direct des prions *via* le sang pouvait avoir lieu [Lancet, 1999]. Les approches *in vitro* ont montré que, dans cette voie, les cellules dendritiques (CD) peuvent jouer un rôle déterminant (Aucouturier *et al.*, 2001). La PrP^{Sc} a été identifiée *in vivo* dans les cellules dendritiques de la rate de souris inoculées. De même, l'inoculation par voie intraveineuse de ces cellules extraites de souris infestées a conduit au développement des signes cliniques des ESSTs. Les CD pourraient ainsi intervenir dans la propagation des prions par voie veineuse. Plus particulièrement, ces travaux ont montré que les CD sont capables de transporter l'agent infectieux des compartiments vasculaires jusqu'au SNC suggérant un rôle dans le passage de la barrière hématoencéphalique.

9.3. Rôle du système nerveux périphérique dans le transport de l'agent

Mohri *et al.*, ont montré que des souris génétiquement dépourvues de rate ne présentent pas d'augmentation de la période d'incubation après inoculation par voie intrapéritonéale avec l'agent de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Mohri *et al.*, 1987) ou avec une souche de hamster (Kimberlin & Walker, 1986) suggérant une autre voie de propagation. De même, l'inoculation de souris SCID avec de fortes doses de prions conduit au développement d'une ESSTs (Lasmez *et al.*, 1996a). Ainsi, les voies de propagation diffèrent en fonction de la souche de prions et de la dose inoculée.

9.3.1. Liaison entre le système lymphoréticulaire et le système nerveux périphérique

Le SLR n'est pas la seule voie de répllication et de transport des prions. Des greffons nerveux exprimant la PrP^c placés dans des souris PrP^{0/0} ne développent pas de signes histopathologiques après une infestation intrapéritonéale ou intraveineuse et aucun pouvoir infectieux n'est détecté dans la rate de ces souris. Après reconstitution du système hématopoïétique de ces souris avec des cellules exprimant de la PrP^c, le titre infectieux est décelable dans la rate au même niveau que des souris sauvages. Toutefois, le greffon nerveux de ces souris ne développe toujours pas de signes histopathologiques (Blattler *et al.*, 1997) laissant suggérer la nécessité d'expression de la PrP^c par le SNP pour atteindre le SNC.

De plus, les divergences de résultats obtenus en fonction des espèces étudiées, des souches de prions employées et des modes d'inoculation sont en faveur d'un rôle important du système nerveux périphérique dans les mécanismes de neuroinvasion. Le SNP pourrait intervenir à la suite d'une accumulation dans le SLR ou en parallèle de celui-ci.

9.3.2. Les voies nerveuses impliquées

9.3.2.1. Le système nerveux sympathique (SNS)

Kimberlin *et al.*, ont montré que l'accès de l'agent infectieux par les nerfs périphériques est facilité si la myélinisation des nerfs est réduite, ou absente (Kimberlin *et al.*, 1983a). La zone du manteau des follicules lymphoïdes qui est innervée par les terminaisons non myélinisées des fibres nerveuses sympathiques, pourrait donc être l'un des points d'entrée de l'agent infectieux dans le SNP. Après une injection par voie intracérébrale, intrapéritonéale ou orale, l'agent infectieux s'accumule dans les organes lymphoïdes. Ces organes sont innervés par les fibres du système nerveux sympathique. Le SNS innerve également le tractus digestif qui est la voie de passage obligatoire lors des infestations par voie orale. Une sympathectomie transitoire ou permanente (ablation du SNS par injection de 6-hydroxydopamine ou d'anticorps dirigés contre le facteur de croissance des nerfs (NGF)), conduit après inoculation par voie intrapéritonéale à un allongement du temps d'incubation de la maladie (Glatzel *et al.*, 2001). Inversement, l'hyperinnervation des organes lymphoïdes chez des souris surexprimant le NGF conduit à une diminution du temps d'incubation de la maladie (Glatzel *et al.*, 2001) et à une augmentation de l'accumulation des prions dans la rate. Ces résultats suggèrent que les fibres nerveuses du SNS (comme le nerf splanchnique) pourraient constituer un support de la progression de l'agent vers le SNC (Figure 8).

9.3.2.2. Le système nerveux parasympathique (SNPara)

Chez le hamster, après infestation par voie orale avec la souche 263K, la PrP^{Sc} est retrouvée non seulement dans les ganglions du SNS mais aussi dans le nerf vague (McBride *et al.*, 2001) ce qui suggère une autre voie de propagation ne passant pas par la moelle épinière mais empruntant les fibres du système nerveux parasympathique. De nombreuses études conduites dans le cadre d'ESST expérimentales (Baldauf *et al.*, 1997) ou naturelles chez le mouton ou la vache (Groschup *et al.*, 1996; Groschup *et al.*, 1999; van Keulen *et al.*, 1999b)) montrent que les systèmes nerveux parasympathique (SNPara) et entérique (SNE) sont impliqués dans la

diffusion de l'agent infectieux jusqu'au SNC (Glatzel & Aguzzi, 2000b). Cette voie de propagation emprunte un profil anatomique le long des nerfs viscéraux. Après inoculation par voie orale, la PrP^{Sc} est distribuée tout au long du tractus digestif dans le SNE chez le hamster (Beekes & McBride, 2000). Ce dernier est constitué principalement des plexus de Meissner et d'Auerbach qui sont connectés avec les neurones parasymphatiques du nerf vague. La présence de PrP^{Sc} dans les noyaux moteurs dorsaux de ce nerf suggère ainsi une voie vagale de propagation du pouvoir infectieux (Baldauf *et al.*, 1997) issu du SNE. Cette voie constituerait ainsi une route alternative majeure au SNS (Figure 8) dans le cas d'infections par voie orale (Beekes *et al.*, 1996; Beekes *et al.*, 1998).

Finalement, une étude récente de la progression de l'agent infectieux chez le hamster après infestation par voie orale (McBride *et al.*, 2001) montre que la propagation de la PrP^{Sc} emprunte le nerf vague (fibres parasymphatiques) et le nerf splanchnique (fibres sympathiques).

9.3.3. Mécanisme de propagation dans le SNP

La nature exacte du transport le long des fibres nerveuses n'est pas connue. On peut considérer tout aussi bien un transport axonal ou Schwannien.

Un transport axonal rapide a été décrit pour la PrP^c (Borchelt *et al.*, 1994). Chez le hamster infecté par voie intrapéritonéale, la PrP^{Sc} se localise à proximité de l'axone ce qui serait en faveur d'un transport non axonal au sein du SNP (Groschup *et al.*, 1999).

Pour la PrP^{Sc}, seules des études indirectes ont été réalisées en comparant les temps d'incubations de souris inoculées dans le nerf ou en dehors du nerf. Dans le cas d'une inoculation intranerveuse, le transport de l'agent se fait plus rapidement que chez des souris injectées par voie extranerveuse. La vitesse de propagation dans le SNP est estimée à 1 mm par jour (Scott, 1993), vitesse ne correspondant pas à celle du transport axonal rapide qui est de l'ordre de 20 à 30 cm par jour (Kimberlin *et al.*, 1983a).

Indépendamment du mode de transport dans le SNP ou de l'identification du type de fibres impliqué dans cette propagation, la question qui demeure concerne le mécanisme cellulaire impliqué dans ces phénomènes de réplication propagation. Cette question a constitué la base de mon travail de thèse dont les objectifs sont présentés dans la partie suivante.

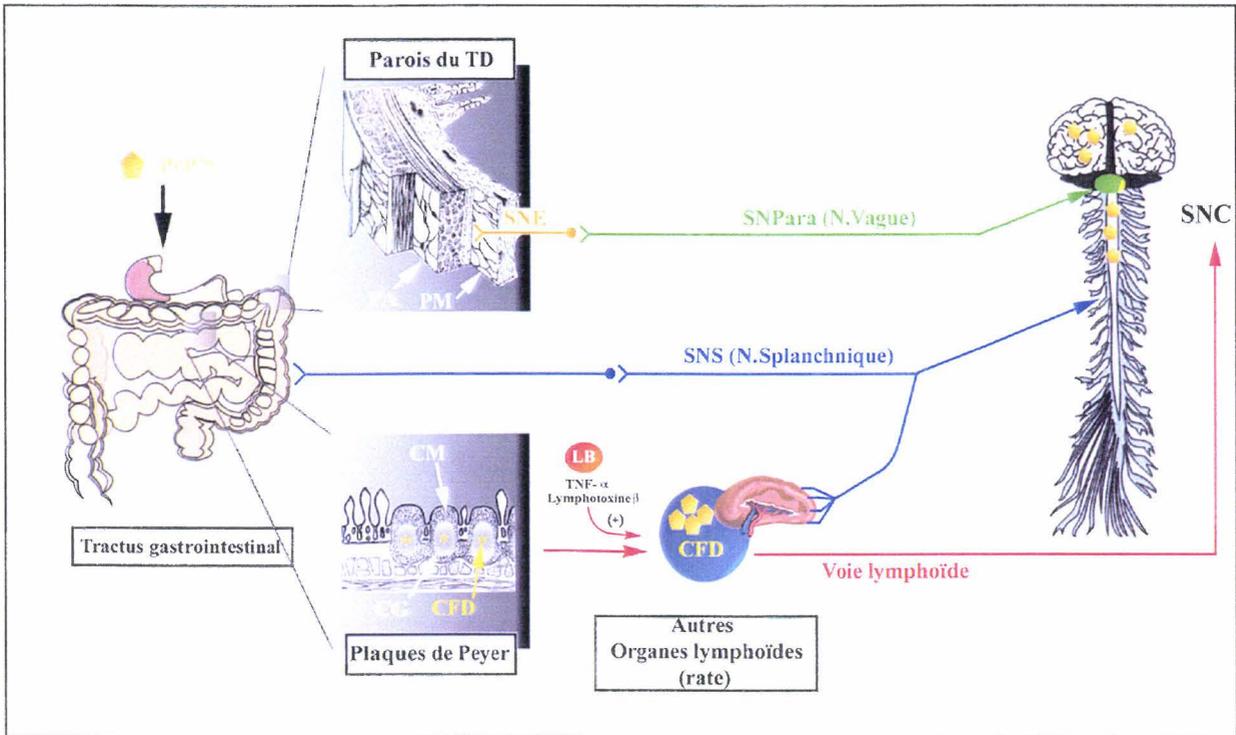


Figure 8 : Voies de neuroinvasion des prions.

Après inoculation par voie orale ou intrapéritonéale, les prions peuvent remonter jusqu'au SNC via trois modèles. La première voie est lymphoïde. Elle passe par les plaques de Peyer (constituées notamment de cellules M (CM) et de centres germinatifs (CG) comprenant des cellules folliculaires dendritiques (CFD)) et par la rate (Marquage Rouge). Dans cette voie, les CFD sont menées à maturation sous l'action des Lymphocytes B (LB) *via* la sécrétion de Lymphotoxine β ou de TNF- α . Les CFD jouent un rôle central dans la réplication de l'agent infectieux. La seconde voie de neuroinvasion est uniquement nerveuse. Elle passerait par les plexus de Meissner (PM) et de Auerbach (PA) contenus dans la paroi du TD. Ces plexus sont les constituants majeurs du système nerveux entérique (SNE Jaune) qui fait synapse avec les fibres du système nerveux parasymphiques (SNPara, Vert). Cette deuxième voie peut également emprunter les fibres du système nerveux sympathique (SNS bleu) avant de gagner le SNC par la moelle épinière. Enfin, la troisième voie, de type mixte, est composée d'éléments du SLR (Flèches Rouge) innervés par les fibres du SNS (Bleu).

Objectifs du travail

10. Objectifs du travail

De nombreuses études utilisant des souris PrP^{0/0} ont montré que l'expression de la PrP^c est indispensable à la propagation de l'infectiosité suggérant que le transport de l'agent infectieux nécessite la présence d'une chaîne continue de cellules exprimant le gène *prp*. De nombreux travaux suggèrent que la propagation de l'agent suit une séquence lympo-nerveuse. Après une réplication dans les tissus lymphoïdes périphériques dont les cellules folliculaires dendritiques seraient le support cellulaire, l'agent se propagerait le long des fibres nerveuses du système nerveux périphérique. L'identification des facteurs cellulaires régissant le transport de la PrP^{Sc} au sein du système nerveux périphérique est de première importance non seulement parce qu'elle permettrait de mieux comprendre la physiopathologie des ESSTs, mais aussi parce qu'elle pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à bloquer ou ralentir la propagation de l'agent pathogène. Dans ce contexte, mon travail a eu pour objectif d'étudier le transport de l'agent par ces voies nerveuses périphériques.

Dans un premier temps, nous avons recherché la spécificité d'expression cellulaire et tissulaire du gène *prp* en créant des souris transgéniques incluant 6,9kb de la région régulatrice du gène *prp* bovin, placés en amont du gène rapporteur de la "*green fluorescent protein*" (gfp) (Lemaire-Vieille *et al.*, 2000). Ces travaux ont permis d'identifier les cellules exprimant la PrP et qui pourraient jouer un rôle clé dans la réplication et la propagation de l'agent infectieux. Nous avons notamment montré l'expression du gène rapporteur au niveau du système nerveux périphérique dans les ganglions nerveux des plexus du système nerveux entérique et dans les cellules de Schwann le long du nerf sciatique.

Dans un second temps, nous avons montré que dans une coupe de nerf sciatique de souris, les cellules de Schwann expriment la PrP, principalement localisée au niveau de la membrane cellulaire et dans le cytoplasme. La réplication de l'agent infectieux étant dépendante de l'expression du gène *prp*, nous avons recherché l'expression de la PrP dans une lignée cellulaire immortalisée de cellules de Schwann (MSC-80) qui constitue l'une des rares lignées de cellules gliales isolées du SNP murin. Nous avons ensuite montré que ces cellules pouvaient répliquer l'agent infectieux sur plus de 15 passages. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue "*Journal of Virology*" (Follet *et al.*, in press) et d'une demande de dépôt de Brevet.

Dans un troisième temps, compte tenu de l'importance du niveau d'expression du gène codant

pour la PrP dans la physiopathologie des maladies à prions, nous avons cherché à caractériser la présence de domaines régulateurs spécifiques des cellules de Schwann au sein des séquences régulatrices du gène *prp*. Pour cela, nous avons analysé l'expression de constructions utilisant le gène rapporteur de la luciférase placé sous le contrôle de la région 5' non traduite du gène *prp* bovin. Après avoir créé des délétions ciblées dans ce domaine, les constructions ont été testées par transfection transitoire dans différentes lignées cellulaires (Neuroblastome N2a, Cellules de Schwann MSC-80) afin de détecter la présence de domaines régulateurs spécifiques d'un type cellulaire donné. Nous avons ainsi identifié dans le premier intron du gène *prp* bovin un domaine activateur de 200 pb capable d'induire, lorsqu'il est introduit en double copie dans cet intron, une surexpression du gène rapporteur dans les cellules de Schwann comme dans des neurones. Ces résultats font l'objet d'un article en cours de rédaction.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis d'une part de proposer un modèle cellulaire pouvant soutenir la propagation de l'agent infectieux le long des nerfs périphériques. De même, ces données ont permis de fournir un nouveau modèle d'étude *in vitro* de la réplication de l'agent infectieux impliqué dans les ESSTs et de la régulation du gène *prp*. L'ensemble de ces données suggérant un rôle important des cellules de Schwann dans les ESSTs.

Résultats

Chapitre I :
Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice

1. Introduction

La transmission par voie orale est le mode de contamination le plus significatif au niveau des ESSTs naturelles. Toutefois, la compréhension des étapes qui contrôlent l'accès de l'agent pathogène depuis le tractus gastrointestinal jusqu'au système nerveux central n'est pas complète. Les inoculations expérimentales ont montré qu'en fonction de l'animal hôte, de la dose, de la souche infectieuse employée et du mode de transmission, l'agent infectieux pouvait être retrouvé très précocement dans différents organes périphériques appartenant au SLR (plaques de Peyer, rate, ganglions mésentériques) ou au SNP (SNS ou SNPara). Malgré ces observations, les mécanismes intervenant dans la réplication et la neuroinvasion de l'agent pathogène n'ont toujours pas été identifiés. Or, la caractérisation du ou des types cellulaires impliqués dans la chaîne de propagation de l'agent infectieux permettrait la recherche de traitements thérapeutiques visant à ralentir voire bloquer la diffusion de la maladie jusqu'au SNC.

Les travaux initiés par l'élaboration de souris transgéniques dépourvues de PrP^c ont montré que l'expression de cette protéine est un élément clé dans la physiopathologie des ESSTs (Prusiner, 1998). En effet, les résultats obtenus après inoculation intracérébrale de ces souris ont montré la nécessité de l'expression du gène *prnp* dans le développement des signes histopathologiques (Bueler *et al.*, 1993). Plus particulièrement, l'inoculation intrapéritonéale de souris PrP^{0/0} a mis en évidence la nécessité d'expression de la PrP dans la réplication de l'agent infectieux et la propagation de l'infectivité depuis les voies périphériques d'inoculation jusqu'au SNC. Il était donc important d'identifier dans les tissus périphériques les cellules exprimant la PrP^c qui pouvaient être impliquées dans l'ensemble de ces mécanismes de réplication/propagation. Cette recherche entreprise depuis plusieurs années a été confrontée à deux problèmes majeurs.

D'une part, le gène codant pour la PrP a été identifié comme un gène dit "de ménage". L'expression apparemment ubiquitaire de ce gène ne semble pas à même de faire ressortir de spécificité tissulaire voire cellulaire d'expression. Toutefois, il faut remarquer que le gène *prp* est contrôlé dans le temps et dans l'espace au cours de l'embryogenèse. De plus, chez l'adulte, même si la PrP^c est retrouvée dans de nombreuses régions du cerveau (Hippocampe, striatum, les bulbes olfactifs, l'hypothalamus, le cervelet) (Bendheim *et al.*, 1992), l'expression du gène peut varier en localisation et intensité au sein d'une même structure cérébrale montrant l'existence de mécanismes régulateurs.

D'autre part, l'analyse *in vivo* de l'expression de ce gène a présenté, pour une même espèce, de grandes variations en fonction des études. La majorité de ces travaux a fait appel au Northern-Blot, au Western-blot, à l'hybridation *in situ* ou à l'immunohistochimie (Manson *et al.*, 1992; Tanji *et al.*, 1995). Les différences dans les techniques employées pour la fixation des tissus ou la détection de la PrP^c ont été à la base de résultats divergents. Les données ainsi récoltées ont laissé nos connaissances incomplètes et surtout partiellement contradictoires.

La nécessité d'avoir des données plus précises sur l'expression cellulaire de la PrP dans les tissus périphériques a conduit le laboratoire à adopter une nouvelle stratégie d'étude. Cette nouvelle approche consiste en l'utilisation de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur de la "Green Fluorescent Protein" (gfp) placé sous le contrôle de la région 5' non traduite du gène *prp* bovin. La séquence régulatrice utilisée a été isolée d'une banque d'ADN génomique bovin. Après avoir été caractérisé, le domaine 5' non traduit du gène (6,9kb) (comprenant 3,4kb en amont du site d'initiation de la transcription, le premier intron et les deux premiers exons), a été placé en amont du gène codant la GFP. Cette construction a ensuite été microinjectée à des œufs embryonnés de souris. Après sélection, par recherche du transgène, trois lignées de souris transgéniques ont été établies. L'analyse histologique de ces lignées transgéniques a fait apparaître des profils cellulaires d'expression dans les tissus périphériques.

En parallèle, le domaine 5' non traduit du gène *prp* bovin a été séquencé et analysé. La comparaison de la séquence obtenue avec une banque génomique a permis de trouver des régions présentant des similitudes entre l'espèce bovine et humaine. De même, cette analyse a permis d'identifier des sites putatifs de fixation de facteurs de transcription pouvant être impliqués dans la régulation du gène *prp* bovin.

Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice

Catherine Lemaire-Vieille*†, Tobias Schulze*, Valerie Podevin-Dimster*, Jérôme Follet*, Yannick Bailly‡, Françoise Blanquet-Grossard*, Jean-Pierre Decavel*, Ernst Heinen§, and Jean-Yves Cesbron*¶

*Laboratoire de Physiopathologie des Encephalopathies Spongiformes Transmissibles, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U167, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, B.P. 447, 59021 Lille Cedex, France; †Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, UPR 9009 Centre National de la Recherche Scientifique, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France; ‡Institut d'Histologie Humaine, 20 Rue Pitteurs, 4020 Liege, Belgium; and §Laboratoire d'Immunité Anti-Infectieuse, Unité de Formation et de Recherche de Médecine, Université Joseph Fourier, 38706 La Tronche Cedex, France

Communicated by D. Carleton Gajdusek, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France, February 24, 2000 (received for review October 15, 1999)

The expression of the cellular form of the prion protein (PrP^c) gene is required for prion replication and neuroinvasion in transmissible spongiform encephalopathies. The identification of the cell types expressing PrP^c is necessary to understanding how the agent replicates and spreads from peripheral sites to the central nervous system. To determine the nature of the cell types expressing PrP^c, a green fluorescent protein reporter gene was expressed in transgenic mice under the control of 6.9 kb of the bovine PrP gene regulatory sequences. It was shown that the bovine PrP gene is expressed as two populations of mRNA differing by alternative splicing of one 115-bp 5' untranslated exon in 17 different bovine tissues. The analysis of transgenic mice showed reporter gene expression in some cells that have been identified as expressing PrP, such as cerebellar Purkinje cells, lymphocytes, and keratinocytes. In addition, expression of green fluorescent protein was observed in the plexus of the enteric nervous system and in a restricted subset of cells not yet clearly identified as expressing PrP: the epithelial cells of the thymic medullary and the endothelial cells of both the mucosal capillaries of the intestine and the renal capillaries. These data provide valuable information on the distribution of PrP^c at the cellular level and argue for roles of the epithelial and endothelial cells in the spread of infection from the periphery to the brain. Moreover, the transgenic mice described in this paper provide a model that will allow for the study of the transcriptional activity of the PrP gene promoter in response to scrapie infection.

The cellular isoform of the prion protein (PrP^c) is a cell surface sialoglycoprotein with a physiological role that remains largely unknown (1). PrP^c plays a pivotal role in transmissible spongiform encephalopathies in animals and humans. In these neurodegenerative disorders, PrP^c is converted to a pathological form, the PrP^{sc} scrapie form, or PrP^{sc}, by a mechanism that has not been clearly established (2, 3). Unlike PrP^c, PrP^{sc} is partially resistant to protease digestion and contains a large β -sheet content (4). The finding that PrP^{sc} is the major constituent of infectious preparations and that the protein seems to be necessary for infectivity (5-9) has led to the hypothesis that PrP^{sc} is the infectious agent of the disease (10).

Prnp^{0/0} animals are resistant to scrapie infection, indicating the necessity for the infected host cells to express PrP^c to support conversion or replication (11, 12). Cell types expressing PrP^c are therefore candidates for prion replication and spongiform encephalopathy pathogenesis. The only cells that seem to be functionally compromised lie within the nervous system. However, the infectious agent also is present in different lymphoid organs, depending on the host species, route of infection, and

agent strain. In oral infection, which is epidemiologically relevant, it is important to know what happens when the agent gains access to the gastrointestinal tract and which pathways are exploited by the agent to spread throughout the body and attain the central nervous system (CNS). In this regard, it is important to identify in peripheral tissues any cell types expressing PrP that could be involved in propagating prion infectivity.

The PrP^c gene has been described as a housekeeping gene with a preferential expression in neurons (13-15). PrP^c has been shown to be present in various regions of the hamster brain, including cortex, hippocampus, striatum, olfactory bulb, hypothalamus, midbrain, cerebellum, and brainstem (14). However, some regional differences in the abundance and localization have been found, according to different authors (16, 17). PrP^c has been detected by Northern blot and/or Western blot in a large variety of peripheral tissues, including heart, lung, pancreas, testes, and kidney in the rodent (18, 19) and also skeletal muscle and uterus in sheep (15). PrP^c gene expression has also been documented at the cellular level by *in situ* hybridization (20, 21) and immunohistochemistry. The mRNA encoding PrP^c has been shown to be present in the ependymal cells, the epithelial cells of the choroid plexus (13), and the glial cells of the CNS (22). However, in peripheral organs, the identification of PrP^c-expressing cells is much less documented than in the brain. In hamster, PrP^c protein has been found to be present in pneumocytes, in parietal and enteroendocrine cells of the stomach (14), and in cardiomyocytes (13). PrP^c also has been detected on the surface of lymphocytes and of activated T lymphocytes in humans and mice (23, 24) and at higher levels on follicular dendritic cells (25).

To improve our knowledge in the identification of PrP^c-expressing cells, we created transgenic (tg) mice expressing a green fluorescent protein (gfp) reporter gene under the control of the bovine PrP gene regulatory sequences (6.9 kb). In this paper, we show that a 6.9-kb 5' regulatory region targets the

Abbreviations: PrP, prion protein; CNS, central nervous system; gfp, green fluorescent protein; PrP^c, PrP cellular form; PrP^{sc}, PrP scrapie form; UTR, untranslated region; tg, transgenic.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database (accession no. AF163764).

†To whom reprint requests should be addressed. E-mail address: catherine.lemaire@ibl.fr. The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Article published online before print: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 10.1073/pnas.080081197. Article and publication date are at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.080081197

expression of a linked reporter gene to cell populations that express the endogenous murine PrP gene, *Prnp*, such as the cerebellar Purkinje cells, the B and T lymphocytes, and the keratinocytes. Interestingly, we also show gfp expression in the enteric nervous system and in a limited number of other cells: epithelial cells of the thymic medulla and endothelial cells of the intestine and kidney. These results suggest a possible role of these cells in the spread of the disease from the peripheral tissues to the CNS.

Materials and Methods

Genomic DNA Clones. A genomic library constructed in λ FIXII replacement vector (CLONTECH) was screened with a PCR-amplified fragment corresponding to a previously sequenced region of 800 bp located upstream from the transcription initiation site of the bovine PrP gene (26). Two overlapping λ clones spanning \approx 30 kb were isolated and analyzed. A 10-kb EcoRI restriction fragment of the genomic DNA was subcloned into a pBluescript vector (Stratagene) for the further construction of the transgene.

PCR Analysis. All tissues were dissected from freshly slaughtered cattle and frozen in liquid nitrogen before processing. Total RNA was extracted and purified with the RNA NOW kit (Biogenetex, Seabrook, TX) as recommended by the supplier. For cDNA synthesis, 2 μ g of total RNA was heat-denatured for 3 min at 70°C and reverse-transcribed with 200 units of Super- script II RNaseH Reverse Transcriptase (Life Technologies, Paisley, Scotland) in 20 μ l of IX incubation buffer (provided by the supplier) supplemented with 10 mM DTT, 1 mM dNTP, 1 unit/ μ l RNasin (Promega), and 0.5 μ g of (dT)₁₂₋₁₈ is primers (Amersham Pharmacia). Two microliters of each cDNA reaction was subjected to PCR amplification with 25 pmol each of the sense and antisense primers in 50 μ l lx PCR buffer, 0.2 mM dNTP, and 1 unit recombinant *Taq* DNA polymerase (Life Technologies). PCRs were performed on a Gene Amp System 9600 thermo-cycler (Perkin-Elmer). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, Southern blotting, and hybridization to different probes specific to the transcripts being analyzed. For amplification of the 5' untranslated region (UTR), sense primer (GCCAGTCGCTGACAGCCGCA) designed from the exon 1 genomic sequence and antisense primer (ACATGGCCACAAAGAGAACC) designed from the ORF genomic sequence were used in the following conditions: 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s.

Construction of PrP-gfp Transgene. The reporter gene construct consisted of the bovine 6.9-kb PrP gene promoter fragment followed by the gfp reporter gene and simian virus 40 poly(A) signal sequence. Briefly, a 10-kb EcoRI genomic fragment containing 4 kb of exon 1, intron 1, and exon 2 upstream from the transcription initiation site of the bovine PrP gene was subcloned in the pBluescript II vector (Stratagene) and double-digested with NheI and XhoI. A 3.4-kb fragment containing 800 bp upstream from exon 1, followed by the two untranslated exons previously was amplified by PCR on bovine genomic DNA, cloned into TA cloning vector (Invitrogen; data not shown), and double-digested with NheI and PstI. A 4.1-kb XhoI/NheI fragment and a 2.8-kb NheI/PstI fragment generated from the two digested constructs were ligated together into the XhoI/PstI-digested pEGFP-1 vector (CLONTECH). The 6.9-kb fragment was entirely sequenced by using double-stranded templates, the ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer), and either forward or reverse M13 sequencing primers or specific oligonucleotides.

Production of tg Mice. tg mice were generated as described before (27). Briefly, tg mouse lines were established by injecting the cesium chloride-gradient-purified fragment of PrP-gfp into the pronuclei of outbred C57BL6/SJL fertilized eggs. The integration of the transgene was investigated by dot-blot analysis using 5 μ g of tail DNA and screening with a ³²P-labeled fragment corresponding to the gfp ORF. In 84 newborn mice, 4 were tg. Subsequent mating of heterozygous mice resulted in the development of a homozygous line of tg mice. for further histological examination of the reporter gene expression in various organs.

Histology. Under phenobarbital anesthesia, 4-week-old animals were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.5. The organs of interest were removed, fixed for 2 h in 4% paraformaldehyde in PBS, and then incubated overnight in 20% sucrose in PBS, frozen (at -70°C), and embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek Europe, The Netherlands). Frozen sections (7 μ m thick) were cut at -20°C with a Jung Frigocut 2800E (Reichert-Jung, Leica Instrument, Germany) and mounted either unstained in Mowiol 4-88 (Calbiochem) or after counterstaining with Mayer's hematoxylin and eosin solution. The fluorescence of gfp was viewed under a Zeiss Axiophot 2 epifluorescence microscope equipped with an HbO 100-W UV source using filter sets 10 or 24 (Zeiss).

Immunohistology. A biotin-conjugated monoclonal antibody, 8G8, directed against the human PrP molecule (28) was used to probe for PrP in cryosections prepared as described before. Sections were immersed in acetone at -20°C for 10 min and dried for 2 h at room temperature. Endogenous biotin and endogenous peroxidase were quenched by incubating the sections for 10 min with Biotin Blocking System (Dako) and with 3% hydrogen peroxide, respectively. After washing, the sections were incubated for 1 h at room temperature with biotinylated 8G8 antibody diluted 1:70. Staining was developed by using Dako labeled streptavidin-biotin 2 kit peroxidase as recommended by the supplier.

Flow Cytometry. Ficoll-isolated lymphocytes from peripheral blood were washed and resuspended in PBS containing 1% BSA (Sigma). Cells then were incubated for 30 min at 4°C with R-phycoerythrin-conjugated anti-mouse CD19, Cy-chrome-conjugated anti-mouse CD3 (Becton Dickinson), or biotinylated anti-PrP antibody (8G8). Cell preparations were washed, treated with FITC-conjugated streptavidin to reveal biotinylated anti-PrP antibody, and analyzed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson). The FL1 emission channel normally used for FITC was used for monitoring green fluorescence of the reporter gene.

Results

Isolation and Characterization of Genomic Clones. To isolate the bovine PrP gene 5' flanking region, a λ FIXII bovine genomic library (CLONTECH) was screened with a probe generated from the 5' region of the bovine PrP gene (29). Library screening resulted in the isolation of two λ clones spanning \approx 30 kb and including 10 kb upstream from the 5' initiation start site (Fig. 1). The location of the two individual untranslated exons (1 and 2) and the length of intron within the bovine PrP gene 5' flanking region were determined by a combination of Southern blot analysis, PCR, and DNA sequencing and confirmed the data of Yoshimoto et al. (29). A 6.9-kb genomic fragment containing 3.4 kb of the promoter region followed by the two untranslated exons was subcloned and sequenced in full. The 3' region of the genomic fragment contained 3400 bp that were identical to the reported sequence of the bovine PrP gene. The 5' region of 3500 bp represents the newly sequenced fragment (GenBank accession no. AF163764).

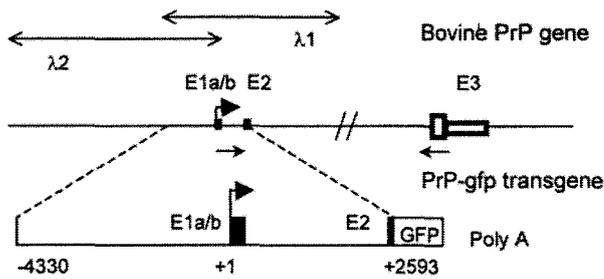


Fig. 1. Schematic representation of the bovine PrP gene and structure of the transgene used in this study. Exons (E) are numbered, and exon 1 and exon 2 are indicated by solid boxes. Within exon 3, the PrP ORF is shown by an open large box, and the mRNA 3' UTR is represented by an open small box. The lengths of exons 1a, 1b, 2, and 3 are 53, 115, 98, and 4554bp, respectively. The transcription initiation site is designated with a solid arrow (30). The positions of the two phages ($\lambda 1$ and $\lambda 2$) spanning the PrP gene are indicated. The primers used for the analysis of the 5' UTR are shown by thin arrows (not to scale). The transgene encompasses 6.9 kb of the upstream sequences fused to the gfp reporter gene. GFP, gfp gene ORF; Poly(A), the simian virus 40 polyadenylation signal. Positions are bp with respect to the transcription initiation site.

5' UTR Exons and Alternative Splicing. The identification of an 115-nt alternative exon (Ib) located immediately downstream of the 53-nt exon 1 has been reported previously in bovinds (30). However, the alternative splicing has been studied on a limited number of organs. We decided to further explore the alternative splicing in RNA samples from 17 different organs from cattle. RNA extracts from cerebrum, cerebellum, heart, liver, lung, skeletal muscle, kidney, intestine, skin, lymph node, mesentery, retina, optic nerve, tonsil, spleen, thymus, and adrenal gland were analyzed by reverse transcription-PCR. The amplification using sense exon 1a- and antisense exon 3-specific primers (Fig. 1) generated a 350-bp fragment in addition to a 250-bp fragment. Southern blot and hybridization with four different exon-specific oligonucleotide probes (exons 1a, 1b, 2, and 3) showed that the 250-bp fragment contained exon 1a and exon 2, and the 350-bp fragment contained exons 1a and 1b and exon 2 (Fig. 2). These two transcripts were present in all of the organs tested, and no other 5' splice variants were detected. The detection of the two transcripts in the spleen (Fig. 2A and C) contrasts with previous data showing that the exon 1b-containing fragment was not detected (30). This discrepancy can be explained by the use of exon-specific probes that increased the sensitivity of the method.

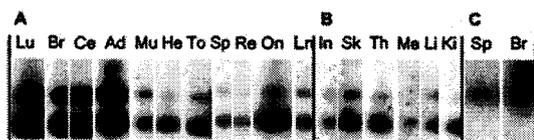


Fig. 2. Coexpression of the two different bovine PrP 5' UTR exons in 17 different tissues RNA fractions were subjected to reverse transcription-PCR using primers specific to exon 1a and exon 3. The PCR products were analyzed by Southern blot hybridization with a 32 P-labeled oligonucleotide specific for exon 1a (A and B). The hybridization revealed two fragments (250 and 350 bp). Hybridization with a 32 P-labeled oligonucleotide specific for exons 3 or 2 gave identical results. Hybridization with an exon 1b-specific oligonucleotide revealed only the 350-bp fragment, as shown for brain and spleen (C). All tissues tested gave identical results (data not shown). Lu, lung; Br, brain; Ce, cerebellum; Ad, adrenal gland; Mu, skeletal muscle; He, heart; To, tonsil; Sp, spleen; Re, retina; On, optic nerve; Ln, lymph node; In, intestine; Sk, skin; Th, thymus; Me, mesentery; Li, liver; Ki, kidney. A and B differ by the autoradiography exposure conditions, 2 h at room temperature or at -80°C , respectively. Autoradiography in C was exposed overnight at -80°C .

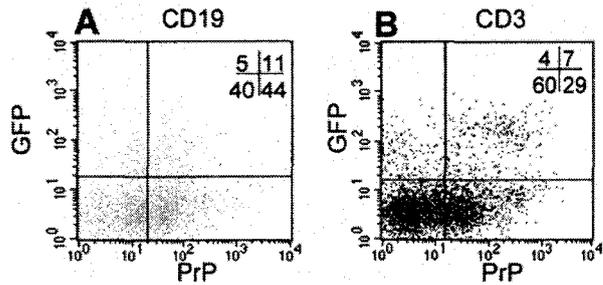


Fig. 3. Analysis of gfp and PrP expression from tg mice (L64) by fluorescence-activated cell sorter on peripheral blood leukocytes, gated for B (A) and T (B) lymphocytes. B cells were stained with R-phycoerythrin-conjugated anti-mouse CD19 antibody, T cells with Cy-chrome-conjugated anti-mouse CD3 molecular complex antibody (Becton Dickinson), and PrP-expressing cells with biotinylated anti-PrP antibody (8G8). The percentage of positive cells is indicated in the upper right corner.

Generation of tg Mice Expressing Bovine PrP Gene Promoter. The splicing analysis of the 5' flanking region of the bovine PrP gene suggested that this region might play a role in the control of PrP gene expression. Thus, the 6.9-kb fragment previously described was used for the construction of the tg mice. The 5' flanking region, spanning positions -4330 to +2593 (numbered in relation to the transcription initiation start site), was fused to the 0.8-kb DNA fragment containing the entire coding sequence of gfp, followed by 0.2 kb of DNA containing the simian virus 40 polyadenylation signal (Fig. 1). Before microinjection, the resulting PrP-gfp construct was tested in vitro by transient transfection assays using Chinese hamster ovary cells. Specific fluorescence was observed for the PrP-gfp construct, but not with the vector alone or with the same PrP construct placed in the opposite orientation (data not shown).

Four different founder mice (L21, L41, L61, and L64) were generated, each of which transmitted the transgene. The integration pattern of the transgene and the copy number were determined by Southern blot analysis as approximately 5, 15, 45, and 80 integrated copies for lines 61, 64, 21, and 41, respectively (data not shown). Subsequent mating of heterozygous mice resulted in the development of a homozygous line of tg mice.

Tissue-Specific Expression of gfp Under the Control of the Bovine PrP Gene Promoter. The homozygous tg mice were used subsequently to examine the tissue-specific expression of the bovine PrP gene promoter. The four tg lines were analyzed fully and showed a similar fluorescence pattern with a good correlation between the fluorescence intensity and the level of gfp transcripts detected by reverse transcription-PCR (data not shown). This experiment allowed us to demonstrate the presence of two gfp transcripts differing by the alternative splicing of the exon 1b (data not shown). In addition, we did not detect any aberrant transcript, which could be because of the presence of a cryptic splice site present in the transgene that could cause splicing of the gfp ORF. These data indicate that the splicing of the untranslated exons occur specifically in tg mice.

Mouse line 64 was chosen for the following analysis based on preliminary examination of histological sections, which displayed more intense staining than in the other founder mice. To determine whether the transgene expression coincided with the endogenous PrP gene expression, levels of gfp transgene and endogenous PrP were measured by FACS analysis from B and T lymphocytes in freshly isolated peripheral blood lymphocytes. The results of this experiment can be seen in Fig. 3, where 16% of B lymphocytes and 11% of T lymphocytes displayed gfp fluorescence. Among the gfp-positive cells, 69% and 63% ex-

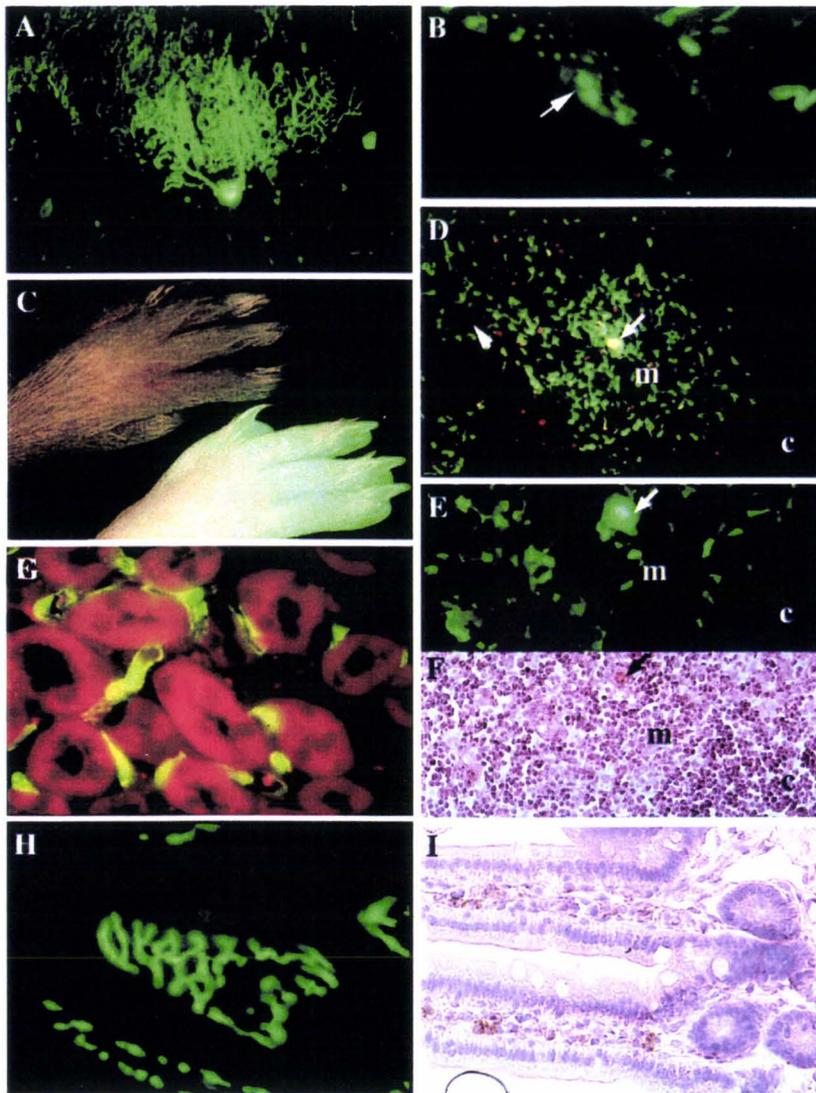


Fig. 4. Analysis of reporter gene expression in PrP-gfp tg mice (L64). (A) Coronal section of cerebellar cortex in which the transgene is expressed in Purkinje neurons. (x200.) (B) Section of the wall of the small intestine showing fluorescence in the ganglion cells in the enteric nervous system. (x200.) (C) Fluorescence picture of the foot from the *gfp* tg mice (Lower) and their littermate controls (Upper). (D and E) Sections of thymus showing fluorescence in the epithelial cells of the medulla (m) around the Hassall's corpuscles (arrow), c, cortex. (x40 (D) and x200 (E).) (F) Thymus section stained with eosin and hematoxylin. (G) Serial sections of renal cortex showing fluorescence in the endothelial cells of the capillaries around the tubules. (X200.) (H and I) Sections of small intestine of *gfp*-tg mice (H) and wild-type mice stained with anti-PrP 8G8 antibody (1:200) (I). (x200.)

press the endogenous PrP^c in B and T lymphocytes, respectively. *prnp* gene expression is present in lymphocytes shown to express *gfp*, and these data are in agreement with previous reports showing that B and T lymphocytes express the *prnp* gene (23, 24). We noted that $\approx 5\%$ of lymphocytes were *gfp*-positive and did not express *prnp*, and $\approx 35\%$ were PrP-positive and did not express *gfp*. This result could account for a loss of *gfp* fluorescence during the experiments and/or a lower activity in these cells of the 6.9-kb PrP gene promoter as compared with the endogenous murine *Prnp* promoter. Flow cytometric analysis also was performed on lymphoid organs, and we found fluorescent B and T lymphocytes (data not shown). An extensive identification of the subpopulations will need to be performed. These data, taken together with the splicing analysis, suggest that

the 6.9-kb 5' flanking DNA of the bovine PrP gene contains cis-acting elements that bind specific transcription factors and specific splice factors that are conserved between bovines and mice, indicating that the PrP-*gfp* tg mice could be a relevant model in which to study the cellular expression of the *Prnp* promoter.

Thus, we investigated the expression of the reporter gene by histologic analysis of frozen sections of various organs. In the brain of tg mice, *gfp*-expressing neurons were seen in the gray matter of the cortex as well as in subcortical structures. In the cerebellar cortex, intense fluorescence resulting from *gfp* expression could be detected in Purkinje cells (Fig. 4A). These results will be described extensively by Y.B., C.L.-V., T.S., A. M. Haeberle, G. Bombarde, V.P.-D., J.-P.D., F.B.-G., J.F., J. Grassi,

and J.-Y.C. in a distinct report. Concerning the peripheral nervous system, *gfp* expression was observed in the optic nerve (data not shown), in the sciatic nerve, and at the neuromuscular junction (data not shown). Regarding the autonomic nervous system, large cell bodies belonging to the Auerbach's and Meissner's plexuses of the gut showed a strong green signal (Fig. 4B).

The *tg* mice exposed under the UV light exhibited very clearly a fluorescent signal in the skin, the nails, and the hair (Fig. 4C). Histological analysis of the skin showed a fluorescence signal in basal and spinocellular keratinocytes and in the external root sheet of the hair follicles and their associated sebaceous gland (data not shown). Histological observations of thin sections of the thymus revealed a large number of fluorescent cells with a branching appearance and located mainly throughout the medulla (Fig. 4D). A radiating cluster of fluorescent cells was concentrated around Hassal's corpuscles, which were also highly fluorescent (Fig. 4D and E). The serial section stained with eosin and hematoxylin in Fig. 4F showed clearly the presence of a large Hassal's corpuscle that was fluorescent (Fig. 4E). Their distribution and morphological properties indicate that they are typical medullary epithelial cells. In the spleen, mesenteric lymph nodes, and Peyer's patches, we observed isolated fluorescent cells, some of them with a dendritic aspect. More extensive identification of these cells with flow cytometric analysis is needed. In the gastrointestinal tract, intensive green fluorescence of endothelial cells was observed in the mucosal capillaries and venules within the lamina propria mucosa of the intestinal villi (Fig. 4H and in the small vessels of the submucosa. This result was confirmed by immunohistochemistry by using an anti-Pi P antibody (Fig. 4I). Nonrelated IgG2a used as a control gave negative results, as did omission of the primary antibody. Fluorescent endothelial cells also were seen in the capillaries along the tubules of the renal cortex (Fig. 4G), as well as along the loop of Henle in the medulla. Microscopic observation of other tissues, including lung, pancreas, liver, and smooth and skeletal muscle, revealed extremely low numbers of positive cells that could not be identified.

Discussion

The mechanism of the PrP^c to PrP^{sc} conversion does not occur in scrapie-infected Prnp^{0/0} animals, indicating the necessity for the infected host cells to express PrP to support conversion or replication (11, 12). The identification of cell types expressing PrP^c is necessary to understanding how the agent replicates and spreads from the periphery to the CNS. The mammalian Prnp gene has been described as a ubiquitous gene, with little known regarding gene regulation (26, 31, 32). The cellular specificity of the Prnp gene is based mainly on the data from PrP immunohistochemistry studies (14, 16, 33) and in situ hybridization (13, 20, 21, 34). However, some data are contradictory and may be explained by the techniques used or by the low level of PrP expression in nonneural cells. To better investigate the cellular-specific expression of the Prnp gene, we created *tg* mouse lines containing 6.9 kb of the bovine PrP gene 5' regulatory region fused to the *gfp* reporter gene.

The characterization of the bovine PrP gene allowed us to demonstrate the existence of two transcripts, which were generated by the alternative splicing of one 115-bp 5' exon to a splice acceptor site within the 5' UTR of the gene. The two transcripts were detected in all bovine tissues we examined, including splenic tissue. This result contrasts with a report (30) in which only the 250-bp exon 1a transcript was detected in the spleen. A biological explanation for the predominant expression of the shorter transcript over the longer transcript in all tissues tested needs further investigations. At present, it is unclear whether splicing of the bovine PrP mRNA in the 5' UTR represents an important regulatory mechanism involved in tissue- or cell-

specific expression, mRNA stability, or mRNA translatability, as found in other genes (35, 36).

In this context, we choose to express, in *tg* mice, the *gfp* reporter gene under the control of the 5' genomic region of the bovine PrP gene, including the regulatory region upstream from the transcription initiation site followed by the 5' noncoding exons. We are aware that this model has little chance to reconstitute totally the expression of the endogenous gene because of the lack of large, genomic sequences that could putatively regulate the gene, and because of the influence of the insertion site on the *tg* expression. However, the analysis of the PrP-*gfp* *tg* mouse lines shows that the cellular specificity of the reporter gene expression correlates quite well with the endogenous Prnp gene expression. For instance, the cerebellar Purkinje cells (16, 20, 21, 34) in the brain (37), the keratinocytes in the skin (38), and the lymphocytes (23, 24) have been described previously as expressing PrP^c and are *gfp*-fluorescent in the *tg* mice. This result indicates that the 6.9kb segment of the 5' UTR region of the bovine PrP gene is sufficient to direct the expression of *gfp* in these cells. It is noteworthy that the expression of the transgene, which lacks the large intron, was observed in cerebellar Purkinje cells, because this result is in contrast with the observations of Shmerling et al. (39) and Fischer et al. (40), who propose that there might be a Purkinje cell-specific enhancer in the large intron. Our data suggest that it is not the case.

The expression of the reporter gene in endothelial and epithelial cells strongly suggests that these cell types normally express the Prnp gene. It has been reported in keratinocytes (38), and we observed PrP^c on the endothelial cells of the intestinal villi (Fig. 4H). In the thymus, an intense *gfp* fluorescence of the epithelial cells and Hassal's corpuscles is restricted in the medullary region. In mice, thymus accumulates infectivity very early after the infection by introduction of the scrapie agent into various peripheral sites (41, 42), and Muramoto et al. (43) have shown the presence of PrP^{sc} in the thymus of mice infected with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). The thymus is devoid of both B lymphocytes and follicular dendritic cells, which have been claimed to support the initial replication of the scrapie agent (25, 44-46). Thus, our data support the hypothesis that epithelial cells could accumulate or replicate prions in the thymus and could provide an interface between the lymphoreticular system and the peripheral nerves that permit neuroinvasion to occur. The fact that only epithelial cells from the skin and the thymus are *gfp*-positive suggests that these two epithelial cell subtypes contain common transcription factors able to activate the 6.9-kb sequence of the 5' flanking bovine PrP gene.

The presence of *gfp* in the endothelial cells of the blood capillaries in the intestinal villi of the digestive tract is of particular interest. These observations correlate well with a recent report demonstrating PrP^{sc} accumulation in the endothelial cells of the blood capillaries in the small intestine of zoo lemurs after an oral infection (47). However, contrary to our results, the same authors also have reported the presence of PrP^{sc} in the epithelial cells lining the lumen of the digestive tract. In our *tg* mice, we do not observe fluorescence signal in enterocytes, Paneth cells, endocrine cells, or stem cells. The reason for this incongruence is still unclear and could be the low activity of the Prnp promoter in these cells. Importantly, both the report by Bons et al. (47) and our observations suggest that endothelial cells of blood vessels in the intestinal villi could play a role in the propagation of the infectious agent after an oral challenge. In addition, intensive *gfp* fluorescence was observed in the neurons of the Meissner and Auerbach's plexuses along the digestive tract of *tg* mice. Thus, this report suggests that PrP^{0/0} could be expressed in the neurons of the enteric nervous system. This observation is supported by the recent description of the accumulation of PrP^{sc} in the enteric nervous system in scrapie-affected sheep

(48). Intramural plexuses are present throughout the entire length of the, gastrointestinal tract and have extensive, connections with the autonomous nervous system. Thus, our data suggest that the Auerbach's and Meissner's plexuses could also be a way for the agent to reach the nervous system after an oral infection. The endothelial cells of the renal capillaries also express the *gfp* reporter gene. PrP^c has been detected by Western blot in hamster kidney (14), but the authors were unable to determine by immunohistochemical means the cellular localization of PrP^c within this tissue. Furthermore, the potential infectivity of this organ has never been reported (43).

In conclusion, we have shown that the 6.9-kb 5' flanking region of the bovine PrP gene is sufficient to promote *gfp* expression in the nervous system as well as in peripheral tissues, and that the transgene seems to obey the endogenous murine Prnp regulatory mechanism. These data provide valuable insights on the distribution of PrP^c in mammalian tissues and point out the potential importance of epithelial and endothelial cell subtypes in the replication and spread of the agent from the periphery to the CNS. The possible role of these cells in scrapie

pathogenesis has not yet been investigated. Our *gfp-tg* mice provide a model for further analysis of the modulation of transcriptional activity of the Prnp gene in vivo during scrapie infection and in vitro by the use of trans-acting factors, such as cytokines and pharmacological agents. In addition, our *tg* mice provide an attractive analysis model to those who study a specific subpopulation of cells such as the thymic epithelial cells or the endothelial cells of the intestinal villi.

We thank Nathalie Maessian for technical help and Dr. A. Burny for the bovine genomic library. We also thank Prof. J. R. Barta and Dr. S. Saule for critical reading of the manuscript. J.F. is supported by a fellowship of the Ministère de la Recherche et de la Technologie Française. This work is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie Française "Programme de Recherche sur les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles et les Prions" (Action Concertée Coordonnée no. 1 (1997)). and Economic European Community Food Agro-Industry Research Grant JCT 6022 to E.H. and J.Y.C.

1. Prusiner, S. B. (1998) *Pmc Nail. Acuil. Sci USA* 95, 13363-13383.
2. 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) *Cell* 63, 673-686.
3. 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) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90, 10962-10966.
4. Caughey, B. W., Dong, A., Bhal, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. & Caughey, W. S. (1991) *Biochemistry* 30, 7672-7680.
5. Bolton, D. C., McKinley, M. P. & Prusiner, S. B. (1982) *Science* 215, 13U9-1311.
6. Diringe, H., Hilmert, H., Simon, D., Werner, E. & Fillers, B. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 555-560.
7. McKinley, M. P., Bollon, D. C. & Prusiner, S. B. (1983) *Cell* 35, 57-62.
8. Prusiner, S. B., Groin, D. F., Bollon, D. C., Kent, S. B. & Hood, L. E. (1984) *Cell* 38, 127-134.
9. Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D.F., Kenaga, L. & Prusiner, S. B. (1988) *J Biol Chem* 263, 41, 150-4955.
10. Prusiner, S. B. (1991) *Science* 152, 1515-1522.
11. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993) *Cell* 73, 1339-1347.
12. Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L. & DeArmond, S. I. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11)608-10612.
13. Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Merz, G. S., Wolfe, G. C., Wisniewski, H. M. & Robakis, N. K. (1990) *Acta neuropathol.* 80, 1-6.
14. Bendheim, P. E., Brown, H. R., Rudel, R. D., Scala, L. J., Goller, N. L., Wen, G. Y., Kascak, R. J., Cashman, N. R. & Bolton, D. C. (1992) *Neurology* 42, 149-156.
15. Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N. & Shinagawa, M. (1995) *J Gen Virol.* 76, 2583-2587.
16. DeArmond, S. J., Mobley, W. C., DeMott, D. L., Barry, R. A., Beckstead, J. H. & Prusiner, S. B. (1987) *Neurology* 37, 1271-1280.
17. Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Fauchoux, B., Di Giamberardino, L. & Moya, K. J. (1998) *Eur J Neurosci.* 10, 2464-2471.
18. 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) *Cell* 40, 735-746.
19. Robakis, N. K., Sawh, P. R., Wolfe, G. C., Rubenstein, R., Carp, R. I. & Innis, M. A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6377-6381.
20. Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H. & Hope, (1992) *Development* 115, 117-122.
21. Tanji, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., Takeda, M., Hirasawa, K., Doi, K., Matsumoto, Y. S., Onodera, T. (1995) *Intervirology* 38, 309-315.
22. Moser, M., Colello, R. J., Pott, L. I. & Oesch, B. (1995) *Neuron* 14, 509-517.
23. Mabbott, N. A., Brown, K. L., Manson, J. & Bruce, M. E. (1997) *Immunology* 92, 161-165.
24. Cashman, N. R., Loerlschel, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascak, R. J., Bolton, D. C. & Bendheim, P. E. (1990) *Cell* 61, 185-192.
25. McBride, P. A., Eikelenboom, P., Kraal, G., Fraser, H. & Bruce, M. E. (1992) *J. Pathol.* 168, 413-418.
26. Inoue, S., Tanaka, M., Horinchi, M., Ishiguro, N. & Shinagawa, M. (1997) *J. Vet. Med. Sci.* 59, 175-183.
27. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. & Lacy, E. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed.
28. Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. & Bodemer, W. (1996) *Mol. Med.* 2, 725-734.
29. Yoshimoto, J., Iinuma, T., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Imamura, M. & Shinagawa, M. (1992) *Virus Genes* 6, 343-356.
30. Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y. & Shinagawa, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 650-654.
31. Saeki, K., Matsumoto, Y., Matsumoto, Y. & Onodera, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 47-52.
32. Baybult, H. & Manson, J. (1997) *Gene* 184, 125-131.
33. Fourniel, J., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T., Robain, O., Lasmez, C. I., Deslys, J. P., Donnont, D. & Brown, P. (1998) *Celt Tissue Res.* 292, 77-84.
34. Harris, D. A., Leie, P. & Snider, W. D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4309-4313.
35. Sachs, A. B. (1993) *Cell* 74, 413-421.
36. Brawer, G. (1987) *Cell* 48, 5-6.
37. Sarkozi, E., Askanas, V. & Engel, W. K. (1994) *Am. J. Pathol.* 145, 1280-1284.
38. Pammer, J., Weninger, W. & Tschachler, E. (1998) *Am. J. Pathol.* 153, 1353-1358.
39. Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., et al. (1998) *Cell* 93, 203-214.
40. Fischer, M., Rulicke, T., Raebler, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996) *EMBO J.* 15, 1255-1264.
41. Eklund, C. M., Kennedy, R. C. & Hadlow, W. J. (1967) *Infect. Dis.* 117, 15-22.
42. Fraser, H. & Dickinson, A. G. (1978) *J. Comp. Pathol.* 88, 563-573.
43. Muramoto, T., Kitamoto, T., Tateishi, J. & Goto, I. (1992) *Am. J. Pathol.* 140, 1411-1420.
44. Kitamoto, T., Muramoto, T., Moliri, S., Doh-Ura, K. & Tateishi, J. (1991) *J. Virol.* 65, 6292-6295.
45. Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raebler, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M. & Aguzzi, A. (1997) *Nature (London)* 390, 687-690.
46. Raebler, A. J., Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1999) *EMBO J.* 18, 2702-2706.
47. Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D. C. & Brown, P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4046-4051.
48. van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P. S., Smits, M. A. (1999) *Comp. Pathol.* 121, 55-63.

3. Discussion

L'expression de la PrP^c joue un rôle essentiel dans la pathogénèse des ESSTs. La fonction de cette protéine demeure une énigme. Toutefois, il a été clairement établi, après inoculation par voie périphérique, que l'expression du gène *prp* est une condition *sine qua none* à la réplication extraneuronale de l'agent infectieux, à la neuroinvasion de cet agent et au développement des signes cliniques de la maladie. L'identification des cellules exprimant la PrP^c permettrait d'identifier les acteurs de la réplication/propagation de l'agent dans les tissus périphériques. Jusqu'à présent, l'identification des cellules exprimant le gène codant pour la PrP s'est confrontée à la diversité et parfois à la contradiction des résultats précédemment obtenus.

Dans le cadre de ce travail, l'utilisation de souris transgéniques offre différents avantages par rapport à une approche en culture cellulaire de l'expression du gène *prp*. Tout d'abord, le transgène est retrouvé dans tous les types cellulaires de l'organisme modifié génétiquement ce qui permet d'étudier des cellules qui sont difficiles à cultiver ou à transfecter. Ensuite, le transgène est retrouvé dans la souris transgénique sous une configuration chromatinienne normale avant la différenciation des cellules qui expriment le gène rapporteur. Ce qui contraste avec les études par transfection transitoire où le transgène est introduit sous la forme d'ADN nu. De plus, le profil transcriptionnel d'une cellule est sujet à de nombreuses régulations qui sont influencées par le microenvironnement de la cellule. Or, cet environnement n'est que trop partiellement reproduit en culture cellulaire. Ainsi, le modèle de souris transgéniques apporte une approche et des observations plus physiologiques de l'expression de gène *prp*.

Toutefois, le modèle présenté peut ne pas reconstituer totalement l'expression du gène endogène à cause du manque de larges séquences génomiques qui peuvent intervenir dans la régulation. De même, le site d'insertion du transgène chez la souris peut représenter une source de variabilité d'expression du transgène vis à vis du gène endogène. Cette insertion dans des domaines silencieux du génome aurait pu conduire à l'inactivation du transgène. Toutefois, l'analyse des souris *bPrP-gfp* a montré que la spécificité d'expression cellulaire de la GFP se corrèle bien avec l'expression du gène *prnp* endogène.

Les résultats obtenus ont mis en évidence l'expression du transgène dans de nombreux compartiments périphériques. Dans le thymus, une intense fluorescence est observée dans les cellules épithéliales et dans le corpuscule de Hassal de la région médullaire. Ainsi, chez la

souris, l'accumulation précoce de l'infectivité dans le thymus après inoculation par voie périphérique (Eklund *et al.*, 1967; Fraser & Dickinson, 1978; Maignien *et al.*, 1999) pourrait être rapprochée de ces cellules qui expriment la GFP et donc potentiellement la PrP^c. Le thymus, étant dépourvu de lymphocytes B et de cellules folliculaires dendritiques, pourrait accumuler ou répliquer l'agent par les cellules épithéliales et servir, par conséquent, d'interface entre le SLR et le SNP. De plus, les résultats obtenus suggèrent que les cellules épithéliales de la peau et endothéliales du thymus pourraient avoir un mécanisme de transcription commun. Ce dernier interviendrait dans la région 5' non traduite de 6,9kb du gène *prp* bovin. L'analyse de cette région a fait apparaître, notamment dans le premier intron, la présence de 4 sites de fixations putatifs pour le facteur de transcription Whn. Il a été montré que la défection de ce facteur est responsable du phénotype *nude* chez la souris (Nehls *et al.*, 1994). Or ces souris sont caractérisées par une absence de thymus et des anomalies au niveau de la peau. L'ensemble de ces données laisse suggérer que le facteur de transcription Whn pourrait intervenir dans la régulation du gène *prnp*.

La présence d'une forte fluorescence dans les neurones des plexus de Meissner et de Auerbach suggère une expression de la PrP^c dans le SNE. Cette observation a été par la suite confirmée pour le SNE humain (Shmakov *et al.*, 2000) et ovin (van Keulen *et al.*, 1999a). Or, les plexus intramuraux sont présents tout au long du tractus gastro-intestinal. Ils sont constitués de péricaryons de neurones post-ganglionnaires parasympathiques, de corps cellulaires de neurones senseurs et d'interneurones. Ces plexus ont de nombreuses connexions synaptiques avec le système nerveux autonome et notamment des fibres du nerf vague. Or, l'agent infectieux peut être retrouvé dans les noyaux moteurs dorsaux du nerf vague laissant suggérer que les plexus de Meissner et d'Auerbach sont des voies d'entrée de l'agent infectieux après inoculation par voie orale.

Au niveau du tractus digestif, la présence de la fluorescence dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins des villosités intestinales est là aussi particulièrement intéressante. En effet, les travaux de Noëlle Bons (Bons *et al.*, 1999) ont montré une accumulation de la PrP^{Sc} dans ces cellules issues de lémures infectés par voie orale. De plus, ces capillaires sont en contact étroit avec les fibres adrénergiques du SNS. Or, une voie de pénétration de l'agent infectieux dans la moelle épinière passe au niveau des vertèbres thoraciques qui sont les zones d'insertion des fibres nerveuses du SNS. Ainsi, les cellules endothéliales pourraient servir de relais pour les prions, entre le tractus digestifs et les fibres du SNS.

Les cellules endothéliales pourraient également être impliquées dans les mécanismes de

franchissement de la barrière hémato-encéphalique. On observe en effet dans certaines ESSTs une augmentation de la perméabilité de cette barrière hémato-encéphalique qui pourrait être due, pour les cellules endothéliales, à une perte de fonction de la PrP^c ou à une accumulation de sa forme pathologique, la PrP^{Sc} (Wisniewski *et al.*, 1983).

Finalement, les résultats obtenus ont permis de mettre en exergue certains compartiments impliqués dans la propagation de l'agent infectieux tels que le thymus (infectieux chez des souris inoculées avec la souche de prion C506M3 (Maignien *et al.*, 1999)), le SNE et le SNS ainsi que le système vasculaire.

Parallèlement aux résultats histologiques, ce travail a permis d'aborder les mécanismes de régulation du gène. L'analyse de l'épissage alternatif au niveau de l'exon 1, qui se subdivise en exon 1a et 1b, n'a pas fait apparaître de mécanisme tissu spécifique de l'épissage du gène. Les deux types d'ARNm ont pu en effet être caractérisés dans les différents tissus étudiés.

La comparaison des séquences en 5' entre les gènes *prp* bovin, ovin et humain a révélé d'importants domaines homologues entre ces espèces. Plus particulièrement, le gène bovin et ovin ont présenté une homologie de séquence de 96% et l'alignement entre les séquences bovine et humaine a fait apparaître 10 domaines distincts présentant une similitude de séquence pouvant aller jusqu'à 77%. La conservation de tels domaines entre les espèces suggère la présence de régions fonctionnellement importantes et probablement de sites régulateurs de la transcription du gène *prp*. L'analyse informatique de ces régions a montré la présence de sites putatifs de fixation de facteurs de transcription déjà décrits pour le gène *prp* tels que SP1 ou AP2. Toutefois, elle a également permis de mettre en évidence d'autres sites de fixations pour les facteurs Brn-2, Krox 20 et NF-κB.

Le facteur de transcription Brn-2 est un membre de la classe III de la famille des facteurs à domaine POU. Plusieurs facteurs de cette famille sont impliqués dans l'embryogénèse et la réplication cellulaire. Les facteurs de ce groupe sont essentiellement exprimés dans le SNC. Les expériences visant à supprimer les domaines POU ont montré le rôle de ces facteurs dans les derniers stades de différenciation neuronale tels que la migration, la guidage axonal, et la survie des neurones (Ryan & Rosenfeld, 1997).

Les membres de la famille de facteurs de transcription à motif en doigt de Zinc Krox (Egr chez l'homme) sont très fortement exprimés dans le système nerveux. Ils jouent un rôle critique dans le développement du SNC, et dans la différenciation phénotypique des cellules de Schwann (Scherer, 1997). Ces facteurs ont également été caractérisés dans les mécanismes apoptiques au cours de certaines maladies neurodégénératives telle que la maladie

d'Alzheimer (MacGibbon *et al.*, 1997).

Enfin, le facteur de transcription NF- κ B présente une expression plus ubiquitaire. Il régule toutefois, l'expression de protéines fortement impliquées dans le développement nerveux. Ce facteur intervient également dans la maladie d'Alzheimer (Kaltschmidt *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1997).

Des études complémentaires par délétions sériées de la région 5' non traduite du gène *prp* bovin et transfection transitoire *in vitro* pourraient être réalisées afin d'identifier les régions voire les facteurs impliqués dans le contrôle de l'expression du gène *prp*.

En conclusion, les résultats obtenus à partir de ces travaux ont non seulement permis d'appréhender l'expression du gène *prp in vivo*, mais également permis d'obtenir de plus amples informations concernant les possibles facteurs intervenant dans la régulation du gène. Il fournit également un nouvel outil d'étude des ESSTs. En effet, jusqu'à présent, aucune variation du taux de transcrit du gène codant pour la PrP n'a pu être observée entre des animaux sains et infectés. Toutefois, l'étude des souris transgéniques *bPrP-gfp* après inoculation périphérique permettrait de visualiser non pas des variations quantitatives mais des variations dans le ciblage cellulaire d'expression du gène *prp*. De même, ce modèle animal constitue un nouvel outil d'analyse de la régulation du gène *prp*. Ainsi, le croisement de cette lignée avec d'autres lignées de souris n'exprimant plus certains facteurs de transcription (par exemple les souris *nude* dépourvues du facteur Whn) permettrait d'évaluer *in vivo* l'implication de ce facteur dans la transcription du gène *prp*

Chapitre II :
PrP expression and replication by Schwann cell:
implication in prion spreading

1. Introduction

La transmission naturelle des ESSTs se fait par voie orale. La longue période d'incubation observée après inoculation par voie périphérique suggère une réplication de l'agent infectieux dans des "réservoirs" périphériques avant de rejoindre le SNC. Les études des voies de propagation de l'agent ont montré des variations en fonction de l'espèce de l'hôte, des voies d'inoculation, de la quantité et de la souche de prion employée.

L'inoculation de souris immunodéficientes (Lasmezias *et al.*, 1996a; Klein *et al.*, 1997) a permis de mettre en évidence le rôle important du système immunitaire dans la réplication périphérique de l'agent au début de l'infection. Ces travaux ont permis d'identifier les CFD présentes dans les plaques de Peyer et dans la rate comme un support cellulaire de cette réplication. Suite à l'infestation de ces structures, la PrP^{Sc} est détectée dans l'ensemble des organes lymphoïdes périphériques tels que les ganglions lymphoïdes axillaires et parfois le thymus. Toutefois, certaines de ces souris (RAG^{-/-} ou SCID) peuvent accumuler de la PrP^{Sc} dans le cerveau suggérant l'existence d'une deuxième voie de propagation.

Après inoculation par voie périphérique, la PrP^{Sc} a été décrite dans les plexus entériques (connectés avec les neurones parasymphatiques du nerf vague), dans les noyaux dorsaux moteurs du nerf vague, dans les noyaux du tractus solitaire (Baldauf *et al.*, 1997; Beekes *et al.*, 1998; McBride & Beekes, 1999) et dans la moëlle épinière thoracique au niveau de l'insertion des fibres du système nerveux sympathique (SNS) (Kimberlin & Walker, 1979; Kimberlin & Walker, 1982; Kimberlin & Walker, 1986; Kimberlin & Walker, 1989a). Enfin, de récents travaux ont montré qu'une sympathectomie prolonge le délai d'incubation de la maladie alors qu'une surexpression de la PrP^C dans les extrémités des nerfs conduit à une diminution de ce délai (Glatzel *et al.*, 2001).

Ces données, montrant l'implication du SNP dans la neuroinvasion des prions, n'ont toutefois pas permis l'identification du type cellulaire soutenant le transport de l'agent infectieux le long des fibres nerveuses.

L'hypothèse d'un transport par les flux axonaux a été proposée mais la vitesse de propagation de l'agent n'est pas compatible avec la vitesse des courants axonaux (Glatzel & Aguzzi, 2000a). De plus, l'identification de PrP^{Sc} autour des axones suggère un transport non axonal (Groschup *et al.*, 1999).

Finalement, l'observation d'altérations dans le processus de fabrication de la gaine de myéline,

chez des souris transgéniques surexprimant le gène *prnp* (Westaway *et al.*, 1994b), ou dépourvues de ce gène (Nishida *et al.*, 1999) argumente en faveur d'une relation entre les cellules de Schwann et l'expression de la PrP.

L'ensemble de ces données et l'observation d'une fluorescence non axonale dans les nerfs sciatiques des souris transgéniques *bprp-gfp* (Lemaire-Vieille *et al.*, 2000) a ainsi orienté notre étude sur les cellules de Schwann. La PrP^c a été recherchée par immunohistochimie sur des coupes de nerf sciatique de souris surexprimant le gène *prp* (Tga20). Une approche par microscopie électronique a permis d'observer sur des souris sauvages la localisation de la PrP^c dans le cytoplasme et à la surface des cellules de Schwann.

Cependant, pour suggérer que les cellules de Schwann pouvaient être le support de la progression de la PrP^{Sc} le long des fibres nerveuses, il fallait montrer qu'elles pouvaient répliquer l'agent infectieux *in vitro*. Après avoir caractérisé l'expression de la PrP dans la lignée de cellules de Schwann murines MSC-80, nous l'avons infestée avec une souche de tremblante adaptée à la souris (RML). La présence de la PrP^{Sc} dans ces cellules infestées (MSC^{Ch}) a été analysée par Western-blot et la synthèse *de novo* a été montrée par radiomarquage métabolique. Finalement les MSC^{Ch} ont été inoculées par voie intracérébrale à des souris afin de vérifier l'infectiosité de la PrP^{Sc} observée. L'infectiosité a été observée après 7 passages. Les résultats obtenus nous ont montré que les cellules de Schwann étaient capable de répliquer *in vitro* l'agent infectieux et pouvaient représenter ainsi l'une des composantes de la chaîne cellulaire impliquée dans la propagation des prions.

2. Article

PrP expression and replication by Schwann cell: implication in prion spreading

Jérôme Follet ^{1, 2}, Catherine Lemaire-Vieille ^{1, 2}, Françoise Blanquet-Grossard ^{1, 2}, Valérie Podevin-Dimster ¹, Sylvain Lehmann ³, Jean-Paul Chauvin ⁴, Jean-Pierre Decavel ¹, Ruth Varea ⁵, Jacques Grassi ⁶, Michel Fontès ⁷, and Jean-Yves Cesbron ^{1,2}

¹Laboratoire de Physiopathologie des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles, C.N.R.S. IFR3-Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette BP447, 59021 Lille Cedex (France); ²UFR de Médecine de Grenoble, Université Joseph Fourier, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex (France); ³Biologie des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles, IGH-CNRS, UPR-1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5 (France); ⁴UMR-6545, Laboratoire de Génétique et de Physiologie du Développement, IBDM-CNRS-INSERM, Université de la Méditerranée, Campus Luminy, 13288 Marseille Cedex 09 (France); ⁵Departamento de Patologia Animal, Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza (Spain); ⁶Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA-Saclay, 91191 Gif/Yvette (France); ⁷INSERM-U491 Génétique médicale et développement. Faculté de Médecine de la Timone, 27, Bd J. Moulin 13358 Marseille (France).

Corresponding author: Jean-Yves Cesbron, Université Joseph Fournier, Domaine de la Merci 38706 La Tronche, France. Tel: (33)4-76-63-74-68; Fax: (33)4-76-63-74-10, e-mail address: jean-yves.cesbron@ujf-grenoble.fr

Abstract

Prion infection relies on a continuous chain of PrP^c expressing tissues to spread from peripheral sites to the central nervous system (CNS). Direct neuroinvasion *via* peripheral nerves has long been considered likely. However the speed of axonal flow is incompatible with the lengthy delay prior to the detection of PrP^{Sc} in the brain. We hypothesized that Schwann cells could be the candidate implicated in this mechanism; for that, it has to express PrP^c and to allow PrP^{Sc} conversion. We investigated *in vivo* localization of PrP^c in sciatic nerve samples from different strains of mice. We demonstrated that PrP^c is mainly localized at the cell membrane of the Schwann cell. We also studied *in vitro* expression of PrP^c in the Schwann cell line MSC-80 and demonstrated that it expresses PrP^c at the same location. More specifically, we demonstrated that this glial cell line, when infected *in vitro* with the mouse Chandler prion strain, both produces the PrP^{Sc} till after 18 passages and is able to transmit disease to mice, which then develop the typical signs of prion diseases. It is the first time that infection and replication of PrP^{Sc} are shown in a peripheral glial cell line.

Introduction

Prion diseases, such as scrapie, kuru, Creutzfeldt-Jacob Diseases and Bovine Spongiform Encephalopathy are transmissible fatal neurodegenerative disorders associated with the conversion of the membrane glycoprotein PrP^c to PrP^{Sc} (27). Acquired forms transmitted mostly through oral absorption (4, 6, 13) or peripheral inoculation of infected tissues raise the question of how prions are transported to the CNS. However, the transfer of infectivity from the spleen to the CNS has been shown to be dependent on the expression of PrP (3). Using a mathematical model, Payne (26) has suggested a role for a continuous chain of PrP-expressing tissue linking peripheral sites to the brain. Both the lymphoreticular system and the peripheral nervous system (PNS) are involved in neuroinvasion (17). Direct neuroinvasion *via* peripheral nerves might occur after high dose peripheral infection, whereas after lower dose infection, amplification in follicular dendritic cells in lymphoid tissue might be necessary prior to neuroinvasion *via* peripheral nerves (20). Several reports evidence the role of the lymphoreticular system in the initial step of scrapie replication (3) however PrP^{Sc} accumulation occurs in the brain of severe combined immunodeficient mice (20) indicating that neuroinvasion can use an other pathway. After intra-peritoneal or oral infection, the initial sites of infectivity are consistent with entry *via* the vagus or other peripheral nerves (1). However, the speed of axonal flow is incompatible with the transport of infectivity in peripheral nerves (14) (0.7 mm per day). We suggest a more important role of the Schwann cell in the cellular mechanism of prion propagation.

Materials and Methods

Cell culture

MSC-80 (5), N2a (ATCC CCL131) and N2a^{Ch} (25) cells were maintained in a Dulbecco Modified Eagle Medium completed with 10 % fetal calf serum and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. Cells were detached from the matrix by scraping and splitted every seven days at a 1:10 dilution.

Immunohistochemistry

Sciatic nerves were fixed in a 4% Formaldehyde-Phosphate Buffer Saline (PBS) overnight and in a 20% Sucrose-PBS overnight. Frozen samples (-80°C) were embedded in Tissue-Tek OCT-Compound (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan). Cryosections (6 µm) were dried, fixed in cold acetone and incubated for 1 h with the biotinylated anti-PrP 3B5 mAb (19) (15 µg/ml). Immunoreactions were revealed using the streptavidin-biotin and the streptavidin-peroxidase complexes (Dako, Carpinteria, California). An anti-trinitrophenol IgG2a mAb was used as control (30 µg/ml, Pharmingen, San diego, California).

Electron microscopy

Immunogold electron microscopy was processed according to Berryman (2) and immunostaining was performed with the 3B5 mAb (15 µg/ml). An irrelevant IgG2a isotypic mAb (15 µg/ml) was used as control (data not shown).

FACS analysis

Cells were washed and resuspended in PBS/0,5% Bovine Serum Albumin buffer. Samples were incubated for 1h at 4°C with the primary biotinylated anti-PrP monoclonal antibody 3B5 (15µg/ml) (19). After washing, cells were incubated with a Streptavidine FITC solution at 4°C for 30 min. Cell preparations were then washed in PBS and analyzed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, Sunnyval, California, USA). An IgG2a mAb was used as an isotypic control (15 µg/ml) (Pharmingen, San diego, California, USA).

PrP^c detection

Brain homogenates (10% wt/vol) and cell lysates were prepared by extrusion in a potter homogenizer followed by an extrusion through a 16-gauge and a 22-gauge syringe in a lysis buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X100, 0.5% Sodium Deoxycholate, and 50 mM Tris-HCl pH 7.5) completed with protease inhibitors (1 mg (each) of Pepstatin and Leupeptin per ml and 2 mM EDTA). After 15 min of incubation at 4 °C and 4 min of centrifugation at 10 000 g, supernatants were collected and total protein concentration was measured by BCA protein assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Samples (12.5 µg of total proteins per lane) subjected to electrophoresis on Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)-polyacrylamide gel (12%) were transferred to nitrocellulose membrane. The blots were then blocked for 1h in 5% (wt/vol) non-fat dry milk in PBS/1% Tween 20 and 0,001% Azide. After incubation for 1h with the 3B5 mAb (19) (300 ng/ml) and 30 min with the 1:2500 secondary mouse peroxidase-conjugated antibody (Sigma, St. Louis, Miss, USA). Immunoreactive bands were visualized using the Enhanced Chemiluminescence method (ECL, Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey).

Indirect immunofluorescence assay

After incubation at 4 °C in 1% BSA-PBS buffer for 30 min, cells were incubated in the same buffer, with or without 0.5% saponin (Sigma, St. Louis, Miss, USA). After cell washing, the biotinylated 3B5 mAb (4.5 µg/ml) was added for 1 h at 4°C and incubated with 1:100 Streptavidin FITC (Becton Dickinson, Sunnyval, CA). Cells were then fixed at 4 °C for 20 min with 4% paraformaldehyde. The IgG2a antibody was used as isotypic control.

Cell infection

Brains infected with Chandler strain were homogenized to 10% (w/v) in cold culture medium. Cells were grown in 6-wells plates at 2×10^5 cells/well 2 days before inoculation. They were then incubated for 72 h with 1 ml of 2% brain homogenate diluted in culture medium (5.9 log mean lethal doses (LD_{50}) units of mouse adapted Chandler scrapie strain (9)). The inoculum was changed each 24 h. Then, the supernatant was changed by 2 ml of regular culture medium and the cells were incubated until confluence. Finally, they were cultured in 150 cm^2 flasks and splitted every seven days at a 1:10 dilution.

PrP^{Sc} detection

Cells (8.10^6) were lysed in 200 μl of the same lysis buffer as for PrP^S detection, at 4 °C, for 15 min then samples were centrifuged 10 min at 10 000 g. The protein concentration was adjusted to 1 mg/ml and treated with proteinase K (PK) (Sigma, St. Louis, Missouri) (20 $\mu\text{g/ml}$) at 37 °C, for 30 min. The reaction was stopped with 2 mM PMSF (Sigma, St. Louis, Missouri) for 5 min at 4 °C and centrifuged 45 min at 14 000 g. Brain homogenates (10% wt/vol) from frozen tissues were prepared in lysis buffer and adjusted to 3 mg/ml of protein. Each sample (300 mg of total protein) was treated with PK (10 $\mu\text{g/ml}$) at 37 °C, for 30 min. Samples (37.5 μg of total protein) were then mixed with a volume of Laemmli buffer 2x (4% SDS, 2% β -mercaptoethanol, Tris-Glycine pH8.2, 5% Sucrose), heated at 100°C for 3 min and then loaded onto a 12% polyacrylamide gel just after boiling. They were then analyzed by Western-blotting as described above with a mixture of 3 mAb SAF 60, SAF 69, and SAF 70 (10).

Metabolic pulse chase radiolabeling

Cells (80% confluency in 25 cm^2 flask) were labeled with 1 mCi L-³⁵S-methionine (Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey) per ml in methionine/cysteine-free DMEM supplemented with 1/40 (vol/vol) culture medium, 1% FCS and 2 mM L-glutamine for 24 hours. Cells were chase 24 hours in culture medium and then lysed in 1 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.5% NP-40; 0.5% DOC) on ice for 5 min. After centrifugation at 4000 g for 1 min and addition of Sarkosyl to 0.4%, cell lysate (500 μl) were incubated with 5 μg PK for 30 min at 37 °C. For immunoprecipitation, the mAb 3B5 (10 μg) was coupled to Protein A Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Cell lysates were then incubated with 3B5-Sepharose beads overnight at 4 °C. After centrifugation at 10 000 g for 1 min, sepharose-absorbed proteins were washed twice with lysis buffer containing 0.4% Sarkosyl, followed by two wash steps in high salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1% NP-40; 0.05% DOC) and one wash step in low salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1% NP-40; 0.05% DOC). Sepharose was resuspended in 3x loading buffer (150 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6% SDS; 0.3% bromophenol blue; 30% glycerol), and analyzed by 12% SDS-PAGE.

Infectivity bioassay

After 3 cycles of freezing-thawing and cell death control by trypan blue microscopy, 10^5 cells at the 7th passage were injected intracerebrally (ic) to 4 *tga20* mice. Five *tga20* mice were inoculated ic with uninfected MSC-80 or with the Chandler strain (6.5 log LD_{50}) respectively as negative and positive controls.

Mice were monitored every two days, and scrapie was diagnosed according to standard clinical criteria (18).

Histopathological analysis

Brain sections (5 μ m) were deparaffined, and the endogenous peroxidase were inhibited with 33% H₂O₂ for 30 min. After Washing and blocking with an unspecific goat serum, samples were incubated overnight with the rabbit anti cow anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) antibody, (Dako, Carpinteria, California, USA). Samples were then washed in PBS and incubated for 1 h at room temperature with the biotinylated anti rabbit IgG. Colors were developed with peroxidase substrate.

Results

Expression and localization of PrP^c on mouse sciatic nerves

To investigate the localization of PrP^c in mouse nerves, we performed immunohistochemistry on sciatic nerves from PrP overexpressing *tga20* mice (11) which were determined to express PrP^c in the PNS five to seven times more than wild type mice (14). We used the anti-PrP monoclonal antibody 3B5 (3B5 mAb), which recognizes residues 79-92 of human PrP (19), as this antibody has already been extensively used to detect murine PrP^c. Labeling was observed at the Schwann cell surface and in the cytoplasm (Fig. 1A), but not in the myelin sheath. Both antibody control (IgG2a, Fig. 1B) and antigen control (7) (PrP^{0/0} mice, data not shown) were negative. A clear labeling could be observed only on sections passing through the nucleus of the Schwann cell thus through a large area of cytoplasm. We confirmed this result by the analysis of sciatic nerves from three different transgenic mice strains expressing the green fluorescent protein (gfp) reporter gene under the control of the 5' regulatory region of the bovine *prp* gene (*prp-gfp*). These mice models have previously been shown to exhibit gfp fluorescence in good correlation with murine endogen PrP^c expression (22). The gfp fluorescence clearly observed in Schwann cells gives an additional argument in favor of PrP expression in this cell type (Fig. 1C). However, as one cannot exclude ectopic expression of PrP^c or gfp in transgenic animals, we carried out immunogold electron microscopy, with the 3B5 mAb, on sciatic nerves from wild type Balb/c mice. We observed the immunolabeling at the cell surface of Schwann cells as well as intracellular (Fig. 1D, E). In contrast, we did not observe any labeling in the myelin sheath. Control staining without the 3B5 mAb was negative (Fig. 1F).

Expression and localization of PrP^c in the mouse Schwann cell line MSC-80

Since prion replication is a PrP^c dependent mechanism (3), we investigated the expression of PrP^c in a mouse Schwann cell line, the MSC-80 (5) which is one of the few cell lines isolated from the PNS. After cell membrane staining using the 3B5 mAb (19), MSC-80 displayed positive labeling with a monophasic distribution (Fig. 2A, B) as shown by fluorescence-activated cell sorting analysis. We compared the western blot pattern of PrP^c from MSC-80 to that of mouse brain and of N2a neuroblastoma cell line (8) (Fig. 2C). The three glycoforms of PrP^c, the non glycosylated 25-27 kilodalton (kDa) protein, as well as the mono- and the diglycosylated forms were revealed. Finally, an indirect immunofluorescence assay showed a well define labeling at the cell surface of MSC-80 (Fig. 2D), while after saponin permeabilisation, we detected the labeling intracellularly (Fig. 2E). We did not observe a nuclear localization of the protein. No staining was observed with the IgG2a isotype control (data not shown).

Production of PrP^{Sc} in MSC-80 after inoculation with the Chandler strain

Currently, only a few neuronal cell lines have been persistently infected with mouse adapted scrapie strain (N2a (8), mouse PrP^c transfected N2a (25), PC12 (29) or GT1 (30)), and more recently, a rabbit epithelial cell line, stably transfected with ovine *prp* gene, could be infected with scrapie agent [Vilette, 2001 #7631]. In order to investigate the ability of the MSC-80 line to sustain PrP conversion from the cellular to the protease resistant form, we incubated MSC-80 cells 3 days with 5.9 log mean lethal doses (LD₅₀) units of mouse adapted Chandler scrapie strain (9). PrP^{Sc} production was analyzed by Western blotting using a mixture of 3 mAb SAF 60, SAF 69, and SAF 70 (10) directed against hamster PrP (residues 142 to 160, Fig. 3A, B). This mixture is known to have high sensitivity to PrP^{Sc} (25). At the fourth passage (Fig. 3A lane 3), the typical profile of PrP^{Sc} appeared, without any loss of signal intensity at passage 5, 6, 7 and 10 (Fig. 3A, lane 4, 5, 6 and 7 respectively). This PrP^{Sc} pattern is also observed after 15 passages (data not shown). Murine PrP transfected N2a cells (N2a^{Ch} subclone 58 (25)) which express 5 times the PrP level of untransfected N2a cells were tested on the same Western Blot (Fig. 3A, lane 2 and 8). Control uninfected MSC-80 cells treated by PK digestion did not exhibit any signal (Fig. 3A, lane 1). These results were identical in 3 independent experiments.

Transconformation of PrP at the cellular level was also investigated in MSC^{Ch}, using a ³⁵S metabolic pulse-chase radiolabeling followed by an immunoprecipitation with the 3B5 mAb. We performed the experiment with infected MSC-80 cells at the 18th passage. Immunoprecipitation resulted in a clear PrP^c specific signal in the range of 30 kDa (Fig. 3B, lane 1) which represents *neosynthesized* PrP^c. After proteinase K (PK) treatment, (Fig. 3B, lane 2), the PrP^{Sc} signal appeared (27-30 kDa) demonstrating that Chandler-infected MSC-80 line converts PrP^c into PrP^{Sc}. The complete shift down observed between lane 1 and 2 leads us to consider that the pattern is not due to a partial PK digestion of PrP^c. The single band pattern could be due to a lower efficiency of the 3B5mAb in immunoprecipitation compared to western blot.

Transmission of infected MSC-80 to mice

With a view to test the presence of infectivity in PrP^{Sc} positive MSC-80 cells, we inoculated ic MSC^{Ch} cells at the 7th passage to 4 *tga20* mice. Mice developed typical signs of spongiform encephalopathies and died at 91.5±5 days post inoculation compared to the 66.4±0.5 days for the 5 control *tga20* mice inoculated with the Chandler strain. Five mice inoculated with uninfected MSC-80 cells did not exhibited any signs of TSE up to 280 days post inoculation (Table 1). We evaluated the titer of MSC^{Ch} to 4.3 log LD₅₀ units per gram of cell lysate. It was only decreased by two orders of magnitude in comparison to that estimated in the same brain homogenate as used for cell infection (6.5 log LD₅₀ units per gram). The apparent low quantity of PrP^{Sc} in MSC^{Ch} shown on the WB (Fig. 3A, lane 6) does not seem to correlate with the resulting high infectivity titer. However, this has already been described in previous work (21).

We confirmed transmissible spongiform encephalopathies by PrP^{Sc} accumulation in brain extracts from Chandler (Fig. 4A, lane 1) and from MSC^{Ch} (Fig. 4A, lane 3) inoculated mice. Mice inoculated with uninfected MSC-80 cells (MSC^{Ct}) did not develop scrapie and did not show any PrP^{Sc} in their brain (Fig. 4A, lane 2). The apparent higher amount of PrP^{Sc} in brain mice inoculated with MSC^{Ch} could be a consequence of the prolonged incubation period which leads to a prolonged PrP^{Sc} accumulation time.

Histopathological studies were also realized to confirm TSE and showed both an intense vacuolation of the

neuropile (Fig. 4B) and an astrogliosis observed after an anti Glial Fibrillary Acidic Protein labeling (Fig. 4C). These data demonstrated that MSC-80 Schwann cells can be infected *in vitro* with the mouse adapted Chandler scrapie strain and can support the conversion of PrP^c to PrP^{Sc} until after 18 weeks of culture.

table 1

Discussion

There is increasing evidence indicating a central role of PrP^c in the PNS in prion neuroinvasion (14). However, at the cellular level, the mode of transport of infectivity in peripheral nerves has not been determined yet. Our data demonstrate for the first time that PrP^c is expressed in Schwann cell on mouse sciatic nerve sections and in a mouse Schwann cell line. We showed that this cell line can be infected *in vitro* and replicate the disease-specific isomer PrP^{Sc}, suggesting that prion propagation can occur along peripheral nerves via Schwann cells. The replication of prion in cell culture has previously been described only in neuronal cell lines (8, 25, 29, 30) but never in a glial cell line. Furthermore, Nishida et al., (25) have shown that only stably transfected N2a cells expressing a high level of mouse PrP^c can efficiently replicate the mouse scrapie Chandler strain. In our experiment, untransfected Schwann cells can replicate the Chandler strain and support the conversion from the cellular to the protease resistant form. The susceptibility of Schwann cell to other scrapie strains remains however to be tested. These results also support earlier findings by others using transgenic mice with tissue specific hamster PrP expression to demonstrate the crucial role of PrP-positive peripheral nerves in the process of neuroinvasion following peripheral infection (28). These findings are similar to previous experiments with SCID mice infected intra-peritoneally with a high dose of mouse scrapie strain ME7, where neuroinvasion also appeared to proceed directly *via* peripheral nerves without a susceptible lymphoreticular system or evidence of replication in the spleen (12, 20). However, the possibility that PrP^{Sc} transport in the PNS may not occur through axonal transport mechanisms was raised by Groschup *et al.*, (15), Hainfeller *et al.*, (16) and more recently by Glatzel *et al.*, (14) who estimated the velocity of transport of infectivity in the PNS to be 0.7 mm per day. This value, as pointed out by Glatzel, *et al.*, (14) does not correspond to either fast nor slow axonal transport, indicating that PrP^{Sc} transport in the PNS may occur through another mechanism. Together with these findings, our data suggest a unifying concept for neuroinvasion *via* the peripheral nerves and bring a new insight in prion propagation along the peripheral nerves: the peripheral spread of prion through the PNS could occur in a “domino” effect fashion *via* PrP^c-paved chain of Schwann cells, capable of supporting prion replication through conversion of PrP^c by adjacent PrP^{Sc}. Finally, the expression of PrP^c at the cell surface of Schwann cells suggests that PrP^c does not play a structural nor a functional role in the myelin sheath, but may explain the peripheral neuropathies observed in some Creutzfeldt-Jacob Diseases patients (24) and in mice overexpressing PrP^c (32). These data provide a basis for investigation into the cellular mechanisms of TSE transmission by the peripheral nerves and of therapeutic approaches to the TSEs.

References

1. Beekes, M., P. A. McBride, and E. Baldauf. 1998. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with

- scrapie. *J Gen Virol* **79**:601-7.
2. **Berryman, M. A., and R. D. Rodewald.** 1990. An enhanced method for post-embedding immunocytochemical staining which preserves cell membranes. *J Histochem Cytochem* **38**:159-70.
 3. **Blattler, T., S. Brandner, A. J. Raeber, M. A. Klein, T. Voigtlander, C. Weissmann, and A. Aguzzi.** 1997. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* **389**:69-73.
 4. **Bons, N., N. Mestre-Frances, P. Belli, F. Cathala, D. C. Gajdusek, and P. Brown.** 1999. Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4046-51.
 5. **Boutry, J. M., J. J. Hauw, A. Gansmuller, N. Di-Bert, M. Pouchet, and A. Baron-Van Evercooren.** 1992. Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin in vivo. *J Neurosci Res* **32**:15-26.
 6. **Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C. J. Bostock.** 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments]. *Nature* **389**:498-501.
 7. **Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann.** 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-47.
 8. **Butler, D. A., M. R. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury, and S. B. Prusiner.** 1988. Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* **62**:1558-64.
 9. **Chandler, R. L.** 1965. An experimental mixed infection of mice with scrapie and an oncogenic virus. *J Comp Pathol* **75**:323-6.
 10. **Demart, S., J. G. Fournier, C. Creminon, Y. Frobert, F. Lamoury, D. Marce, C. Lasmezas, D. Dormont, J. Grassi, and J. P. Deslys.** 1999. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* **265**:652-7.
 11. **Fischer, M., T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann.** 1996. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* **15**:1255-64.
 12. **Fraser, J. R.** 1996. Infectivity in extraneural tissues following intraocular scrapie infection. *J Gen Virol* **77**:2663-8.
 13. **Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs, and M. Alpers.** 1966. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**:794-6.
 14. **Glatzel, M., and A. Aguzzi.** 2000. PrPC expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion invasion. *J Gen Virol* **81**:2813-2821.
 15. **Groschup, M. H., M. Beekes, P. A. McBride, M. Hardt, J. A. Hainfellner, and H. Budka.** 1999. Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol (Berl)* **98**:453-7.
 16. **Hainfellner, J. A., and H. Budka.** 1999. Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* **98**:458-60.
 17. **Kimberlin, R. H., and C. A. Walker.** 1980. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol* **51**:183-7.
 18. **Kimberlin, R. H., and C. A. Walker.** 1989. The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res* **12**:201-11.
 19. **Krasemann, S., M. Groschup, G. Hunsmann, and W. Bodemer.** 1996. Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP0/0 mice. *J Immunol Methods* **199**:109-18.
 20. **Lasmezas, C. I., J. Y. Cesbron, J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, R. Rioux, C. Lemaire, C. Loch, and D. Dormont.** 1996. Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* **70**:1292-5.
 21. **Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J. M. Peyrin, J. G. Fournier, J. J. Hauw, J. Rossier, and D. Dormont.** 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**:402-5.
 22. **Lemaire-Vieille, C., T. Schulze, V. Podevin-Dimster, J. Follet, Y. Bailly, F. Blanquet-Grossard, J. P. Decavel, E. Heinen, and J. Y. Cesbron.** 2000. Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5422-7.
 23. **Montrasio, F., R. Frigg, M. Glatzel, M. A. Klein, F. Mackay, A. Aguzzi, and C. Weissmann.** 2000. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**:1257-9.
 24. **Neufeld, M. Y., J. Josiphov, and A. D. Korczyn.** 1992. Demyelinating peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Muscle Nerve* **15**:1234-9.

25. **Nishida, N., D. A. Harris, D. Vilette, H. Laude, Y. Frobert, J. Grassi, D. Casanova, O. Milhavel, and S. Lehmann.** 2000. Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* **74**:320-5.
26. **Payne, R. J., and D. C. Krakauer.** 1998. The spatial dynamics of prion disease [In Process Citation]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265**:2341-6.
27. **Prusiner, S. B.** 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**:1515-22.
28. **Race, R., M. Oldstone, and B. Chesebro.** 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.
29. **Rubenstein, R., R. I. Carp, and S. M. Callahan.** 1984. In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells. *J Gen Virol* **65**:2191-8.
30. **Schatzl, H. M., L. Laszlo, D. M. Holtzman, J. Tatzelt, S. J. DeArmond, R. I. Weiner, W. C. Mobley, and S. B. Prusiner.** 1997. A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* **71**:8821-31.
31. **Vilette, D., O. Androletti, F. Archer, M. F. Madelaine, J. L. Vilotte, S. Lehmann, and H. Laude.** 2001. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4055-9.
32. **Westaway, D., S. J. DeArmond, J. Cayetano-Canlas, D. Groth, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, G. A. Carlson, and S. B. Prusiner.** 1994. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* **76**:117-29.

Acknowledgements

The authors thank J.-J. Hauw (Hôpital Pitié Salpêtrière, France) for providing MSC-80 cells, C. Weissmann and A. Aguzzi for providing *tga20* mice, J.R. Barta (University of Guelph, Canada) and J. Gagnon (IBS, Grenoble) for critical reading of the manuscript. JF is fellowship of the Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie. Supported by the CNRS. Grants of the " Programme de Recherche sur les ESST et les prions " and the CCE-FAIR grant JCT-6022.

Legends and figures

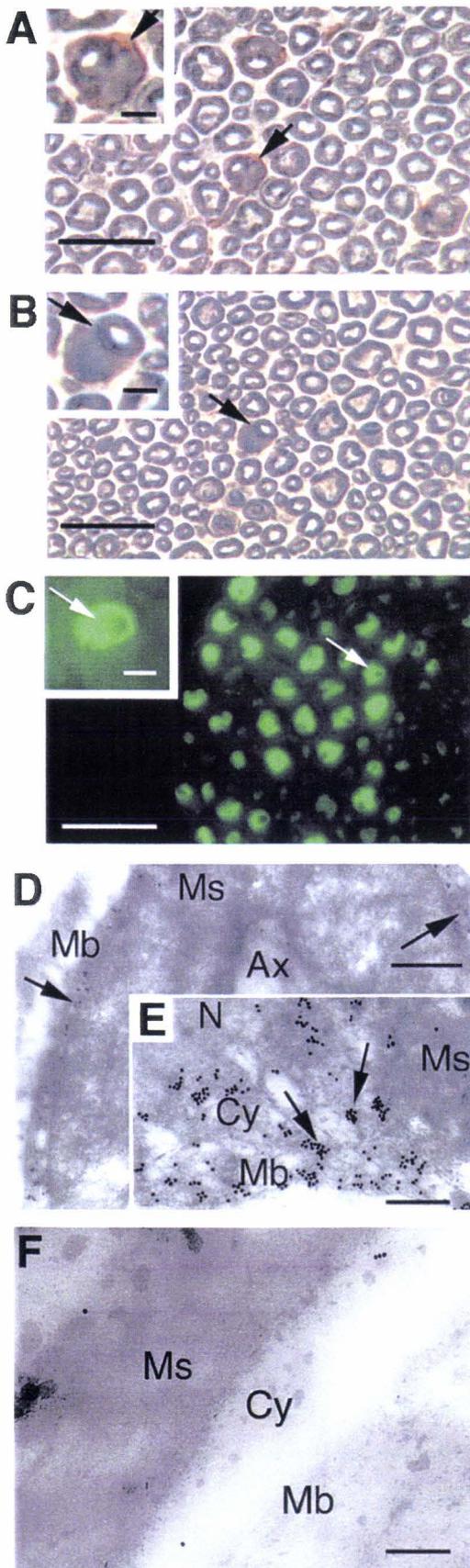


Figure 1. Expression and localization of PrP^c on sciatic nerve sections. (A) Transversal sciatic nerve sections from *tga20* mice were processed with the 3B5 mAb (19). The arrows point at the labeled cytoplasm of the Schwann cell. (B) The sciatic nerve sections were also processed with an anti-trinitrophenol mouse IgG2a(κ) mAb Immunoglobulin isotype standart used as an isotypic control. The arrows point at the unlabeled cytoplasm of the Schwann cell. (C) Sciatic nerves from *prp-gfp* transgenic mice (22) exhibit widespread expression as evidenced by fluorescence localized to the cytoplasm. Each panel A, B, C shows a wide view (Scale bar, 50 μ m) and an enlarged view (Scale bar, 10 μ m). (D) Immunogold electron microscopy of Balb/c sciatic nerve sections. Nerve sections were performed with the 3B5 mAb. Gold particles (arrows) were localized at the plasma membrane (Mb) of Schwann cells. No labeling was seen within the myelin sheath (Ms). Ax, axon. Scale bar, 1 μ m. (E) is an enlarged view of cytoplasmic area of Schwann cell exhibiting a positive labeling at the outer collar cytoplasm (Cy). No staining was seen in the Nucleus (N) nor the myelin sheath (Ms). (F) is a control staining without the 3B5 mAb. Scale bar, 0.2 μ m.

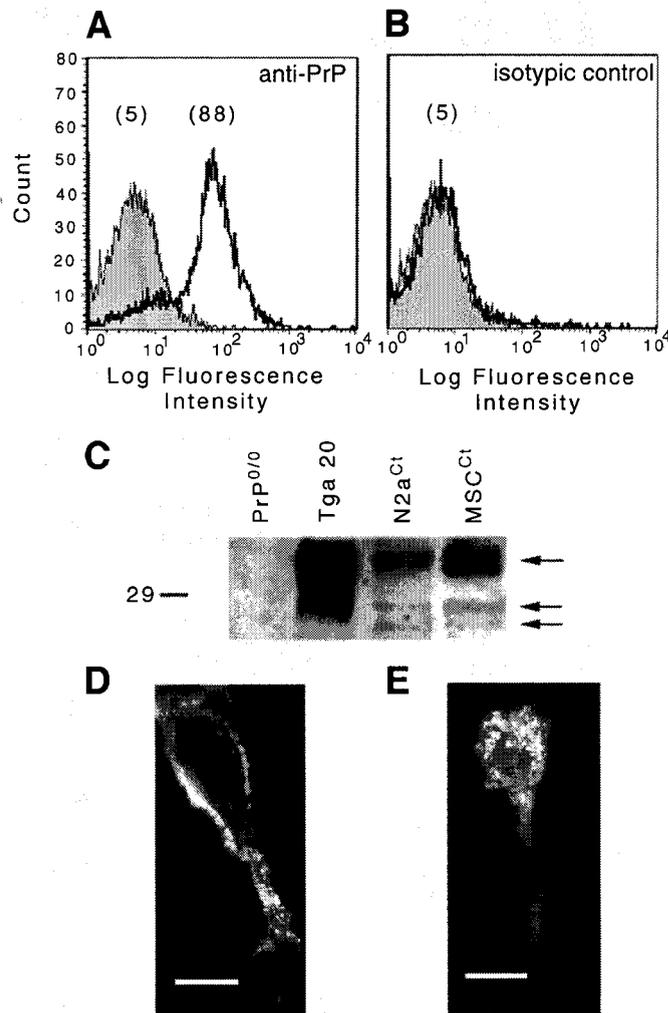


Figure 2. *In vitro* PrP^{Sc} expression and localization in mouse Schwann cells (MSC-80). (A) PrP^{Sc} was detected at the surface of MSC-80 cells (5) by FACS analysis. (B) An IgG2a mAb was used as an isotypic control. The mean fluorescence intensity of cells is presented within brackets. (C) PrP^{Sc} was also detected by immunoblot analysis from control MSC-80 (MSC^{Ct}) extracts. Murine neuroblastoma cell line extracts (N2a^{Ct}), and brain homogenates from *tga20* mice (11) were used as positive controls and brain homogenates from PrP^{0/0} mice (7) as negative control. The arrows point to the three glycosylated forms of the murine PrP^{Sc}. Molecular weight markers is indicated in kDa. (D and E) Cellular localization of PrP^{Sc} was analysed by immunofluorescence microscopy. (D) The staining was localized on the cell membrane, Scale bar, 10 μ m. (E) After saponin permeabilisation the signal became intracellular. Scale bar, 5 μ m.

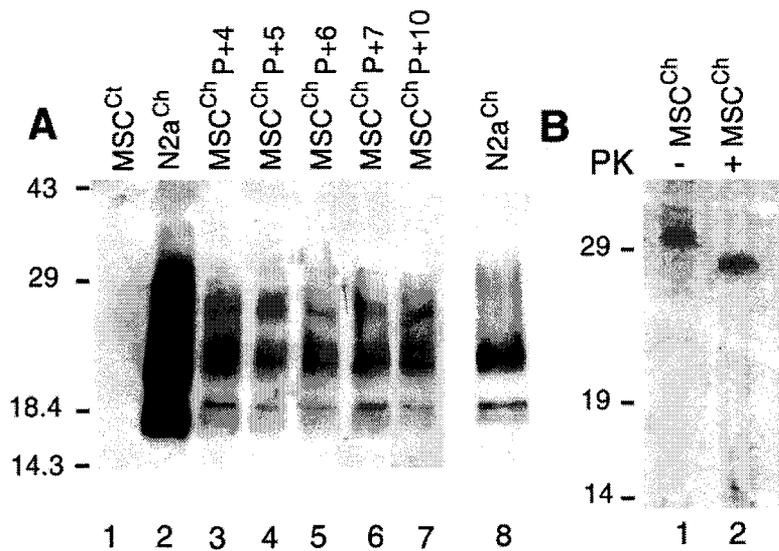


Figure 3. Production of PrP^{Sc} in MSC-80 after inoculation with the Chandler strain. (A), Cells were challenged with the mouse adapted Chandler scrapie strain and were analyzed by Western blotting after PK treatment. Uninfected MSC-80 (MSC^{Ct}) were used as negative control (Lane 1). PrP overexpressing N2a cells infected with Chandler (N2a^{Ch}) were used as positive control (Lane 2 and 8). Infected cells (MSC^{Ch}) produce PrP^{Sc} after 4, 5, 6, 7 and 10 passages (Lane 3, 4, 5, 6 and 7 respectively). Time exposure, 5 min. A lower exposure time (30sec) of the N2a^{Ch} cells is presented on lane 8. (B) Immunoprecipitation of PrP in infected MSC-80 cells after 18 passages. MSC^{Ch} cells were ³⁵S metabolically radiolabeled followed by a chase period. After cell lysis, the extracts were or not submitted to PK digestion (respectively, lane 2 and 1). PrP was immunoprecipitated with 3B5 mAb. In A and B the molecular mass markers are indicated in kDa.

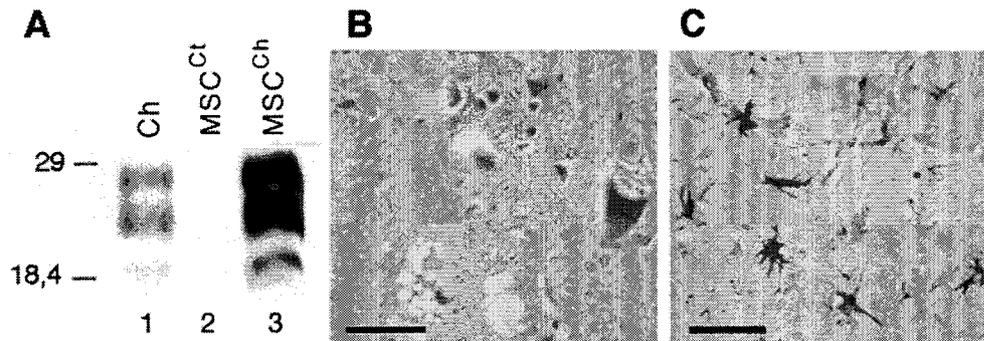


Figure 4. Transmission of infected MSC-80 to mice. (A) Detection of PrP^{Sc} in brain extracts of MSC^{Ch}-inoculated *tga20* mice. Four *tga20* mice were injected ic with Chandler challenged MSC-80 cells homogenates after 7 passages. As control, 5 *tga20* mice were inoculated ic either with the Chandler strain or with non infected MSC-80. Scrapie was diagnosed according to standard clinical criteria (18). Mice inoculated with non infected MSC-80 did not develop scrapie. Their brain was analysed at the same time as for scrapie mice. At the terminal stage of the disease immunoblots analysis of brain extracts from scrapie mice were performed. Tissues extracts were treated with PK. Immunoreactive PrP^{Sc} was detected with a mixture of 3 mAb SAF 60, SAF 69, and SAF 70 (10). The pattern identified in brain extract from MSC^{Ch} inoculated mice (Lane 3) was similar to the one observed with Chandler infected mice (Lane 1). Brain extract from non infected MSC inoculated mice did not show any PrP^{Sc} signal (Lane 2). (B) The histological examination of brain sections colored with haematoxylin-eosin showed an intense vacuolation of the neuropile in MSC^{Ch} inoculated *tga20* mice at the terminal stage of the disease. (C) An anti GFAP immunolabeling exhibited a typical astrogliosis. Scale bar, 40 μ m.

TABLE 1. *Scrapie titers of challenged Schwann cells and control cells*

Inoculation	Incubation period (days)	Mean (days \pm SD)	Titer (log LD ₅₀ units /gr) ^a
Chandler 2%	66, 66, 67, 67, 67	66.4 \pm 0.5	6.6 \pm 0.05
Uninfected MSC ^{Ct}	> 280 (n=5)	—	—
Infected MSC ^{Ch}	89, 89, 89, 99	91.5 \pm 5	4.39 \pm 0.50

^a Titers in the experimental samples were determined using the infectivity bioassay with the equation determined in (23) for mouse scrapie strain: $Y=11.45-0.088 X$, where Y is the titer in log LD₅₀ units per ml of 10% original inoculum and X is the average of incubation days in *tga20*.

3. Discussion

L'observation dans les souris transgéniques *bPrP-gfp* d'une forte fluorescence au niveau des plexus d'Auerbach et de Meissner (Lemaire-Vieille *et al.*, 2000) et la présence dans le système nerveux entérique de la PrP^{Sc} chez le mouton naturellement infecté (van Keulen *et al.*, 1999a) ou le hamster inoculé par voie orale (Beekes & McBride, 2000) laissent suggérer une implication directe du système nerveux connecté au tractus digestif dans la transmission de l'agent infectieux jusqu'au SNC.

Ainsi, même si le SNP peut, à lui seul, être impliqué dans le transport des prions, le type cellulaire supportant ce processus le long des fibres nerveuses n'a toujours pas été identifié. Les résultats obtenus à partir de nos travaux d'infestation *in vitro* de la lignée MSC-80 ont permis de suggérer que les cellules de Schwann étaient un acteur essentiel du transport des prions dans les nerfs périphériques

Nos travaux ont montré, *in vivo*, que les cellules de Schwann expriment la PrP^c sur des modèles de souris transgéniques comme sur des souris sauvages. Cette protéine a été détectée dans le cytoplasme et sur la membrane plasmique de ces cellules gliales. Aucun marquage n'a pu être identifié dans la gaine de myéline. Toutefois, cette absence dans l'immunodétection pourrait être due aux processus de myélinisation qui réduisent la sensibilité des techniques employées (Schaeren-Wiemers & Gerfin-Moser, 1993). Cette observation suggère donc que l'absence de détection de la PrP^c dans la gaine de myéline ne signifie pas pour autant que cette protéine en soit absente.

Par Western blot, le profil de glycosylation de la PrP produite par les MSC-80 n'a pas présenté de différence avec celui obtenu à partir des cellules de neuroblastome murin N2a. Toutefois, la composition des chaînes glucidiques n'a pas été étudiée et des variations dans la structure des ramifications glycosidiques pourraient exister en fonction des modèles cellulaires.

Notre étude a ensuite mis en évidence après infestation, avec la souche de tremblante adaptée à la souris RML, la capacité des cellules de Schwann à répliquer *in vitro* la PrP^{Sc}. Plus particulièrement, cette protéine partiellement résistante à la digestion par la protéinase K a pu être retrouvée en Western blot après un grand nombre de repiquages cellulaires. Enfin, l'inoculation intracérébrale de souris avec les cellules infectées a montré que la PrP^{Sc} produite était infectieuse après 7 passages. Les résultats ainsi obtenus ont permis de proposer un nouveau mode de propagation passant par la réplication de l'agent infectieux au sein des cellules de Schwann. De plus, ce travail présente pour la première fois l'infestation avec

succès d'une lignée de cellules gliales périphériques. Cette lignée fournit ainsi un nouveau modèle d'étude *in vitro* de la réplication des prions.

Mécanisme de propagation des prions

De nombreux arguments sont maintenant en faveur d'une propagation des prions le long des fibres du SNP. Cette voie peut avoir lieu en parallèle ou dans le prolongement de celle retrouvée dans le SLR. Les organes lymphoïdes sont innervés par les fibres du système nerveux sympathique (Bencsik *et al.*, 2001). Ainsi, la réplication de l'agent infectieux dans le processus de neuroinvasion. Au sein des nerfs parasympathiques, que l'on retrouve connectés notamment au SNE, il pourrait y avoir directement passage de l'agent infectieux depuis les plexus entériques jusqu'aux cellules de Schwann avant la neuroinvasion.

La dynamique cellulaire de transport dans les fibres du SNP pourrait avoir lieu selon les voies neuro-anatomiques par un phénomène dit "de domino" d'une cellule de Schwann à une autre au niveau des nœuds de Ranvier. Cette transmission s'effectuerait grâce aux prolongements cytoplasmiques de la cellule de Schwann qui recouvrent la région paranodale et l'axone. Ces prolongements s'engrènent entre eux au moyen d'expansions digitiformes (Figure 9).

La mobilité intercellulaire des protéines à ancre GPI laisserait supposer un passage direct des molécules de PrP^{Sc} d'une cellule à une autre (Kooyman *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1996).

Une approche par microscopie électronique sur des coupes de nerfs infectés permettrait de mieux appréhender la localisation cellulaire de la PrP quelque soit sa forme (normale ou pathologique), et d'étudier la mobilité intercellulaire des molécules de PrP^{Sc}.

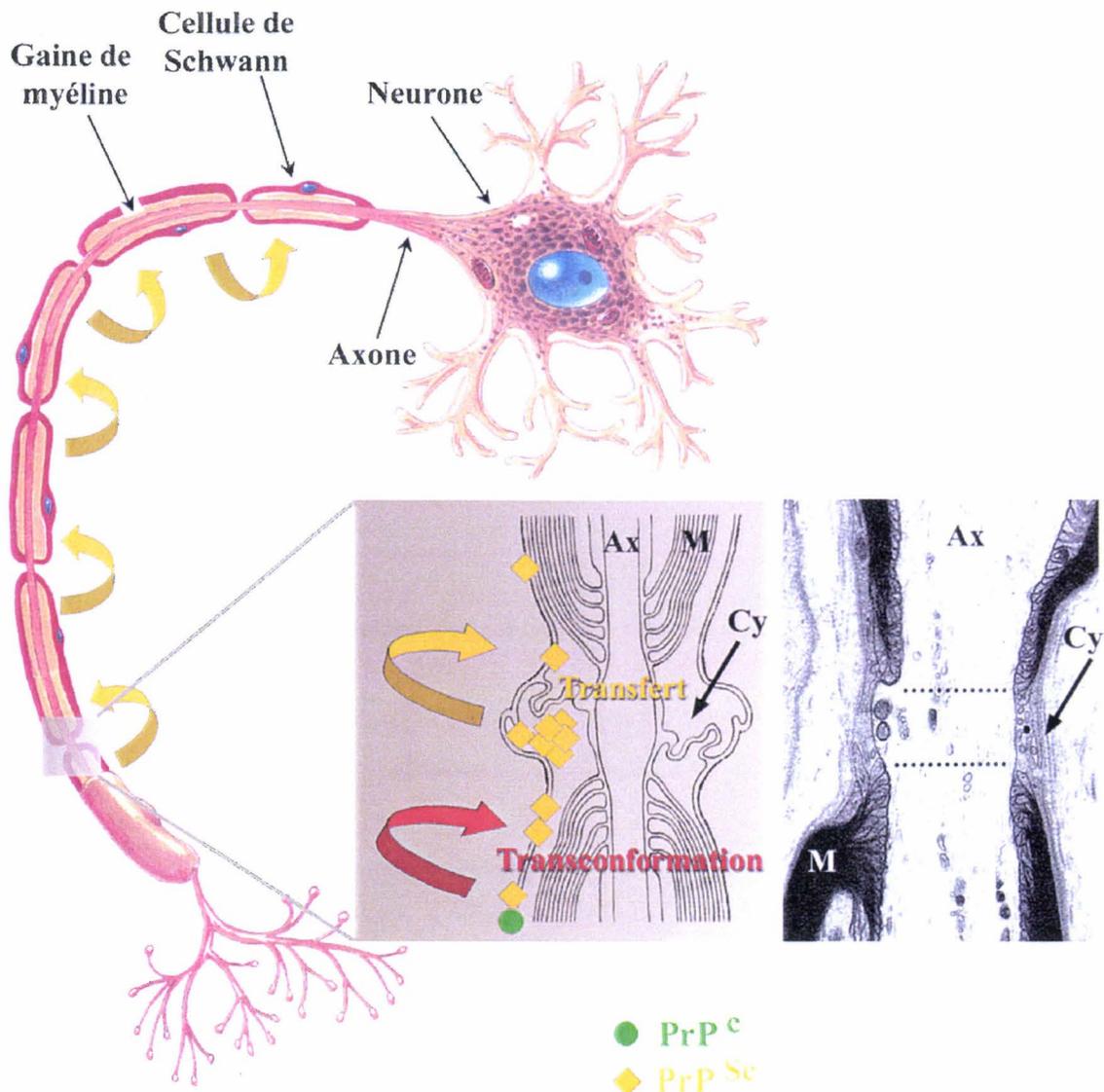


Figure 9 : Modèle cellulaire de propagation de la PrP^{Sc} le long des fibres nerveuses du SNP.

Les prions pourraient remonter le long des nerfs périphériques en passant d'une cellule de Schwann à une autre. La transmission pourrait avoir lieu après transconformation de la PrP^c endogène en PrP^{Sc} et accumulation dans le cytoplasme cellulaire (Cy). Ensuite, le transfert à la cellule suivante aurait lieu au niveau des expansions digitiformes recouvrant les noeuds de Ranvier sans avoir recours à l'axone (Ax) ou à la gaine de myéline (My).

Notre modèle cellulaire permettrait d'aborder l'étude de ce mécanisme *in vitro*. Des cellules de Schwann dérivées des souris *bPrP-gfp* pourraient être isolées et mises en coculture avec les MSC^{Ch}. Après tri cellulaire (FACS) et remise en culture des cellules exprimant la GFP, une analyse par Western blot permettrait d'identifier la présence de PrP^{Sc} dans ces nouvelles cultures et donc le passage de la PrP^{Sc} des MSC^{Ch} vers les cellules de Schwann *bPrP-gfp*.

Cependant, il faut remarquer que le modèle *in vitro* de réplication de l'agent infectieux ne reproduit que très partiellement les mécanismes existant *in vivo*. Ainsi, il apparaît que la coupure du nerf sciatique peut améliorer la propagation de l'agent inoculé *via* ce nerf (Kimberlin *et al.*, 1983a). Or, les cellules de Schwann passent d'un état quiescent à une forme proliférative et trophique après la section du nerf. La perte de contact entre les neurones et la cellule de Schwann fait ainsi perdre à ces dernières leur phénotype myélinisant (LeBlanc & Poduslo, 1990). Par contre, ces cellules se mettent à sécréter des facteurs de croissance tels que le NGF (Nerve growth Factor), le GCNF (Glial Cell Trophic factor) ou l'IGF (Insulin Like Growth Factor), des molécules d'adhérence tels que la N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule) et des facteurs trophiques tels que le récepteur de la neurotrophine. Ces modifications créent alors un environnement propre à la régénération de l'axone. Par conséquent, à ce stade, il est difficile de préciser le mécanisme impliqué dans les observations de Kimberlin. Toutefois, l'induction du gène *prp* observée lors de la section du nerf sciatique par Araki *et al.* (Araki *et al.*, 2001), pourrait être à l'origine d'une plus grande sensibilité des cellules de Schwann à l'infestation et donc, d'une efficacité de propagation accrue par ces cellules.

Interêts du modèle

Les possibilités d'étude des maladies virales dépendent de la capacité de l'agent infectieux à se répliquer dans des cellules en culture, et il en est de même pour les maladies à prions. Plusieurs types cellulaires sont considérés comme étant capables de produire de la PrP^{Sc} après infestation *in vivo* par des prions et notamment les neurones, les astrocytes et les cellules folliculaires dendritiques (DeArmond *et al.*, 1987; Diedrich *et al.*, 1991; Race & Ernst, 1992; Blattler *et al.*, 1997). Toutefois, *in vitro* peu de lignées sont en fait capables de répliquer cet agent. De manière générale, seules les lignées cellulaires dérivées des neurones semblent être susceptibles à l'infestation *in vitro* par les prions. On retrouve ainsi les cellules de neuroblastome de souris N2a (Race *et al.*, 1987; Butler *et al.*, 1988; Race *et al.*, 1988), les cellules PC12 dérivées de phéochromocytome de rat (Rubenstein *et al.*, 1990), des neurones hypothalamiques immortalisés avec l'antigène T du virus simien SV40 (GT-1) (Schatzl *et al.*, 1997) et des cellules spontanément immortalisées de cerveau de hamster infectés (haB) (Taraboulos *et al.*, 1990b). Au niveau des cellules non neuronales, très peu de modèles existent. Un modèle cellulaire, dérivé des ganglions gasseriens de souris, présentant des



marqueurs de type astrocytaire, a été décrit pour sa capacité à répliquer l'agent infectieux ovin (Roikhel *et al.*, 1987). De même, des cellules gliales embryonnaires de cerveau de souris ont pu être infestées *in vitro* (Markovits *et al.*, 1982). Enfin, plus récemment, un modèle non neuronal, dérivé de cellules épithéliales de lapin surexprimant de manière stable le gène *prp* de mouton, a montré sa capacité à supporter la réplication de l'agent infectieux (Vilette *et al.*, 2001).

Ainsi, jusqu'à présent aucune lignée cellulaire d'origine gliale périphérique n'avait pu être infectée avec succès *in vitro*.

Le modèle cellulaire MSC-80 offre l'avantage, vis à vis des autres cellules de Schwann qui existent en culture, de ne pas avoir été immortalisé par des techniques de biologie moléculaire (transfection stable de l'antigène T de SV40 comme pour les GT-1). De plus, elles expriment des facteurs spécifiques des cellules de Schwann myélinisantes tels que la protéine S100 ou non myélinisantes tels que la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) (Boutry *et al.*, 1992). Enfin, elles gardent leur capacité à myéliniser des axones dans le cadre de coculture avec des neurones.

Les cellules MSC-80 infestées (MSC^{Ch}) présentent des propriétés similaires avec les autres modèles décrits de réplication *in vitro*. En effet, la PrP^{Sc} produite possède les mêmes caractéristiques que les prions: résistance partielle aux protéases, insolubilité dans les détergents, et infectivité après inoculation à l'animal. Par contre, la détection de la PrP^{Sc} par Western Blot sur les MSC^{Ch} après plus de 10 repiquages représente un atout majeur en comparaison des N2a infestées par la même souche. En effet, la PrP^{Sc} n'est plus détectée dans ces cellules après trois repiquages (Nishida *et al.*, 2000). Enfin, la détection de la PrP^{Sc} est identique après congélation des MSC^{Ch} en vue de leur conservation.

Il est à noter que les lignées neuronales infectées ne présentent pas de signes cytopathologiques particuliers, à l'exception toutefois des GT1 dont une sous population subit des mécanismes d'apoptose (Schatzl *et al.*, 1997). Ainsi, même si les N2a infectées présentent des altérations dans leur réponse à la bradykinine et dans leur fluidité membranaire, il ne semble pas que ces troubles gênent la croissance ou la viabilité de ces cellules (Kristensson *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1996). Cette propriété permet ainsi aux lignées infectées d'être clonées et maintenues en culture sur plusieurs passages. En ce qui concerne les MSC^{Ch}, nous n'avons pas évalué les modifications cytologiques que pouvait induire l'infestation. Toutefois, les tentatives de clonage des cellules MSC^{Ch} se sont révélées infructueuses, laissant suggérer que l'inoculation des cellules pouvait diminuer leur capacité à supporter une dilution limite.

En conclusion, les MSC-80 offrent pour la première fois un modèle de cellule gliale périphérique capable de répliquer les prions *in vitro*, permettant ainsi l'étude des premières étapes qui entrent dans les processus de neuroinvasion le long des fibres nerveuses périphériques.

Dépôt d'un brevet

Le modèle cellulaire, MSC^{Ch}, a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet N° 0011989 sous le titre : « Procédés de propagation *in vitro* de l'agent responsable des ESST ; Lignée cellulaire obtenue et utilisation »

Amélioration du modèle MSC-80 infecté

- **Amélioration de la technique d'infestation.**

L'amélioration du modèle de répllication *in vitro* des prions par les cellules de Schwann pourrait passer par une augmentation de l'infectiosité de l'inoculum. Cette étape pourrait être dérivée de la méthode de Saborio *et al.*, (Saborio *et al.*, 2001) qui permet une amplification *in vitro* de la teneur en PrP^{Sc} d'un échantillon. L'inoculum pourrait ainsi être enrichi en soumettant des échantillons de cerveaux sains et infectés à des étapes de sonification alternées avec des étapes d'incubation (PMCA: "*protein misfolding cyclic amplification*"). La limite de cette technique vient pour le moment du fait que les auteurs n'ont pas montré l'infectivité du matériel nouvellement produit.

- **Clonage cellulaire**

Les cultures de MSC exposées à la souche RML n'ont produit que peu de PrP^{Sc} détectable en Western Blot. Cette observation, déjà décrite dans les N2a, pourrait être due à la présence dans la culture d'une faible proportion de cellules infectées. Sur une culture de N2a infectée avec la souche Chandler, 1 cellule sur 144 en moyenne était infectée (Race *et al.*, 1987). Ce phénomène pourrait être expliqué par l'hétérogénéité des cellules en culture due, en partie, à une instabilité génétique. Après plus de 20 passages, la diminution du titre infectieux serait à

rapprocher d'une dilution de l'agent infectieux au fur et à mesure des divisions cellulaires. Ainsi, afin d'améliorer le modèle présenté, des sous populations de MSC-80 pourraient être isolées par clonage. Le clonage avant infestation ferait ressortir des clones plus sensibles à l'infestation. Le clonage après l'infestation ferait quant à lui apparaître des sous populations cellulaires produisant plus de PrP^{Sc}. Cette lignée serait très intéressante pour l'étude des structures de la PrP^{Sc} dans les cellules de Schwann.

De même, ces travaux permettraient de caractériser parallèlement aux sous populations très sensibles, des cellules partiellement résistantes à l'infestation (Bosque & Prusiner, 2000). L'analyse de l'expression différentielle des gènes entre ces deux sous populations servirait alors de base à l'étude des mécanismes cellulaires supportant la transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc}.

- **Augmentation de l'expression du gène *prnp*.**

Des souris surexprimant le gène *prnp* présentent une période d'incubation plus courte que des souris sauvages. L'implication du niveau d'expression du gène *prnp* dans la pathogénèse de la maladie suggère que des cellules dont l'expression du gène *prnp* serait augmentée pourraient devenir plus sensibles à l'infestation. De récents travaux sont venus étayer cette hypothèse, en montrant que la transfection stable du gène *prnp* de souris dans des cellules N2a permet d'augmenter la sensibilité et la production de PrP^{Sc} (Nishida *et al.*, 2000). La transfection stable du gène *prnp* dans les MSC-80 augmenterait la sensibilité de ce modèle à l'infestation. Toutefois, l'expression ectopique de ce transgène pourrait également conduire à des dérégulations de gènes endogènes pouvant aboutir à la perte du phénotype Schwannien de ces cellules. C'est pourquoi une autre stratégie pourrait être utilisée afin d'augmenter la quantité de PrP^c. Elle pourrait en effet avoir pour objectif d'activer la transcription du gène *prnp* endogène. Ainsi, l'identification de facteurs régulant la synthèse de PrP^c dans les MSC-80 permettrait de modifier le niveau d'expression du gène *prnp* endogène en fonction du milieu de culture. Cette approche offre l'avantage d'une surexpression ou d'une inhibition contrôlée par l'ajout de facteurs de croissance ou de cytokines. Ainsi, il a été montré qu'un traitement de cellules PC12 avec le facteur de croissance des nerfs (NGF) ou l'interleukine 6 (IL6) (Lasmezas *et al.*, 1993) entraîne une augmentation de la transcription du gène *prnp*. Toutefois, la réponse à ces traitements au NGF ou à l'IL6 varie en fonction du type cellulaire traité (neurones lignée PC12 ou astrocytes en culture primaire) (Lazarini *et al.*, 1994).

Parallèlement à l'emploi de ces facteurs de croissance, il a été montré que l'exposition de cellules PC12 à de fortes concentrations de cuivre entraîne la formation de PC12 variants qui présentaient une augmentation de résistance au cuivre mais surtout une augmentation du taux de PrP^c (Brown *et al.*, 1997b).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une régulation du gène codant la PrP est possible à partir de facteurs exogènes. Cependant, l'identification de ces facteurs requiert une meilleure compréhension des mécanismes biomoléculaires qui contrôlent la transcription du gène *prnp* notamment dans les cellules MSC-80.

Chapitre III :
Identification of an intronic regulatory domain in the
bovin *prp* gene

1. Introduction

L'analyse de souris PrP^{0/0} a mis en évidence l'importance de l'expression du gène *prnp* dans la physiopathogénèse des ESSTs (Bueler *et al.*, 1993). Cette expression est une condition *sine qua non* à la réplication de l'agent infectieux dans les organes périphériques, à la neuroinvasion de cet agent et au développement des signes cliniques de la maladie (Brandner *et al.*, 1996a; Blattler *et al.*, 1997). Le temps d'incubation de la maladie après inoculation est inversement corrélé avec le niveau d'expression du gène codant pour la PrP (Manson *et al.*, 1994b; Sakaguchi *et al.*, 1995). Ainsi des souris transgéniques surexprimant la PrP du hamster ou de souris présentent une diminution du temps d'incubation de la maladie (Prusiner *et al.*, 1990; Fisher *et al.*, 1998).

L'insertion, dans des souris PrP^{0/0} de constructions comprenant le gène codant pour la PrP, placé sous le contrôle de promoteurs spécifiques de certains tissus, a permis de montrer le rôle essentiel du ciblage d'expression tissulaire et cellulaire dans la physiopathogénèse des ESSTs. Par exemple, cette expression dans les LB, par l'emploi du promoteur du gène codant pour le facteur régulateur de l'interferon 1 (promoteur E μ) a permis après inoculation ip une réplication de l'agent infectieux dans la rate mais pas dans le cerveau (Raeber *et al.*, 1999b). L'expression du gène *prnp* placé sous le contrôle du promoteur de l'énolase spécifique des neurones (NSE) dans des souris PrP^{0/0} a conduit après ic à la réplication de l'agent infectieux dans le cerveau (Race *et al.*, 1995).

Le ciblage et le niveau d'expression de la PrP^c pourrait expliquer, chez les animaux atteints d'ESB, la présence de l'agent infectieux dans le cerveau, la moelle épinière, la rétine, les ganglions des nerfs paravertébraux et trijumeaux et, à un niveau plus inférieur, dans l'iléon distal (Brown, 2001b). Les travaux de Glatzel *et al.*, ont ainsi montré que l'expression de la PrP^c dans les nerfs périphériques est un facteur déterminant pour le neuroinvasion des prions (Glatzel & Aguzzi, 2000a). Nos précédents travaux ont suggéré le rôle important que peuvent jouer les cellules de Schwann dans le transport des prions jusqu'au SNC après inoculation par voie périphérique (Follet *et al.*, in press). L'ensemble de ces données nous a conduit à rechercher les mécanismes régulant le ciblage et le niveau d'expression du gène *prp* bovin dans les cellules de Schwann.

Les mécanismes contrôlant l'expression ciblée du gène ne sont pas connus. Actuellement, peu de données sont disponibles sur les domaines régulateurs du gène *prp*. Il est caractérisé comme un gène ubiquitaire dit "de ménage". Pourtant, le gène codant la PrP est régulé durant

l'embryogenèse (Manson *et al.*, 1992) et en fonction des tissus (Bendheim *et al.*, 1992). Le promoteur de ce gène a été étudié chez: le bœuf (Inoue *et al.*, 1997), le rat (Saeki *et al.*, 1996b), l'homme (Funke-Kaiser *et al.*, 2001; Mahal *et al.*, 2001) et la souris (Baybutt & Manson, 1997). Dans toutes les espèces, la séquence promotrice minimale présente des sites putatifs de fixation pour des facteurs de transcription tels que SP1 ou AP2. Cependant, l'expression spécifique des tissus et la régulation temporelle du gène ne peuvent pas s'expliquer avec des facteurs aussi ubiquitaires.

Récemment, l'étude des régions promotrices du gène *prp* humain ont suggéré pour la première fois, en amont du site d'initiation de la transcription, des domaines régulateurs employés différemment entre des cellules neuronales et des cellules endothéliales humaines. (Funke-Kaiser *et al.*, 2001). Ces résultats ont suggéré la présence de facteurs de transcription spécifiques des types cellulaires étudiés.

L'objectif de notre travail a donc consisté à localiser des domaines impliqués dans la régulation de la transcription du gène *prp* bovin par les cellules de Schwann. Ainsi, 6,9kb de la région 5' non traduite du gène *prp* bovin ont été placés en amont du gène rapporteur de la luciférase. Cette construction comprend 4,3kb en amont du site initiateur de la transcription suivi des deux premiers exons et du premier intron du gène *prp* bovin. Des clones partiellement délétés ont été obtenus en amont du site d'initiation de la transcription et dans le premier intron. Après transfection transitoire sur des cellules MSC-80, nous avons étudié les variations d'expression du gène rapporteur. Nous avons mis en évidence une région de 220pb (localisée dans le premier tiers de l'intron1) qui est nécessaire à l'expression optimale du gène *prp* dans les cellules de Schwann. Plus particulièrement, l'introduction en double copie de ce domaine a conduit à une surexpression du gène dans les cellules de Schwann mais aussi dans les cellules de neuroblastome N2a.

2. Article

Identification of an intronic regulatory domain in the bovin *prp* gene.

J. Follet^{1, 2}, F. Blanquet-Grossard², J. Gagnon², J. Y. Cesbron³, C. Lemaire-Vieille^{2*}.

¹Laboratoire de Physiopathologie des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles, C.N.R.S. IFR3-Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette BP447, 59021 Lille Cedex (France) ; ²Institut de biologie structurale Jean Pierre Ebel, 41, rue J.Horowitz, 38000 Grenoble (France) ; ³UFR de Médecine de Grenoble, Université Joseph Fourier, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex (France);

*Corresponding author :

Abstract

The PrP protein has a key role in the physiopathogenesis of the transmissible spongiform encephalopathies. Level and localization of expression of the *prp* gene encoding this protein affect the disease profile. In order to determine the regulatory domains of the bovine *prp* gene, we cloned 4,3kb upstream the transcriptional start site followed by two exons and the first intron upstream the luciferase reporter gene. After a serial deletion strategy, transient transfections of the constructs in the mouse Schwann cell line (MSC-80) and in the murine neuroblastoma (N2a) revealed the presence of a 220pb Schwann cell activating domain in the first intron. That domain contained putative binding site for SP1, AP2, Glucocorticoid Receptor and Egr1 transcription factors. Finally, this sequence was capable, when introduced in two copies within the first intron of the bovine *prp* gene, to over express the reporter gene in the two cell types analyzed.

Key words:

Prion, PrP, Gene regulation, Intron, Schwann cell, Reporter gene.

Introduction

The transmissible spongiform encephalopathies (TSE) include bovine spongiform encephalopathies in cattle, scrapie in sheep and goats, and kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome in humans. TSE are fatal slow degenerative diseases of the central nervous system (CNS) characterized by neuronal vacuolation and accumulation of the abnormal isoform (PrP^{Sc}) of a host encoded cellular membrane protein (PrP^C). Infectious particles causing TSEs are considered to be composed largely, if not entirely of PrP^{Sc} (1, 2). During the course of the disease, PrP^{Sc} becomes deposit in and around the cells of the brain in large protease-resistant aggregates. At the periphery, PrP^{Sc} accumulates early in lymphoid organs (spleen (3), lymph node, peyer patch (4)) and peripheral nerves (5).

PrP^C is encoded by a single gene *prp* (6). Its expression is a major condition in scrapie susceptibility as mice devoid of PrP are resistant to infection (7, 8). Furthermore, PrP^C expression is required for prion spread in the CNS and in peripheral organs (7, 9). The *prp* gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in Scrapie pathology (8). Furthermore, transgenic mice overexpressing the mouse or the hamster *prp* gene present a reduction time in the incubation period (10). These transgenic mice also spontaneously develop a lethal neuromuscular disorder with mild vacuolation in the central nervous system, a myopathy affecting skeletal muscle and a demyelinating neuropathy affecting the sciatic nerve (11).

Knowledge of the mechanisms controlling the *prp* gene expression is of real importance. In BSE contaminated cattle, infectivity was described in the brain, the spinal chord, the retina, the paravertebral ganglia, the trigeminal ganglia and in a lower degree in the distal ileum. Glatzel *et al*, (12) demonstrated that PrP^C expression within the peripheral nervous system was determinant to neuroinvasion. Recently, PrP^C expression by Schwann cells was suggested to play a key role in prion neuroinvasion process (13). It might therefore be expected that PrP expression control mechanism within this cell type would be involved in the physiopathogenesis of TSE.

The nucleotide sequences of the potential promoter regions of the *prp* gene in some animal species have been reported (14-18)). The minimal promoter function has been analyzed in mice (19), rat (16), bovine (20), and human (21, 22). The absence of TATA box and the presence of GC rich fragments in promoter domain led to suggest that PrP gene is a housekeeping gene. Even if PrP is observed in a wide range of neuronal and non neuronal cells (23), this expression is well controlled in space (6) and time (24). The bovine *prp* gene consists of three exons (25). The first two encode 5'untranslated sequences and exon three encodes the entire open reading frame. The first one is divided in two exons (1a and 1b) which are post-transcriptionally regulated by an alternative splicing (26, 27).

In order to identify regulatory regions, we cloned 6,9kb of the 5' untranslated domain from the bovine *prp* gene upstream the luciferase reporter gene. We deleted this construct upstream the transcriptional start site and within the first intron and tested these plasmids by transient transfection within the mouse Schwann cell line (Msc-80) and neuroblastoma cell line (N2a). Results led to identify a sequence (+631+851) in the first intron which was capable when introduce in two copies to over-express the reporter gene activity. Finally, sequence analysis of this domain revealed the presence of putative DNA binding site for transcription factors SP1, AP2, Egr1 and the glucocorticoid receptor GR.

Materials and Methods

Cell culture. MSC-80 as N2a neuroblastoma cells were maintained in Dulbecco Modified Eagle Medium completed with 10% fetal calf serum, 2mM L-Glutamine and 100U/ml Penicillin/ Streptomycin.

Plasmids construction. Isolation of the bovine *prp* gene was carried out as described by Lemaire et al, (27). A 6,9kb fragment covering the 5'-upstream region containing with the Exon 1 and 2 and the first intron was subcloned into the *EcorRI* site of the pBluescript SK- plasmid (Stratagene). The *BglII-BamHI* fragment containing 6,9kb was sub cloned into the *BglII* site of the Pgl₃ basic vector (Cl 19) (Promega). An other *Hind III* fragment containing only 3,4kb of the 5'untranslated domain cloned in a bluescript SK- vector was sub cloned into the *Hind III* site of the Pgl₃ basic vector (Cl 197).

Construction of unidirectional deletions in the flanking region. Unidirectional deleted inserts were constructed with the erase-a-base system (Promega). The reporter gene construct (Cl 19) was cut by *MluI*, blunted and cut by *XhoI* leaving exonuclease III sensitive end in the insert. Unidirectional deletions were obtained by exonucleaseIII digestion in 5'-3' direction according to the instruction of the manufacturer. After digestion, plasmids ends were blunted with Kleenow enzyme and relegated with T4 DNA ligase. The number of deleted bases in the obtained reporter gene constructs was determined by sequencing with the primer ^{5'}CTAGCAAATAGGCTGTCCC^{3'}.

Deletion in the first intron. All constructs were originated from the Cl 197. The clone Del 1 was obtained after a double digestion with *SacII* and *SpeI* for 3 h at 37°C, filling in with the Kleenow enzyme and ligation with the T4 DNA ligase. According to the same process, Del 2 was obtained after digestion by *SpeI* and *NdeI*, Del 3 by *SacII* and *NdeI*, Del 5 by *NdeI* and *DraI* and finally, Del6 by digestion with *SacII* and *Dra I*.

The Del 4 construction was obtained by digestion of the Cl 197 by *SphI* and *SpeI* and by *SphI* and *DraI*, after filling in and agarose gel extraction, fragments were ligated overnight.

PCR deletions in the first intron. The plasmid Cl 197 was amplified using a panel of primers as described in table 1, with the Pfu turbo DNA polymerase (Stratagene). PCR cycle condition were: an initial denaturation at 95°C for 30 sec, 25 cycles of a denaturation step at 95°C for 30 sec, an annealing step at 55°C for 1min, and an elongation step at 72°C for 16 min, with a final elongation step at 72°C for 15min. The Pfu DNA polymerase was used for its blunt end formation. PCR product was treated by the *DpnI* restriction enzyme to avoid parental matrix at 37°C for 1h. After Phenol, Chloroform extraction, 200ng of DNA were treated with the T4 polynucleotide Kinase (Gibco, BRL) and ligation was performed using the T4 DNA ligase. Clones were then sequenced for control. PCR3 was performed with the primers For, ⁺⁵²⁹GGAAGAAACGGGCGCCCAAC⁺⁵⁴⁸ and Rev, ⁺³⁰⁸CGGCCCCCGCCACATTCCG⁺²⁸⁷, PCR4 with For, ⁺⁶³¹CCTGCCTGCCATCACGCGGC⁺⁶⁵⁰ and Rev, ⁺⁴¹⁷CCCCTCTACCGGTGCGATTC⁺³⁹⁸, PCR5 with For, ⁺⁷⁴⁴GCGCGGGAATCATGGGCCA⁺⁷⁶³ and Rev, ⁺⁵²⁸CCACCACCCCAAT⁺⁵⁰⁹, PCR6 with For, ⁺⁸⁵¹GAAATCTTCCCCGTCTCGAC⁺⁸⁷⁰and Rev, ⁺⁶³⁰GCCGCCTCTCGGAGGAGTT⁺⁶¹¹, PCR7 with For, ⁺⁹⁶¹GGGTGGCACCTTCACGCTTG⁺⁹⁸⁰and Rev, ⁺⁷⁴³CGAGGCTGAAGCCCAGGCCA⁺⁷²⁴, PCR8 with For, ⁺¹⁰⁷⁹CATATGTAGCAAATAGATTT⁺¹⁰⁹⁸ and Rev,

⁺⁸⁵⁰GCTTTGCTTTTGGGTCCACC⁺⁸³¹, PCR9 with For, ⁺⁶³¹CCTGCCTGCCATCACGCGGC⁺⁶⁵⁰ and Rev, ⁺⁵²⁸CCACCACCCCACCCCAAT⁺⁵⁰⁹, PCR10 with For, ⁺⁷⁴⁴GCGCGGGGAATCATGGGCCA⁺⁷⁶³ and Rev, ⁺⁶³⁰GCCGCCTCTCGGGAGGAGTT⁺⁶¹¹, PCR11 with For, ⁺⁸⁵¹GAAATCTTCCCCGTCTCGAC⁺⁸⁷⁰ and Rev, ⁺⁷⁴³CGAGGCTGAAGCCCAGGCCA⁺⁷²⁴, and PCR12 with For, ⁺⁸⁵¹GAAATCTTCCCCGTCTCGAC⁺⁸⁷⁰ and Rev, ⁺⁵²⁸CCACCACCCCACCCCAAT⁺⁵⁰⁹.

DNA insertion. A PCR Strategy was used to introduce DNA fragment in a precise site. DNA from Cl 197 was submitted to PCR with the Pfu DNA polymerase to amplify a 220pb length fragment with the primers For, ⁺⁶³¹CCTGCCTGCCATCACGCGGC⁺⁶⁵⁰ and Rev, ⁺⁸⁵⁰GCTTTGCTTTTGGGTCCACC⁺⁸³¹. The PCR conditions were: an initial denaturation at 95°C for 30 sec, 25 cycles of a denaturation step at 95°C for 30 sec, an annealing step at 55°C for 1min, and an elongation step at 72°C for 1 min, with a final elongation step at 72°C for 30 sec. After the last cycle, PCR Product was treated for kination. Then DNA from the Del 3 plasmid was amplified by PCR using primers For, ⁺¹⁰⁷⁹CATATGTAGCAAATAGATTT⁺¹⁰⁹⁸ and Rev, ⁺³⁰⁸CGGCCCCGCCCACATTCCG⁺²⁸⁷. Condition cycles were: an initial denaturation at 95°C for 30 sec, 25 cycles of a denaturation step at 95°C for 30 sec, an annealing step at 55°C for 1min, and an elongation step at 72°C for 16 min, with a final elongation step at 72°C for 15min. After the last cycle, PCR product was treated by the restriction enzyme DpnI. Both PCR products were filtered on a Sephadex 50 gel and ligated overnight at 16°C with a T4 DNA Ligase (Gibco BRL). DNA constructions were then sequenced to confirm the number, the location and the orientation of the inserts. Construct containing one insert in sens orientation was called PCR 15.1 and the plasmid including two inserts in sens orientation was called PCR15.10.

One site mutagenesis. *In vitro* site directed mutagenesis were performed with the QuickChange^(TM) site directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the technical procedure described by the manufacturer. Briefly, 50ng of plasmid were amplified with the Pfu turbo DNA polymerase by PCR using the primer ⁺⁷²⁶GCCTGGGCTTCAGCCTCAACGCAAGGAATCATGGGCCA⁺⁷⁴³ and the primer ⁺⁷⁴³TGGCCCATGATTCCTTGC-GTTGAGGCTGAAGCCCAGGC⁺⁷²⁶. PCR cycle condition were: an initial denaturation at 95°C for 30 sec, 12 cycles of a denaturation step at 95°C for 30 sec, an annealing step at 55°C for 1min, and an elongation step at 68°C for 16 min. At the last step, PCR product was cold on ice and treated with the *DpnI* endonuclease at 37°C for 1h. One microliter of the *DpnI* treated product was used to transform by heat shock, super competent cells.

Transient transfection and dual luciferase assay. Transfections of plasmids were carried out by lipotransfection. After midi kit Qiagen DNA preparation, 250ng of plasmid derived from Pgl₃ were incubated 15min at room temperature with 2µl of PEI (Euromedex) in 100µl of OptiMEM (Gibco BRL). To normalize the transfection efficiency, 100 ng of plasmid control (HSV-tk PRL Promega) were cotransfected with each reporter gene constructs. After 24 h of culture, 3.10⁵ cells per well were incubated with the DNA PEI mix for 7 h at 37°C. Dual luciferase activity (*luc*) in cell lysate, prepared 48h post transfection, was measured according to the manufacturer's protocol (Promega) as relative units using a Wizzard luminometer (Pacard). All transfection experiments were repeated, at least in triplicate 3 times with 3 different DNA preparations. Luciferase activities represent the average of independant transfection experiment. Results were normalized for transfection efficiency

between wells by dividing the luciferase activity of the construct tested by the levels of the control plasmid. Finally, luciferase levels were expressed relative to Cl 197 which was set to 100% activity.

DNA sequence analysis. Sequence alignments were performed with the DNA star software according with the Martinez/Needleman Algorithm. In order to present 800pb upstream the transcriptional start site, the first intron and the exons 1 and 2, human *prp* gene sequence on GenBankTM (accession number HSU29185) was selected from 11834 to 15488 and Bovine *prp* gene sequence on Genbank (accession number AF163764) from 3529 to 6923. Nucleotide sequence was numbered in reference to the transcriptional start site (+1). Transcription binding site analysis of the +631+851 sequence was performed from TRANSFAC 4.0 sites using the Alibaba2.1 software with a matrix conservation of 75%.

Results and Discussion

Characterization of the 4,3kb sequence among the transcriptional start site

We have recently cloned and sequenced -4329 to +2594 of the 5' flanking region of the bovine *prp* gene (27). This 6,9 kb genomic fragment contains 4.3 kb of the promoter region followed by two untranslated exons and the first intron. To examine its functional activity, we cloned this regulatory region into pGL₃-basic firefly luciferase reporter plasmid vector (Promega), which contains neither a promoter nor enhancer. The promoterless construct pGL₃ served as the background control. To identify the regulatory elements, we performed a serial 5' deletion of the region upstream the transcriptional start site. Luciferase activity was measured after transient transfection of the Schwann cell line (MSC80) with these constructs. The construct -801 to +2594 (CI 197) used arbitrarily as reference (100%) was 80 fold higher in expressing the reporter gene as the basic vector in this cell type (Data not shown).

In MSC-80 (Fig. 1A), deletion of 814pb (CI 19 -4329 and CI4 -3515) had a low effect on luciferase expression and increase activity from 56% to 91% activity (Fig. 1B). This level remains unchanged between CI 4 and CI 13. An additional 1016 pb deletion between CI 13 (-2111) and CI 2 (-1095) lead to a low decreasing of the reporter gene expression. Activity was restored to 100% after 292 pb deletion (CI 197). However, as we considered a two fold modification as significant, all these variations were not assumed to be significant. Therefore, we concluded that non important functional domain of the bovin PrP promoter is located within nucleotide position -4329 to -801. We did not further investigated the regulatory region downstream position -801 (CI 197), because Inoue *et al*, (20) has already determined the basal promoter activity of bovine PrP within nucleotide position -88 to -30. This sequence presented a potential active binding site for SP1 or AP2. These transcriptional factors are functional in many housekeeping gene promoters but the tissue specific and temporal regulation of the *prp* gene expression did not seem to be accounted by these ubiquitous transcription factors. Previous studies have also reported the presence of 4 conserved sequences (from -182 to -189; from -206 to -220; from -250 to -2636 and from -270 to -282) between rodents, human and sheep which were believed to contain regulatory elements (16, 17). However, functional analysis showed that none of these regions contribute to the *prp* gene expression in epithelial bovine cell (20).

To examine the influence of intron I on promoter activity, several deletion mutants were constructed and the transcriptional activities derived from these regions were also analyzed in the same way as described above (Fig. 1A). These deletions mutants were construct from CI 197. Plasmids Del 5, Del 2 and Del 4 respectively deleted for +1082 to +2370, +1082 to +1658 and +1658 to +2370 fragment did not exhibit any significant variation of activity (Fig.1B). However, deletion of a DNA fragment in Del 3 from +305 to +1082 induced a 10 folds decrease in luciferase reporter gene activity (13% activity compared to the CI 197). In contrast, constructs Del 6 and Del 1 whose deletion overlap this domain (respectively +305 to +2370 and +305 to + 1658) present a marked decrease in the reporter gene expression respectively to 47% and 31%. These results led to suggest the presence between +305 to +1082 of an important regulatory sequence for the *prp* gene regulation. On the basis of these results, we generated from CI 197 construct an additional set of deleted plasmids. We used a PCR strategy using the very high fidelity DNA polymerase Pfu (Promega) to reduce the risk of random mutation. Each

construct (6 from PCR 3 to PCR 8) contains deletions of 200 pb which overlap of 100 pb between them (Fig. 2A). After transient transfection in MSC-80 cells, luciferase activity (Fig. 2B) in PCR 3 construct (+308 to +529 deletion), PCR 4 construct (+418 to +631 deletion) and PCR 8 construct (+851 to +1079 deletion) did not present any significant variation leading us to consider that no activating domain were included between +308 to +631 and between +851 to +1079. However, PCR 5 construct (+529 to 744 deletion), PCR 6 construct (+631 to +851 deletion) and PCR 7 construct (+744 to +961 deletion) exhibited a decrease respectively to 34%, 35% and 42% activity and an overlapping deleted plasmid PCR 12 construct (+529 to +851) presented a 22% luciferase activity. In order to confirm these results we generated another set of 100 pb deletion between +529 to +631 (PCR 9 construct), +631 to +744 (PCR 10 construct) and +744 to +851 (PCR11 construct) (Fig.2A). PCR 9 construct which did not include the putative regulatory domain was used as negative control. As expected, PCR 9 construct did not shown any variation in the reporter gene activity. However, PCR 10 construct and PCR 11 construct exhibited a decrease in luciferase activity respectively to 32% and 52%. This data confirmed results obtained with PCR 5, PCR 6 and PCR 7 with an activating function included between +631 to +851. To ensure that this regulatory domain participates in cell-type specific gene expression, we transfected these constructs in an other cell type, the murine neuroblastoma cells (N2a) which are commonly used to study the gene regulation (19). N2a transfection did not exhibit the same pattern of expression with the 200 pb nor the 100 pb set of PCR deletion (Fig2 B). None of the construct was able to produce any significant variation in luciferase expression. This experiment led us to suggest that the region corresponding to +631 to +851 serves as the *cis*-element up regulating the promoter activity in the Schwann cell line MSC-80.

To confirm the contribution of the +631 to +851 domain, one (PCR 15.1 construct) or two copies (PCR 15.10 construct) of this region were introduced in the sense orientation into the Del 3 construct (Fig. 3A). As shown on Fig. 3B, Del 3 construct exhibited a very low level of expression (13%) however, introduction of a single copy of the +631 to +851 fragment was sufficient to restore 115% activity in MSC-80 cells and 176% activity in N2a cells. Furthermore, plasmid containing the double copy of the fragment +631 to +851 showed an overexpression of the reporter gene respectively up to 354% in MSC-80 and to 500% in N2a. Such a result could hardly be explained by a modulation in the mRNA splicing or stability as suggested Inoue *et al*, (20) for the bovine *prp* gene or by Saeki *et al*, (16) for the rat *prp* gene. Furthermore, these observations can hardly be interpreted by chromatin conformation as suggested Cabral *et al*, (28)

However, the presence of transcription factors binding site might be in agreement with these observations as multiple binding site would allow fixation of much more factors and consequently a higher expression level.

Because important regulatory elements tend to be evolutionarily conserved, we further examined this hypothesis by sequence analysis. A Human DNA fragment (HSU 29185) containing 800 pb upstream the transcription start site, the intron 1 and 2 and the entire intron 1 was used for comparison with the +631 to +851 bovine sequence. Several regions were observed with a 100% homology between the bovine and the human sequence (Table1). Further analysis of these consensus boxes revealed the presence of highly conserved DNA binding sites (Table 1) for transcription factors. Egr1/Sp1 cluster was observed as well as binding site for C/EBP alpha, MyoD and the Glucorticoid Receptor (GR). Out of these consensus boxes, AP2 alpha binding sites were observed on the bovine sequence (data not shown). AP2 sites were reported to be most frequently found in promoters of genes active in cells of the neural crest lineage, and several examples existed of their involvement in neuron specific activity (29). The presence of redundant binding site such as SP1 or AP2 could then explain our results showing in N2a

cells that the transcriptional activity of the various construct were unaffected by the deletions within the +631 to +851 domain. However, the presence of single binding site such as Egr1 or GR could explain gene expression variations observed after transfections in MSC-80 cells. Thus early gene responsive factors (Egr1, Egr2) were well described as strong regulatory elements in myelin forming proteins (MPB, PO). Whereas Glucocorticoids were implicated in regulating the differentiation of glial cells in culture suggesting an interaction of various hormones (Progesteron (30), oestradiol (31, Koenig, 1995 #8221) in the myelination process (32).

More interestingly, the sequence from +534 to +542 on the human sequence was similar in sense orientation to the bovine +744 to +752 sequence and correspond to a GC rich region. This domain contain a putative binding site for SP1 and Egr1. In order to test the Egr1 binding site function, a plasmid with a punctual mutation was created to abolish this site (Fig. 3A). Transient transfection of this construct (Fig. 3B) presented a weak modulation of the reporter gene in MSC80 cell (68%) and did not markedly affect the activity of the reporter gene in N2a cells (118%). However, these modifications were not significant suggesting the involvement of an other transcription factor binding site.

The present study led to the identification of important regulatory elements contained within intron 1 of the bovine *prp* gene i.e. between base pairs +631 and +851. We further showed that this intronic DNA fragment, when inserted in two copies enhance markedly the expression of the reporter gene in Schwann cell line. It might therefore be expected that introduction of this domain in multiple copies within the first intron of the *prp* gene in transgenic mice or in cell line could represent a new strategy in creating susceptible models over-expressing the *prp* gene. Finally, functional identification of the transcription factors included in the +631 to +851 domain would lead to description of regulating pathway involved in *prp* gene control. Such data would *in fine* give new target for prophylactic approach aiming at repressed PrP expression.

Bibliographie

1. Prusiner, S. B. (1982) *Science* **216**, 136-144.
2. Prusiner, S. B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-13383.
3. Pattison, I. H., and Jones, K. M. (1968) *Nature* **217**, 102-104.
4. Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Inge Lie, K., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H., and Landsverk, T. (2000) *J Gen Virol* **81**, 2327-2337.
5. Kimberlin, R. H., and Walker, C. A. (1980) *J Gen Virol* **51**, 183-187.
6. 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., and et al. (1985) *Cell* **40**, 735-746.
7. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) *Cell* **73**, 1339-1347.
8. Manson, J. C., Clarke, A. R., McBride, P. A., McConnell, I., and Hope, J. (1994) *Neurodegeneration* **3**, 331-340.
9. Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blattler, T., Fischer, M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13148-13151.
10. Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., and et al. (1990) *Cell* **63**, 673-686.
11. Westaway, D., DeArmond, S. J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Carlson, G. A., and Prusiner, S. B. (1994) *Cell* **76**, 117-129.
12. Glatzel, M., Heppner, F. L., Albers, K. M., and Aguzzi, A. (2001) *Neuron* **31**, 25-34.
13. Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, S., Chauvin, J. P., Decavel, J. P., Varea, R., Grassi, J., Fontès, M., and Cesbron, J. Y. (in press) *J Virol*.
14. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., and Weissmann, C. (1986) *Cell* **46**, 417-428.
15. Puckett, C., Concannon, P., Casey, C., and Hood, L. (1991) *Am J Hum Genet* **49**, 320-329.
16. Saeki, K., Matsumoto, Y., Matsumoto, Y., and Onodera, T. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 47-52.
17. Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G. A., and Prusiner, S. B. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6418-6422.
18. Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C. M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A. L., Detwiler, L., and Prusiner, S. B. (1994) *Genes Dev* **8**, 959-969.
19. Baybutt, H., and Manson, J. (1997) *Gene* **184**, 125-131.
20. Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., and Shinagawa, M. (1997) *J Vet Med Sci* **59**, 175-183.

21. Mahal, S. P., Asante, E. A., Antoniou, M., and Collinge, J. (2001) *Gene* **268**, 105-114.
22. Funke-Kaiser, H., Theis, S., Behrouzi, T., Thomas, A., Scheuch, K., Zollmann, F. S., Paterka, M., Paul, M., and Orzechowski, H. D. (2001) *J Mol Med* **79**, 529-535.
23. Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Merz, G. S., Wolfe, G. C., Wisniewski, H. M., and Robakis, N. K. (1990) *Acta Neuropathol (Berl)* **80**, 1-6.
24. Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., and Hope, J. (1992) *Development* **115**, 117-122.
25. Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y., and Shinagawa, M. (1998) *Anim Genet* **29**, 37-40.
26. Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y., and Shinagawa, M. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 650-654.
27. Lemaire-Vieille, C., Schulze, T., Podevin-Dimster, V., Follet, J., Bailly, Y., Blanquet-Grossard, F., Decavel, J. P., Heinen, E., and Cesbron, J. Y. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5422-5427.
28. Cabral, A. L., Lee, K. L., and Martins, V. R. (in press) *J Biol Chem*.
29. Sato, T., Xiao, D. M., Li, H., Huang, F. L., and Huang, K. P. (1995) *J Biol Chem* **270**, 10314-10322.
30. Guennoun, R., Benmessahel, Y., Delespierre, B., Gouezou, M., Rajkowski, K. M., Baulieu, E. E., and Schumacher, M. (2001) *Brain Res Mol Brain Res* **90**, 75-82.
31. Jung-Testas, I., Schumacher, M., Robel, P., and Baulieu, E. E. (1994) *J Steroid Biochem Mol Biol* **48**, 145-154.
32. Chan, J. R., Phillips, L. J., 2nd, and Glaser, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10459-10464.

Figures and legends

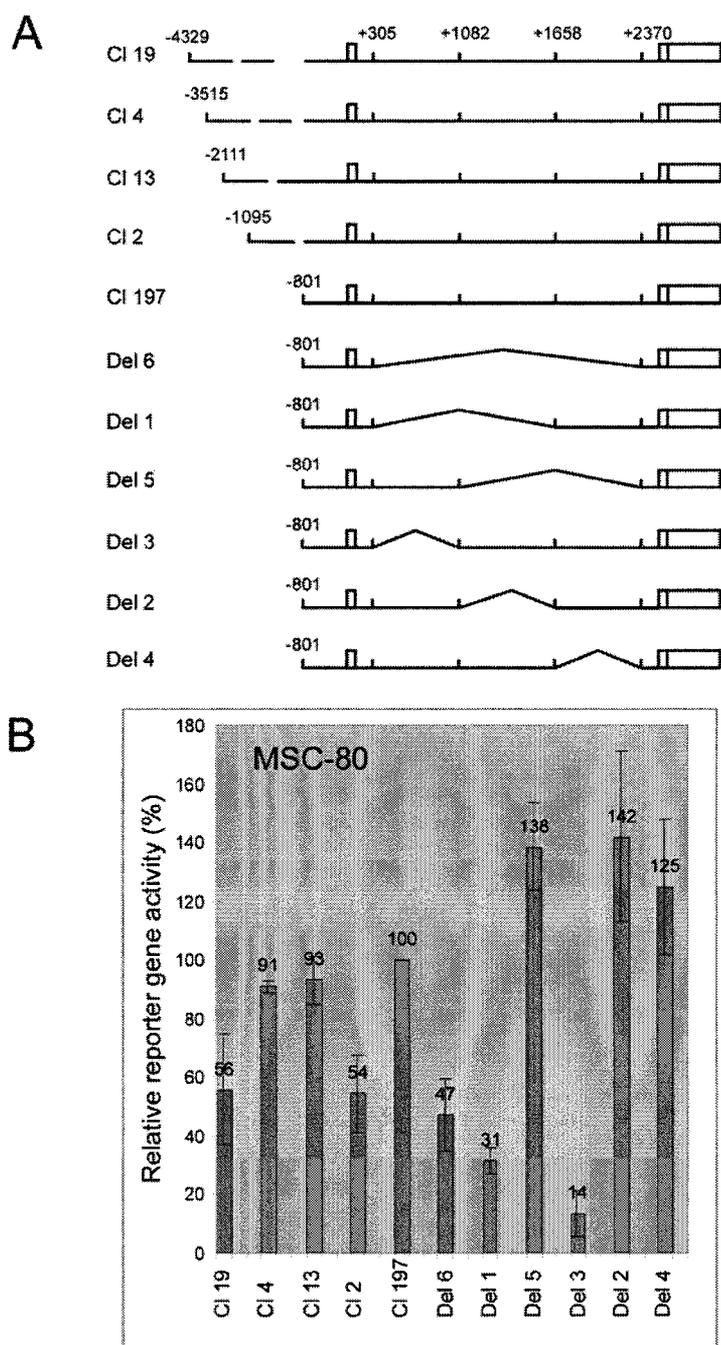


Figure 1: (A) Schematic representation of the 5' deletions within the bovin *prp* gene 5'UTR region. (B) Luciferase activity obtained after transient transfection in MSC-80 cells. Results are expressed relatively to the clone 197 given as 100% activity. Data are normalized for transfection efficiency to *Renilla* luciferase expression driven by cotransfected HSVtkPRL. Data represent the mean value obtained from at least three independent experiments performed in triplicate. Data are mean \pm SD.

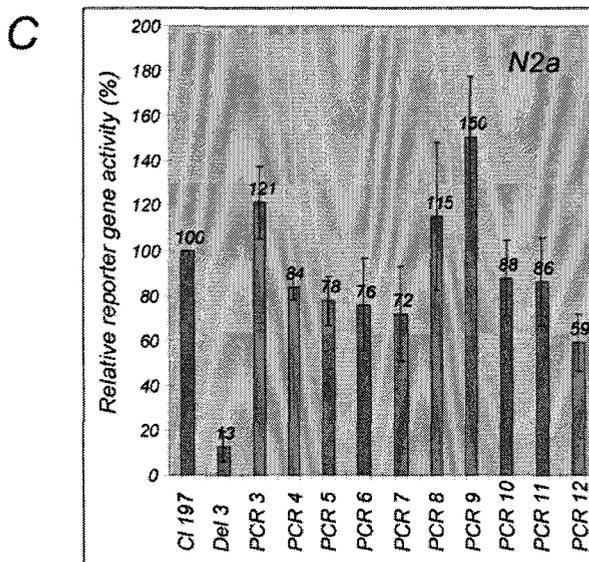
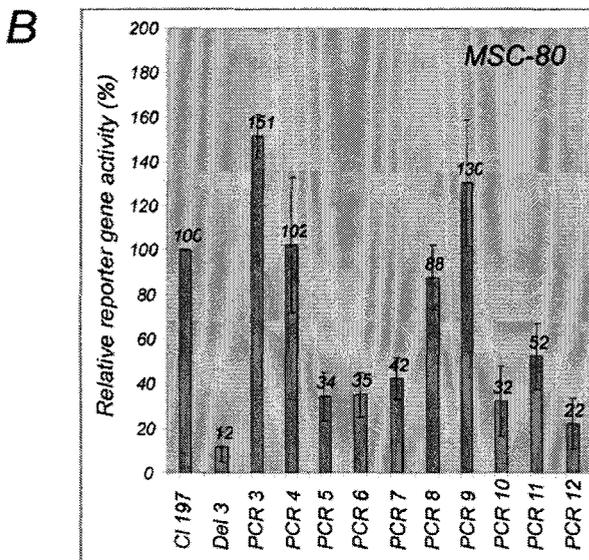
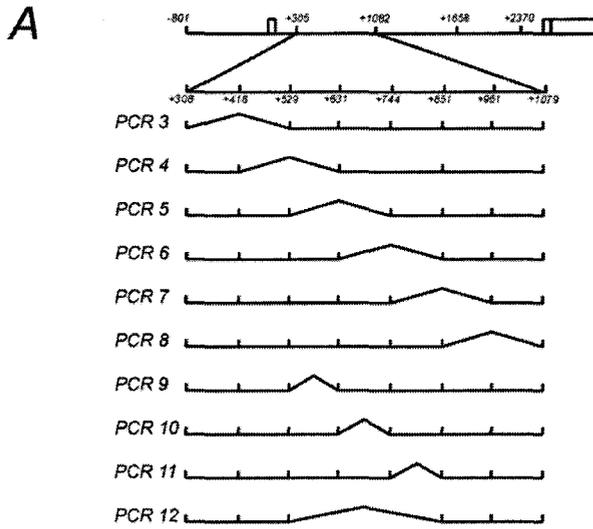


Figure 2: (A) Schematic representation of serial deletion within the +305+1082 region used in transfection assay. (B) Relative luciferase activity of the deleted constructs transfected in MSC-80 cells. (C) Relative reporter gene activity of deleted constructs transfected in N2a. The experiments were performed independently at least three times. The transcriptional activity from triplicate transfection was measured and normalized to the expression of the HSVtkPRL plasmid. The relative expression of each construct was then converted to a percentage of the luciferase expression from the full length Cl197. The error bars represent \pm SD.

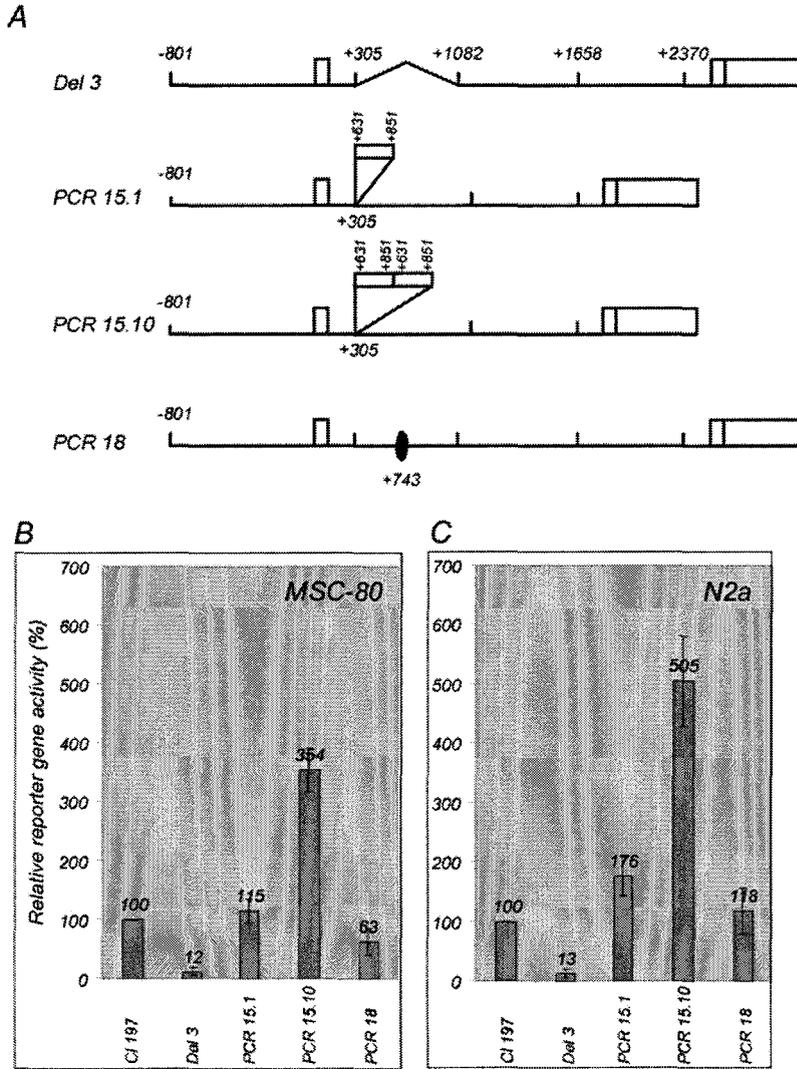


Figure 3: (A) Schematic representation of +631+851 insertion construct and point mutation of the putative Egr1 binding site. (B) The transcriptional activity of the inserted or deleted constructs transfected in MSC-80 cells or (C) in N2a cells. Reporter gene expression was normalized to the HSVtk PRL plasmid activity. Results from at least three transfection which were assayed in triplicate were converted to a percentage of the Cl197 activity. The error bars represent \pm SD.

Hu	+534	+542	
Bo	+744	+752	
	GGCGCGGGG ***** *****		Egr1 Sp1
Hu	+640	+648	
Bo	+765	+773	
	CCTGGCGCT ***** *****		Sp1 MyoD
Hu	+1417	+1425	
Bo	+808	+816	
	AGTGTTC ***** *****		GR CEBP/alpha

Table 1 : Sequence homologies between the bovine (Bo) and the human (Hu) *prp* gene. Sequences localization are referred to the transcriptional start site as +1. Transcription factor binding site (underlined by *****) were analyzed from TRANSFAC 4.0 sites using the Alibaba2.1 software with a matrix conservation of 75%.

3. Discussion

Les travaux dérivés de souris PrP^{0/0} inoculées (Bueler *et al.*, 1993; Brandner *et al.*, 1996b) ont montré le rôle essentiel de l'expression de la PrP^c dans les phénomènes de propagation répliquée des prions. De récents travaux ont toutefois mis en évidence que l'expression du gène *prp* n'était pas, à elle seule, suffisante pour soutenir la répliquée de l'agent infectieux. En effet, le type de cellule exprimant ce gène est également important dans la pathogénèse des ESSTs. De plus, le niveau d'expression de ce gène est inversement corrélé avec le temps d'incubation de la maladie. Par conséquent, l'étude des mécanismes supportant le contrôle de la localisation et du niveau d'expression du gène *prp* est essentielle à la compréhension des mécanismes supportant la genèse des maladies à prions.

L'analyse de souris transgéniques surexprimant le gène codant pour la PrP de souris ou de hamster (Prusiner *et al.*, 1990) a mis en évidence une démyélinisation des nerfs périphériques (Westaway *et al.*, 1994b). Parallèlement à ces résultats, l'étude du SNP de souris PrP^{0/0} a montré que ces souris présentaient également des altérations des processus de myélinisation (Nishida *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données montre que le contrôle de l'expression de la PrP^c dans les cellules de Schwann est important du point de vue physiologique. De plus, l'analyse quantitative par RT-PCR en temps réel d'une banque d'ADN complémentaire a permis d'étudier les gènes exprimés après la section du nerf sciatique. Cette technique a montré que le gène *prnp* est induit dans les cellules de Schwann après section du nerf (Araki *et al.*, 2001). Ces données suggèrent donc que l'expression du gène codant pour la PrP pourrait être inductible dans ce type cellulaire.

Nous avons donc recherché les domaines régulateurs impliqués dans le contrôle de la transcription du gène *prp* dans les cellules de Schwann MSC-80.

La première étape de ce travail a concerné le domaine situé en amont du site d'initiation de la transcription. La région promotrice minimale du gène *prp* bovin a été localisée entre les positions -88 et -33. Ce domaine correspond également à celui décrit pour le gène *prp* de rat (Saeki *et al.*, 1996b). Notre étude s'est donc intéressée à la région située en amont de ce site (de -801 à -4329). L'analyse des délétions sériées réalisées dans ce domaine n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives d'activité du gène rapporteur. Ces données ne nous ont ainsi pas permis de caractériser de domaine activateur ou inhibiteur en amont du site d'initiation de la transcription.

La deuxième partie de notre travail s'est intéressée au rôle du 1^{er} intron du gène *prp* bovin

dans la régulation du niveau d'expression et du ciblage cellulaire.

Le domaine +123+891 a été identifié pour son implication dans la régulation du gène *prp* bovin après transfection transitoire dans des cellules épithéliales bovines (Inoue *et al.*, 1997). Notre étude a mis en évidence la présence d'un domaine activateur dans le premier tiers de l'intron 1 sur des cellules de Schwann. Il a également permis d'identifier une zone d'intérêt comprise entre les positions +631 et +851.

Il est particulièrement intéressant de noter que les travaux de Baybutt *et al.*, n'avaient pas mis en évidence de rôle particulier du premier tiers de l'intron 1 dans la régulation du gène *prnp* murin après transfection dans des cellules N2a (Baybutt & Manson, 1997). De même, ces travaux avaient montré la présence d'une région inhibitrice dans la deuxième moitié de l'intron. Or ces résultats n'ont pas été reproduits chez le bovin ni par Inoue *et al.*, ni dans notre laboratoire. La différence de résultats peut ici être due aux modèles cellulaires employés *in vitro* qui ne reproduisent que très partiellement l'ensemble des mécanismes régulateurs des gènes. Toutefois, ces divergences peuvent également être dues à des variations inter-espèces. Ces différences de structures dans les régions régulatrices du gène peuvent être à la base des différences de localisation d'expression de la PrP^c observées entre les espèces murine et bovine.

Notre travail a mis en évidence la présence d'un domaine de 220pb essentiel à l'expression normale du gène. L'introduction de cette séquence, dans une construction délétée de +305 à +1082 qui présente un très faible niveau d'expression, a permis de restaurer une activité transcriptionnelle équivalente à celle du clone de référence non délété. Ces résultats ont été obtenus aussi bien dans les N2a que dans les MSC-80. Plus particulièrement, ce domaine de 220pb introduit en double copie, dans le même plasmide délété, a provoqué une surexpression du gène d'un ordre de 5 fois pour les N2A et de 3 fois pour les MSC-80. Ces données confirment l'importance de cette région dans les mécanismes de contrôle du gène *prp* bovin.

Ces résultats présentent un intérêt pour le modèle des cellules de Schwann MSC-80 infectées décrit lors de nos précédents travaux. En effet, les tests de transfusions ayant été réalisés sur des cellules murines (N2a et MSC-80) suggèrent que la séquence bovine du gène *prp* +631+851 peut être reconnue par des facteurs murins. Par conséquent, l'introduction de ce domaine dans le premier intron du gène *prnp* murin pourrait permettre l'augmentation du niveau d'expression de ce gène. La réalisation de clones transfectés de manière stable avec ces constructions permettrait de faire surexprimer le gène *prnp* dans les MSC-80. Ces clones cellulaires pourraient devenir plus sensibles à l'infestation par les prions et ainsi améliorer le

modèle de réplication cellulaire décrit lors de nos précédents travaux.

Il reste encore à évaluer les effets produits sur le niveau d'expression du gène par l'insertion d'un plus grand nombre de copies du domaine +631+851. De même, il faudra tester l'influence de la zone d'insertion de cette séquence. L'insertion du premier intron du gène *prp* bovin en aval du gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl transférase a montré, après transfection transitoire dans des cellules épithéliales bovines, que l'expression du gène était totalement inhibée. Ces résultats suggèrent l'absence d'une activité "enhancer" dans le premier intron du gène *prp* bovin (Inoue *et al.*, 1997).

Il reste également à identifier le mode d'action du premier intron sur la régulation du gène.

Les introns peuvent intervenir dans la stabilité des ARNm en agissant sur les mécanismes d'épissage (Gruss & Khoury, 1980). Ainsi, ces mécanismes alternatifs ont été impliqués dans le ciblage d'expression du gène *prp* chez le hamster (Li & Bolton, 1997). En effet, ces travaux ont montré que la présence de l'exon 2 dans l'ARNm haPrP pouvait varier en fonction des tissus étudiés suggérant un rôle de l'épissage de cet exon dans la régulation cellulaire spécifique du gène. De tels mécanismes d'épissage alternatifs ont également été rapportés pour le gène *prp* bovin sans toutefois avoir montré de tropisme tissulaire particulier (Lemaire-Vieille *et al.*, 2000).

Les travaux de Cabral *et al.*, (Cabral *et al.*, in press) ont montré sur des cellules de gliome (C6) et phéochromocytome de rat (PC12) que l'activité promotrice du gène *prp* est extrêmement dépendante de la conformation chromatinienne de l'ADN. La régulation de certains gènes est limitée au degré d'acétylation des histones dans la chromatine. Par exemple, le facteur de transcription SP1 peut être activateur ou inhibiteur en fonction d'une compétition entre l'histone déacétylase (inhibiteur de la transcription) et l'activité histone acétylase de l'E2F1 (Doetzlhofer *et al.*, 1999). Il a ainsi été postulé que l'acétylation des histones réduit leur affinité pour l'ADN et permet alors un accès plus aisé aux facteurs de transcription. La structure des introns pourrait peut-être intervenir dans la stabilisation de la conformation chromatinienne et agir ainsi sur la relation entre l'ADN et les histones.

Enfin, il apparaît que les régions en aval du site d'initiation de la transcription peuvent contribuer à la régulation du gène en agissant en synergie avec le promoteur minimal placé en 5' de l'exon 1 (Bae *et al.*, 1995; Tiffany *et al.*, 1996). Ce mécanisme est-il alors impliqué dans le contrôle de l'expression de la PrP^c ? La régulation transcriptionnelle pourrait donc faire appel à des facteurs de transcription cellule spécifique se fixant dans le premier intron.

Suite à l'identification du domaine +631+851, nous avons donc recherché les sites putatifs de fixations de facteurs de transcription présents dans ce domaine. Cette analyse a montré la présence d'un site de fixation pour le facteur de transcription Schwannien Egr1. Les résultats obtenus par mutagenèse dirigée de ce site ont montré une très légère diminution du signal dans les cellules de Schwann et aucune variation dans les cellules N2a. Toutefois, la modification du niveau d'expression observée dans les cellules de Schwann n'est pas significative.

L'identification du ou des facteurs de transcription régulant le gène *prp* reste donc à établir. Elle apporterait toutefois la base du ciblage d'expression de la PrP^c dans les cellules de Schwann. Plus particulièrement, ces données permettraient d'aborder l'étude des voies de signalisation qui induisent la transcription du gène *prp* à partir de signaux extracellulaires. En effet, les facteurs de transcription peuvent être sous l'influence de cytokines, de vitamines, d'hormones, ou de facteurs de croissances (Hsu *et al.*, 1994). La compréhension des voies de régulation de la machinerie transcriptionnelle du gène *prp* dans les cellules de Schwann permettrait l'amélioration des modèles cellulaires actuellement disponibles. Par exemple, la Progestérone stimule *in vitro* l'expression de Egr2 (Krox 20) dans les cellules MSC-80 (Guennoun *et al.*, 2001). De même, l'ajout de triiodothyronine dans le milieu de culture induit, dans le même modèle cellulaire, l'expression rapide et élevée des facteurs de transcription Egr1, Egr2, Egr3, Jun-B, c-Fos et Fos B (Mercier *et al.*, 2001). Ces deux traitements permettraient peut-être, si l'un des facteurs précités est impliqué dans le contrôle du gène *prp*, d'augmenter le niveau d'expression de cette protéine dans les MSC-80. Cette surexpression pourrait alors rendre nos cellules plus sensibles à l'infestation (Nishida *et al.*, 2000).

A l'inverse, l'inhibition des facteurs de transcription impliqués dans cette transcription Schwannienne diminuerait l'expression de la PrP^c. Cette chute d'expression altérerait, ainsi, la capacité des cellules de Schwann à répliquer l'agent infectieux. Par conséquent, les facteurs de transcription identifiés deviendraient des cibles pour les traitements thérapeutiques. En effet, les substances qui agissent sur la transcription des gènes sont de plus en plus utilisées en thérapie ou de manière prophylactique. Ces stratégies sont, pour le moment, toutes caractérisées sur la base de leur effet dans des mécanismes biologiques tel que l'inflammation ou la réponse à des hormones. Toutefois, la connaissance accrue des mécanismes de transcription ouvre la voie à de nouvelles générations de molécules visant à moduler l'expression des gènes en modulant la synthèse de ces facteurs. Ces nouvelles stratégies peuvent passer par la régulation des facteurs de transcription *via* des ligands ou des cascades

de phosphorylation, par leurs interactions avec d'autres protéines, ou par leur fixation à l'ADN.

En conclusion, notre travail a permis d'apporter un nouvel éclairage sur les domaines qui contrôlent l'expression du gène *prp* bovin, plus particulièrement dans le premier intron. Il ouvre ainsi la voie à la caractérisation des facteurs de transcription impliqués et des voies de signalisation empreintées lors du contrôle Schwannien d'expression du gène *prp* bovin.

Dicussion Perspectives

Discussion Perspectives

Proposition d'un modèle de propagation passant par la cellule de Schwann

Actuellement, trois modèles de neuroinvasion des prions peuvent être décrits (Figure 8 : Voies de neuroinvasion des prions.). La première voie ne ferait intervenir que des éléments du SLR. Après ingestion, l'agent infectieux est tout d'abord retrouvé dans les organes lymphoïdes associés au tube digestif (TD) (Maignien *et al.*, 1999; Heggebo *et al.*, 2000) tels que les plaques de Peyer et les ganglions lymphoïdes mésentériques, avant d'être localisé dans les organes lymphoïdes non associés au TD tels que la rate, les amygdales ou le thymus. Au niveau cellulaire, l'agent traverserait la paroi intestinale par les cellules M au niveau des plaques de Peyer. En effet, ces cellules ont déjà été impliquées dans le passage de bactéries et ont été récemment montrées aptes à soutenir un transport transépithéliale des prions (Heppner *et al.*, 2001). L'agent serait ensuite répliqué par les cellules folliculaires dendritiques (présentes dans les centres germinatifs des plaques de Peyer et de la rate) avant d'être transporté jusqu'au SNC par les cellules dendritiques (Aucouturier *et al.*, 2001).

La seconde voie de propagation ferait appel uniquement à des éléments du SNP. En effet, le système nerveux entérique, composé par les Plexus de Meissner et de Auerbach (Figure 8), est innervé par les fibres parasympathiques du nerf vague. L'agent infectieux passerait alors directement des plexus (Beekes & McBride, 2000) au SNC *via* les fibres du système nerveux parasympathique et les noyaux dorsaux médians du nerf vague (DMNV) (Kimberlin & Walker, 1989a; Baldauf *et al.*, 1997; Beekes *et al.*, 1998). De même, les fibres sympathiques du nerf splanchnique (ciblant les segments thoraciques de la colonne vertébrale) innervent le système digestif au niveau des complexes ganglionnaires caeliaques et mésentériques (CMCG) (Groschup *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2001; McBride *et al.*, 2001). La neuroinvasion pourrait donc avoir lieu directement par le SNS *via* ces ganglions et la colonne vertébrale (Kimberlin & Walker, 1982; Kimberlin *et al.*, 1983a; Beekes *et al.*, 1996; Hainfellner & Budka, 1999; McBride & Beekes, 1999).

Enfin, une troisième voie de propagation, que l'on pourrait appelée mixte, ferait appel à des éléments du SLR et du SNP. En effet, les fibres du système nerveux sympathique innervent de nombreux organes lymphoïdes et notamment la rate. Ainsi, la neuroinvasion pourrait faire appel à une étape de réplication dans les organes lymphoïdes avant un transport de l'infectivité par les fibres du SNS.

Il apparaît que les différentes voies de propagation peuvent coexister au sein d'une même

espèce. De plus, la voie de transport empruntée dépend de la souche de prion inoculée. Ainsi, en fonction des souches de prion, on aurait un profil SLR, SNP ou SLR/SNP.

L'identification des mécanismes cellulaires impliqués dans le transport des prions depuis les voies périphériques d'inoculation jusqu'au SNC a fait l'objet de nombreuses études. Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de certaines cellules du SLR telles que les CFD, les cellules dendritiques ou les cellules M, mais n'ont pas encore permis d'identifier les acteurs cellulaires impliqués dans le SNP.

Nos travaux ont montré que les cellules de Schwann pouvaient représenter le maillon cellulaire impliqué dans le SNP. En effet, leur capacité à répliquer *in vitro* l'agent infectieux suggère un modèle de transport dit "en domino". Selon cette hypothèse, l'agent infectieux serait répliqué dans une cellule de Schwann par transconformation de la PrP^c endogène en PrP^{Sc}. Puis la PrP^{Sc} néosynthétisée serait transmise aux cellules de Schwann voisines et ainsi de suite.

Le passage de cellule à cellule pourrait se faire au niveau des noeuds de Ranvier. A ce niveau, le cytoplasme des cellules de Schwann se prolonge en expansions digitiformes. Cette zone de rapprochement entre deux cellules de Schwann pourrait représenter le point de transfert direct des molécules de PrP^{Sc}. La mobilité intercellulaire des protéines à ancre GPI pourrait supporter ce mécanisme (Kooyman *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1996). Ainsi, la PrP^{Sc} passerait directement d'une cellule à une autre par les prolongements digitiformes.

Les processus de myélinisation: une nouvelle fonction pour la PrP^c.

Les cellules de Schwann, originaires de la crête neurale, forment la myéline dans le système nerveux périphérique. Au cours du développement nerveux, les signaux axonaux assurent la survie, la prolifération et la différenciation de ces cellules. *In vivo*, la présence de l'axone est non seulement nécessaire à l'expression des protéines de la myéline (P0, MBP...), mais aussi au maintien du phénotype myélinisant de la cellule de Schwann (Garbay *et al.*, 2000). En effet, ces cellules retournent à un phénotype immature quand les axones, avec lesquels elles sont en contact, sont dégénérés, par exemple lors de la section d'un nerf.

Des souris surexprimant le gène codant pour la PrP de souris ou de hamster (Westaway *et al.*, 1994b) présentent au cours du vieillissement des dégénérescences musculaires et des troubles de la myélinisation de nerfs périphériques. L'étude de souris PrP^{0/0} a mis en évidence une désorganisation de la gaine de myéline (Nishida *et al.*, 1999). Ces souris possèdent moins de

fibres myélinisées de grand diamètre dans les nerfs périphériques et dans la substance blanche de la moelle épinière que des souris sauvages. Elles présentent également au niveau des axones, des vacuoles qui sont entourées par une fine gaine de myéline. Ces données laissent supposer un défaut dans le mécanisme de myélinisation lié à la perte de la PrP^c. Enfin des structures dites "en bulbe d'oignons" ont été décrites. Ces accumulations de couches concentriques fabriquées par les cellules de Schwann sont caractéristiques d'épisodes multiples de démyélinisation remyélinisation. L'ensemble de ces données suggère notamment une relation étroite entre les mécanismes de myélinisation et le niveau d'expression de la PrP^c. Ces résultats sous-entendent que la perte de la PrP^c dans les nerfs périphériques et dans la moelle épinière ferait disparaître, pour les cellules de Schwann, leur capacité à maintenir la gaine de myéline.

Toutefois, les phénotypes observés chez des souris PrP^{0/0} peuvent varier en fonction de la construction employée lors de la délétion (Moore *et al.*, 1999). Cependant, il est à noter que les altérations de myélinisation présentées dans les souris PrP^{0/0} décrites par Sakaguchi *et al.*, (Sakaguchi *et al.*, 1996) sont identiques à celles retrouvées dans les souris PrP^{0/0} fabriquées par Bueler *et al.*, (Bueler *et al.*, 1992). Par conséquent, les phénomènes de démyélinisation ne sont pas liés aux techniques employées pour éliminer l'expression du gène *prnp*. Ces données ont été confirmées par la restauration du phénotype de myélinisation normal des axones après réintroduction du gène *prnp* dans ces souris PrP^{0/0} (Nishida *et al.*, 1999).

Ainsi la perte d'expression ou de fonction de la PrP^c par ces cellules gliales pourrait altérer les processus de myélinisation. La transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc} pourrait être à l'origine de la perte d'activité de la PrP^c. Cette perte de fonction serait ainsi à l'origine des démyélinisations périphériques observées au cours de certaines ESSTs animales (Obermaier *et al.*, 1995) ou humaines (Korczyn, 1991; Liberski *et al.*, 1991; Kitamoto *et al.*, 1993). En effet, certains patients atteints de MCJ et porteurs de la mutation E200K présentent une démyélinisation périphérique similaire à celle décrite pour les souris PrP^{0/0} (Rosenthal *et al.*, 1976; Neufeld *et al.*, 1992; Antoine *et al.*, 1996; Liberski & Gajdusek, 1997).

Trois mécanismes cellulaires pourraient être à l'origine de ces observations.

Premièrement, une augmentation du taux de Calcium dans les cellules de Schwann peut provoquer des dégénérescences vésiculaires de la gaine de myéline (Smith *et al.*, 1985). Or les prions peuvent altérer sur des cellules en culture la réponse de récepteurs calcium-dépendants (Kristensson *et al.*, 1993). Ces données suggèrent ainsi qu'une modification par les prions du métabolisme du Ca²⁺ dans les cellules de Schwann ou les oligodendrocytes serait à la base des

troubles de myélinisation des axones périphériques.

Deuxièmement, certaines maladies humaines ou animales présentant des altérations de la synthèse de la gaine de myéline sont dues à des modifications du métabolisme de cuivre, (Mishima *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1996). Or, la PrP^c est capable de fixer le cuivre au niveau de son domaine N terminal dans la région de ses séquences répétées de 8 acides aminés (Brown *et al.*, 1997a). Enfin, la PrP^c, par son activité super oxyde dismutase pourrait agir en tant qu'antioxydant (Brown *et al.*, 1997a; Wong *et al.*, 2000). Les altérations dans les processus de myélinisation seraient alors la conséquence d'une modification de réponse de ces cellules à un stress oxydant (Brown *et al.*, 1997b; Milhavet *et al.*, 2000).

Troisièmement, la démyélinisation observée pourrait être due à une perte d'interaction entre la cellule de Schwann et l'axone. En effet, les études réalisées à la suite de sections de nerfs ont mis en évidence les nombreuses interrelations qui existent entre les cellules de Schwann myélinisantes et les axones. L'analyse de souris déficientes pour la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) (Carenini *et al.*, 1997) ou pour Fyn (proposée comme une molécule de signalisation en aval de MAG (Umemori *et al.*, 1999)) a montré que ces deux molécules étaient fortement impliquées dans l'initiation de la myéline (Biffiger *et al.*, 2000). La PrP^c se fixe à des protéines de signalisation intracellulaires tel que la tyrosine kinase Fyn (Mouillet-Richard *et al.*, 2000), la synapsine I, ou Grb2 (Spielhaupter & Schatzl, 2001). Ainsi, l'interrelation entre Fyn et PrP pourrait jouer un rôle au cours des premières étapes de myélinisation dans le SNP. La PrP^c interviendrait dans les voies de communications existant entre les axones et les cellules de Schwann ou du moins dans la réception de signaux extracellulaires contrôlant la synthèse de la gaine de myéline.

La fonction de la PrP^c dans les processus de myélinisation reste à caractériser. Dans le cadre de notre travail, nous n'avons pas identifié de molécules PrP dans la gaine de myéline. Cependant, la structure compactée de la myéline peut réduire la sensibilité des techniques de détections employées (Schaeren-Wiemers & Gerfin-Moser, 1993). Toutefois, il ne semble pas que la PrP^c soit une protéine structurale de la myéline. En effet, lors de la section d'un nerf, les cellules de Schwann myélinisantes inhibent la synthèse des protéines structurales de la myéline. Or, dans le même temps, le gène *prp* est activé (Araki *et al.*, 2001). Cette observation irait donc à l'encontre d'une fonction structurale de la PrP^c dans la gaine de myéline.

La localisation de la PrP dans les domaines moléculaires des noeuds de Ranvier ou dans la gaine de myéline permettrait d'aborder le rôle de la PrP^c dans les cellules de Schwann et les

mécanismes de myélinisation. Les fibres myélinisées sont organisées en domaines distincts: les régions nodales, paranodales et juxtaparanodales. L'organisation de ces domaines est critique pour l'efficacité de conduction de l'influx nerveux *via* une conduction saltatoire et est le résultat d'interactions encore mal connues et complexes entre l'axone et les cellules gliales myélinisantes. De récentes études ont éclairé la composition moléculaire unique de ces domaines (Peles & Salzer, 2000). Des canaux sodiques, l'ankyrine G et des molécules d'adhérence (CAMs) ont été caractérisés au niveau de la région nodale, des protéines associées aux contactines (Caspr) au niveau des zones paranodales, et des canaux potassiques associés avec des molécules de Caspr2 dans les zones juxtaparanodales. La colocalisation de la PrP^c avec l'un de ces marqueurs positionnerait cette protéine *in vivo* dans les cellules de Schwann.

In vitro, la voie de maturation myélinisante ou non myélinisante empruntée par les cellules de Schwann dépend de voies de signalisation et des voies trophiques entre l'axone et la cellule de Schwann. La coculture de neurones et de cellules de Schwann (MSC-80) avant infestation permettrait d'orienter la différenciation des cellules de Schwann et d'étudier leur capacité à répliquer l'agent infectieux.

In vivo, l'influence de la myélinisation des nerfs périphériques sur leur capacité à propager l'agent infectieux pourrait se faire par l'inoculation de lignées de souris présentant des altérations du métabolisme de synthèse de la gaine de myéline. Par exemple, les souris dépourvues de l'enzyme UDP-Galactose-céramide galactosyltransférase (CGT^{-/-}) sont incapables de synthétiser les deux galactolipides et galactocérobrosides majeurs de la myéline (Dupree *et al.*, 1999). Chez ces souris, la myéline compacte peut-être synthétisée mais les régions nodales et paranodales sont sérieusement perturbées dans le système nerveux central. Dans le système nerveux périphérique, l'anatomie des paranodes est pratiquement normale (Popko, 2000). L'étude des différences de temps d'incubation de la maladie chez ces souris inoculées par voie périphérique permettrait d'aborder le rôle de la structure des régions paranodales dans la propagation des prions.

Nouvel outil pour la mise au point de traitements thérapeutiques.

Actuellement, il n'existe pas de moyens curatifs pour soigner les patients atteints d'ESSTs. Dans ces maladies, les patients présentant des signes cliniques montrent de sévères dommages au niveau du cerveau avec d'importantes pertes neuronales, et une astrocytose. A ce stade, un traitement curatif est difficilement envisageable, par contre, une voie de traitement

prophylactique pourrait avoir pour objectif de ralentir les étapes de progression de la maladie dans le SNC. Cette procédure constituerait une méthode palliative visant à prolonger la durée et la qualité de vie des patients. Si l'on considère la conversion et l'accumulation de la PrP^{Sc} comme l'événement pathogénique crucial des ESSTs, tous les traitements inhibant cette accumulation pourraient être à la base d'une voie thérapeutique.

Actuellement, quatre approches ont été envisagées pour inhiber la néosynthèse de PrP^{Sc}.

La première a consisté à déstabiliser les microdomaines membranaires résistants aux détergents autrement appelés radeaux (RAFT). Ces régions de la membrane cellulaire sont supposées correspondre aux lieux où s'effectue la transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc}. Dans cette voie, de récents travaux ont montré que la Chlorpromazine et la Quinacrine peuvent "nettoyer" des cellules N2a chroniquement infectées (Korth *et al.*, 2001). Ces molécules inhibent la synthèse de cholestérol et la formation des microdomaines riches en cholestérol. Ces molécules ont été utilisées comme anti-paludéens. Elles sont par conséquent bien caractérisées chez l'homme, et ont rapidement fait l'objet d'essais cliniques en Grande Bretagne et aux USA. Dans le même groupe stratégique, on peut considérer l'Amphotéricine B (Adjou *et al.*, 1999; Beringue *et al.*, 1999; Beringue *et al.*, 2000; Mange *et al.*, 2000).

La deuxième stratégie étudiée a visé l'inhibition de l'interrelation entre la PrP^c et la PrP^{Sc}. Dans ce sens, les dérivés de la Porphyrine et de la Phtalocyanine (Priola *et al.*, 2000) ou la synthèses d'anticorps dirigés contre la PrP^c se sont révélés prometteurs. Ainsi, l'emploi d'anticorps monoclonaux dirigés contre la première hélice de la PrP^c permet de bloquer la réplication de l'agent infectieux dans des cultures de neurones infectés (Peretz *et al.*, 2001). De même, une série de peptides synthétiques qui couvrent la région centrale de la protéine (résidus: 106-141) peut inhiber complètement la formation de la PrP^{Sc} dans un modèle de réplication acellulaire (Chabry *et al.*, 1998).

La troisième voie thérapeutique a eu pour objectif d'agir directement contre la PrP^{Sc}. Ainsi, des molécules comme l'Anthracycline inhibant les formations amyloïdogéniques, ou le rouge Congo (Demaimay *et al.*, 1998; Beringue *et al.*, 2000; Rudyk *et al.*, 2000) ont été analysées. Leur capacité à "nettoyer" des cultures de neurones chroniquement infestés en ont fait de bons partenaires *in vitro*, mais demeurent pour le moment de modestes agents thérapeutiques *in vivo* (Ingrosso *et al.*, 1995).

Enfin, la dernière méthode analysée visant à l'élaboration d'un traitement anti-prion s'est orientée sur une amélioration de la purge cellulaire de la PrP^{Sc}. Ainsi, l'action des polyamines ramifiées (Supattapone *et al.*, 1999) a permis d'éliminer rapidement la PrP^{Sc} dans des cellules

N2a chroniquement infectées. Ce composé agirait en stimulant les mécanismes cellulaires de destruction de la PrP^{Sc}.

Il faut toutefois remarquer que l'effet de ces différents traitements, visant à bloquer la synthèse de la PrP^{Sc} par les neurones, n'est souvent étudié que peu de temps après l'inoculation de l'agent infectieux aux cellules ou à l'animal. Notre travail réalisé sur la régulation du gène *prp* bovin permettrait d'envisager une cinquième stratégie prophylactique visant non plus les mécanismes de transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc} mais directement la synthèse de la PrP^c. Par exemple, les sites de fixation pour les facteurs Egr1 ou Egr2 pouvaient être réprimés par la protéine NAB1 (Russo *et al.*, 1995). La caractérisation d'une implication de l'un de ces deux facteurs dans la régulation du gène *prp* laisserait supposer que NAB1 peut inhiber l'expression de la PrP dans les cellules de Schwann et donc leur sensibilité à l'infestation. Cette approche requiert toutefois une meilleure connaissance des mécanismes régulateurs contrôlant l'expression du gène *prp*.

L'élaboration de traitements doit prendre en compte les divergences qui peuvent exister entre les données obtenues *in vitro* et les mécanismes présents *in vivo*. Par exemple, les stratégies thérapeutiques ou prophylactiques doivent intégrer le moment d'intervention du traitement. En effet, l'agent infectieux cause au niveau du SNC une neurodégénérescence irréversible. Une voie de traitement prophylactique serait d'agir pendant la phase d'incubation de la maladie en bloquant des étapes de réplication ou de propagation. Les tests effectués chez la souris ont montré que l'injection, de récepteurs solubles de la Lymphotoxine β avant inoculation de l'agent infectieux, empêche la réplication des prions dans la rate et retarde la neuroinvasion (Montrasio *et al.*, 2000). Cette stratégie nécessite une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires régissant les premières étapes de la propagation des prions. Les travaux entrepris dans ce sens font apparaître le SLR et le SNP comme les deux acteurs principaux dans ces phénomènes. Nos travaux suggèrent un rôle important des cellules de Schwann dans les processus de neuroinvasion des prions *via* les fibres nerveuses du SNP. Ainsi, les cellules MSC^{Ch} fournissent un nouveau modèle d'étude *in vitro* pour la recherche de traitements. En effet, jusqu'à présent les traitements inhibant la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} n'ont pu être testés que sur des lignées de cellules neuronales chroniquement infectées. Par conséquent, il serait intéressant de tester à nouveau les techniques déjà validées pour curer les neurones chroniquement infectés, sur les cellules de Schwann. En effet, lors de la néosynthèse de la PrP^{Sc} la machinerie employée pourrait être différente entre les neurones et les cellules de

Schwann. En conséquence, les traitements fonctionnant sur des neurones pourraient s'avérer moins efficaces voire inopérants sur les cellules de Schwann. A l'inverse, l'action de certaines molécules sur les MSC^{Ch} pourrait suggérer une nouvelle voie d'action sur les premières étapes de la maladie. L'identification des cellules de Schwann comme un élément critique de la propagation de l'agent infectieux suggère que ces cellules pourraient devenir des cibles potentielles de traitement thérapeutique.

Les MSC-80 infectées: un nouveau modèle d'étude de la PrP^{Sc}

Les cellules actuellement disponibles pour l'étude des propriétés biochimiques des prions sont rares. Toutefois, les modèles neuronaux N2a et PC12 ont apporté de nombreux renseignements sur la synthèse et le trafic intracellulaire de la PrP^{Sc} (Caughey *et al.*, 1989; Caughey & Raymond, 1991; Taraboulos *et al.*, 1992).

La localisation de la PrP^{Sc} dans la cellule est difficile car elle présente une faible immunoréactivité à moins d'être traitée avec des agents dénaturants qui ont alors un effet sur la morphologie de la cellule. Des approches par immunofluorescence sur des cellules N2a infectées suggèrent que des molécules de PrP^{Sc} demeurent intracellulaires et colocalisent avec l'appareil de Golgi dans certains clones cellulaires (Taraboulos *et al.*, 1990b). Les études en microscopie électronique sur les cellules N2a et sur des tissus cérébraux montrent que la PrP^{Sc} colocalise également avec des marqueurs endosomiaux et lysosomiaux (McKinley *et al.*, 1991b; Arnold *et al.*, 1995). La PrP^{Sc} est retrouvée à la surface de la cellule comme le montre le marquage à l'or colloïdal étudié en microscopie électronique et le marquage de cellules intactes avec des marqueurs non perméables à la membrane (Caughey & Raymond, 1991; Jeffrey *et al.*, 1992; Lehmann & Harris, 1996). Le fait que peu de lignées cellulaires soient actuellement capables de répliquer *in vitro* l'agent infectieux est un frein à l'étude de ces processus. Les cellules MSC^{Ch} fourniraient alors un nouveau modèle d'analyse du métabolisme et de la topologie de la PrP^{Sc}. Le trafic cellulaire de la PrP^{Sc} dans ce modèle permettrait d'étudier les mécanismes supportant la réplication de l'agent infectieux.

Enfin, les MSC^{Ch} se présentent comme un nouveau modèle cellulaire pour l'étude de l'attachement membranaire de la PrP^{Sc}. Des analyses chimiques de protéines purifiées montrent que la PrP^{Sc} possède une ancre GPI à son extrémité N-terminale (Stahl *et al.*, 1992), toutefois la PrP^{Sc} n'est pas détachable de membranes cérébrales par un traitement à la PI-PLC (Caughey *et al.*, 1990; Stahl *et al.*, 1990; Safar *et al.*, 1991). Cette particularité n'est pas due à

un maintien de la protéine dans la lumière d'un compartiment cellulaire puisque la PrP^{Sc} accrochée à la membrane est sensible à la biotinylation et à la digestion par des protéases. Après un marquage de surface, la PrP^{Sc} dans les cellules N2a infestées n'est pas non plus sensible à la PI-PLC (Lehmann & Harris, 1996). Toutes ces données tendent à montrer que la PrP^{Sc} n'est pas attachée de la même manière à la membrane que la PrP^c. De nouveaux arguments issus de travaux sur des molécules de PrP mutées devenues insensibles à la PI-PLC suggèrent que leur ancre GPI devient physiquement inaccessible à cette enzyme (Narwa & Harris, 1999). Il a ainsi été proposé que le changement structural qui est à l'origine de la résistance de la PrP^{Sc} à la digestion par la protéinase K pourraient également la rendre inaccessible à la PI-PLC.

Le modèle MSC^{Ch} offre une nouvelle voie d'étude de la notion de souche.

Le taux relatif de PrP^{Sc} di-, mono-, et non glycosylée serait spécifique des souches (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997a). Or la glycosylation de la PrP^{Sc} dépend non seulement de la souche de prion mais aussi de la cellule hôte (Somerville *et al.*, 1997). Ainsi, les chaînes sucrées ajoutées aux molécules de PrP pourraient être différentes entre plusieurs types cellulaires (DeArmond *et al.*, 1997). Or, ces structures glucidiques modifient la conformation et l'interaction de certaines glycoprotéines (O'Connor & Imperiali, 1996). Par conséquent, cette équipe a proposé que les variations dans la glycosylation des molécules de PrP pourraient modifier le niveau de la barrière énergétique qui doit être franchie durant la formation de la PrP^{Sc}. Dans ce cas, les variations régionales des structures sucrées pourraient expliquer les ciblage régionaux observés dans le SNC au cours des ESSTs (Bruce *et al.*, 1989; Hecker *et al.*, 1992). Plus particulièrement, même si la glycosylation n'est pas indispensable au mécanisme de transconformation de la PrP^c en PrP^{Sc} (Taraboulos *et al.*, 1990a) elle pourrait supporter le tropisme cellulaire des souches dans les organes périphériques et par conséquent le ciblage des cellules de Schwann. L'altération des sites de glycosylation de la PrP^c modifierait le tropisme des souches de prions (DeArmond *et al.*, 1998). Toutefois, si l'on considère que les cellules ont leur propre signature sucrée, il reste à établir si plusieurs passage d'une souche dans un type cellulaire donné peut modifier les propriétés de ciblage de cette souche. Pour cela, les MSC^{Ch} fournissent un outil de comparaison avec les données obtenues sur les lignées neuronales. En effet, l'inoculation à des souris, de ces deux modèles cellulaires chroniquement infectés par la même souche (Chandler), permettrait d'appréhender les variations de tropisme des souches occasionnées au cours des passages cellulaires

successifs.

Les cellules N2a et GT1-trk sont uniquement sensibles à la souche RML (Bosque & Prusiner, 2000; Nishida *et al.*, 2000). Infecter les MSC-80 avec d'autres souches de prions murins permettrait d'évaluer l'aptitude de ces cellules à répliquer certaines souches. Cette propriété pourrait supporter l'orientation nerveuse ou lymphoïde des souches au cours de leur neuroinvasion.

Dans le cadre de ce travail, la technique de Western Blot employée pour analyser la présence de la PrP^c et de la PrP^{Sc} n'est pas assez précise pour différencier les faibles variations qui pourraient exister entre les différents glycoformes. Une analyse plus fine de ces structures serait ainsi requise pour approfondir cette hypothèse.

En conclusion, l'étude des composés sucrés de la PrP dérivée des cellules de Schwann pourrait apporter de nouvelles informations sur le tropisme cellulaire des souches de prions. Selon cette hypothèse, l'altération de la machinerie glucidique, par modification des sites de glycosylation pourrait aussi ouvrir la voie à une plus grande sensibilité du modèle MSC-80 *in vitro* pour différentes souches de prions.

Les MSC-80: modèle d'étude de la régulation du gène *prp* bovin.

Le modèle Schwannien d'analyse de l'expression du gène *prp* pourrait également être un nouveau moyen d'étude de l'influence de molécules telles que les hormones dans les ESSTs. Les données épidémiologiques dérivées des cas nvMCJ suggèrent une susceptibilité accrue des personnes jeunes (moins de 15 ans) à la contamination (Valleron *et al.*, 2001). L'hypothèse émise par Valleron *et al.*, propose que la puberté est un facteur déterminant dans la diminution de la sensibilité des personnes à l'infestation. Les variations hormonales intervenant durant cette période pourraient supporter les modifications de susceptibilités précédemment décrites. Les cellules de Schwann possèdent des récepteurs pour l'oestradiol et la progestérone qui sont impliqués dans l'augmentation de l'expression des protéines de la myéline (Jung-Testas *et al.*, 1994). La progestérone et la dexaméthasone activent les promoteurs de la protéine de la myéline périphérique 22 et la protéine 0 dans la cellule de Schwann (Desarnaud *et al.*, 1998; Melcangi *et al.*, 1999).

L'analyse par "Differential display" des ARNm issus de culture de cellules de Schwann prémyélinisantes ou myélinisantes avec ou sans ajout de progestérone dans le milieu de culture a mis en évidence que la progestérone pouvait être synthétisée par ces cellules. Ces résultats ont également suggéré que cette hormone est une molécule de signalisation

essentielle dans la régulation de la synthèse de la myéline (Liang & Pardee, 1992).

In vitro, la coculture de cellules de Schwann avec des neurones a mis en évidence que la progestérone synthétisée par les cellules de Schwann lors de la formation de la myéline régule également l'expression de gène neuronaux (Chan *et al.*, 2000).

Le gène codant pour le facteur de transcription à doigt de Zinc Egr-2 est exprimé par les cellules de Schwann. L'analyse par RT PCR semi-quantitative de l'ARNm de ce facteur dans des cocultures de cellules de Schwann et de neurones cultivés avec ou sans progestérone a montré que cette hormone stimulait la synthèse de ce facteur de transcription (Guennoun *et al.*, 2001). L'identification des mécanismes régulant l'expression du gène *prp* bovin ou humain dans les cellules de Schwann permettrait d'identifier la composante hormonale qui pourrait exister lors du développement des ESSTs. La surexpression de facteurs de transcription induirait peut être une surexpression du gène *prp* rendant les sujet plus sensibles à la contamination.

Liste des publications

Liste des publications

Lemaire-Vieille, C., T. Schulze, V. Podevin-Dimster, J. Follet, Y. Bailly, F. Blanquet-Grossard, J. P. Decavel, E. Heinen, and J. Y. Cesbron.

Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5422-7. 2000

Jérôme Follet, Catherine Lemaire-Vieille, Françoise Blanquet-Grossard, Valérie Podevin-Dimster, Sylvain Lehmann, Jean-Paul Chauvin, Jean-Pierre Decavel, Ruth Varea, Jacques Grassi, Michel Fontès, and Jean-Yves Cesbron.

PrP expression and replication by Schwann cell: implication in prion spreading. *Journal of Virology* sous presse.

J. Follet, F. Blanquet-Grossard, J. Gagnon, J. Y. Cesbron, C. Lemaire-Vieille.

Localization of an activator domain in the bovin *prp* gene first intron. En cours de préparation.

Catherine Lemaire-Vieille, Françoise Blanquet-Grossard, Ludovic Huot, Stefan Roels, Jérôme Follet, Emmanuel Vanopdenbosch and Jean-Yves Cesbron.

PrP 5' splice variants and doppel mRNA expression in various tissues of BSE cows. *Soumis à publication*

Communication orale

Jérôme Follet, Catherine Lemaire-Vieille, Françoise Blanquet-Grossard, Valérie Podevin-Dimster, Sylvain Lehmann, Jean-Paul Chauvin, Jean-Pierre Decavel, Ruth Varea, Jacques Grassi, Michel Fontès, and Jean-Yves Cesbron

Schwann cell: a key cell in prion diseases. *Réunion CE*, 23 Septembre 2000 Orly

Posters

Jérôme Follet, Catherine Lemaire-Vieille, Françoise Blanquet-Grossard, Valérie Podevin-Dimster, Sylvain Lehmann, Jean-Paul Chauvin, Jean-Pierre Decavel, Ruth Varea, Jacques Grassi, Michel Fontès, and Jean-Yves Cesbron

Les cellules de Schwann une cellule clé dans les maladies à prions (Récompensé par le prix Pasteur). *Journée des jeunes chercheurs*. Novembre 1999.

Jérôme Follet, Catherine Lemaire-Vieille, Françoise Blanquet-Grossard, Valérie Podevin-Dimster, Sylvain Lehmann, Jean-Paul Chauvin, Jean-Pierre Decavel, Ruth Varea, Jacques Grassi, Michel Fontès, and Jean-Yves Cesbron

Prion replication by Schwann cell, *International symposium on Prion diseases and related processes*, 12-15 Novembre 2000.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] **Adjou, K. T., Demaimay R., Deslys J. P., et al.** (1999). MS-8209, a water-soluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrPres accumulation in Syrian hamster scrapie. *J Gen Virol*, **80**, 1079-1085
- [2] **Alper, T., Haig D. A. and Clarke M. C.** (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, **22**, 278-284
- [3] **Alper, T., Cramp W. A., Haig D. A., et al.** (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766
- [4] **Alpers, M. and Gajdusek D. C.** (1965). Changing patterns of kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the Fore people with western civilization. *Am J Trop Med Hyg*, **14**, 852-879
- [5] **Anderson, S. M., Yu G., Giattina M., et al.** (1996). Intercellular transfer of a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein: release and uptake of CD4-GPI from recombinant adeno- associated virus-transduced HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5894-5898.
- [6] **Andrew, S. E., Goldberg Y. P., Kremer B., et al.** (1994). Huntington disease without CAG expansion: phenocopies or errors in assignment? *Am J Hum Genet*, **54**, 852-863
- [7] **Antoine, J. C., Laplanche J. L., Mosnier J. F., et al.** (1996). Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt-Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene [see comments]. *Neurology*, **46**, 1123-1127
- [8] **Araki, T., Nagarajan R. and Milbrandt J.** (2001). Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. Expression profiling and novel gene discovery. *J Biol Chem*, **276**, 34131-34141
- [9] **Arnold, J. E., Tipler C., Laszlo L., et al.** (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome- like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol*, **176**, 403-411
- [10] **Askanas, V., Bilak M., Engel W. K., et al.** (1993). Prion protein is strongly immunolocalized at the postsynaptic domain of human normal neuromuscular junctions. *Neurosci Lett*, **159**, 111-114
- [11] **Aucouturier, P., Geissmann F., Damotte D., et al.** (2001). Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, **108**, 703-708.
- [12] **Bae, H. W., Geiser A. G., Kim D. H., et al.** (1995). Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta type II receptor gene. *J Biol Chem*, **270**, 29460-29468
- [13] **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**, 1187-1197
- [14] **Baron, T., Belli P., Coudert M., et al.** (1995). [Bovine spongiform encephalopathy]. *Pathol Biol (Paris)*, **43**, 73-79
- [15] **Basler, K., Oesch B., Scott M., et al.** (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428
- [16] **Baybutt, H. and Manson J.** (1997). Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene*, **184**, 125-131
- [17] **Beck, E., Daniel P. M., Alpers M., et al.** (1966). Experimental "kuru" in chimpanzees. A pathological report. *Lancet*, **2**, 1056-1059
- [18] **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**, 1925-1934
- [19] **Beekes, M., McBride P. A. and Baldauf E.** (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, **79**, 601-607
- [20] **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**, 181-184
- [21] **Bencsik, A., Lezmi S. and Baron T.** (2001). Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: A possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie. *J Neurovirol*, **7**, 447-453.
- [22] **Bendheim, P. E., Barry R. A., DeArmond S. J., et al.** (1984). Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature*, **310**, 418-421
- [23] **Bendheim, P. E., Brown H. R., Rudelli R. D., et al.** (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, **42**, 149-156
- [24] **Beringue, V., Lasmezas C. I., Adjou K. T., et al.** (1999). Inhibiting scrapie neuroinvasion by polyene antibiotic treatment of SCID mice. *J Gen Virol*, **80**, 1873-1877
- [25] **Beringue, V., Adjou K. T., Lamoury F., et al.** (2000). Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS- 8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol*, **74**, 5432-5440
- [26] **Berryman, M. A. and Rodewald R. D.** (1990). An enhanced method for post-embedding immunocytochemical staining which preserves cell membranes. *J Histochem Cytochem*, **38**, 159-170
- [27] **Bessen, R. A. and Marsh R. F.** (1992a). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, **66**, 2096-2101
- [28] **Bessen, R. A. and Marsh R. F.** (1992b). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol*, **73**, 329-334
- [29] **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**, 7859-7868
- [30] **Biffiger, K., Bartsch S., Montag D., et al.** (2000). Severe hypomyelination of the murine CNS in the absence of myelin-associated glycoprotein and fyn tyrosine kinase. *J Neurosci*, **20**, 7430-7437
- [31] **Billeter, M., Riek R., Wider G., et al.** (1997). Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7281-7285
- [32] **Blattler, T., Brandner S., Raeber A. J., et al.** (1997). PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature*, **389**, 69-73
- [33] **Bockman, J. M. and Kingsbury D. T.** (1988). Immunological analysis of host and agent effects on Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *J Virol*, **62**, 3120-3127
- [34] **Bolton, D. C., McKinley M. P. and Prusiner S. B.** (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311
- [35] **Bons, N., Mestre-Frances N., Belli P., et al.** (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4046-4051
- [36] **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**, 16188-16199

- [37] Borchelt, D. R., Rogers M., Stahl N., *et al.* (1993). Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology*, **3**, 319-329
- [38] Borchelt, D. R., Koliatsos V. E., Guarnieri M., *et al.* (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J Biol Chem*, **269**, 14711-14714
- [39] Bosque, P. J. and Prusiner S. B. (2000). Cultured cell sublimes highly susceptible to prion infection. *J Virol*, **74**, 4377-4386
- [40] Boutry, J. M., Hauw J. J., Gansmuller A., *et al.* (1992). Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin in vivo. *J Neurosci Res*, **32**, 15-26
- [41] Bradley, R. and Wilesmith J. W. (1993). Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br Med Bull*, **49**, 932-959
- [42] Brandner, S., Isenmann S., Raeber A., *et al.* (1996a). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, **379**, 339-343
- [43] Brandner, S., Raeber A., Sailer A., *et al.* (1996b). Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13148-13151
- [44] Brawerman, G. (1987). Determinants of messenger RNA stability. *Cell*, **48**, 5-6
- [45] 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**, 345-347
- [46] Brown, D. R., Qin K., Herms J. W., *et al.* (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687
- [47] 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**, 961-972
- [48] Brown, D. R., Schulz-Schaeffer W. J., Schmidt B., *et al.* (1997c). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, **146**, 104-112
- [49] 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**, 1686-1693
- [50] Brown, D. R., Iordanova I. K., Wong B. S., *et al.* (2000). Functional and structural differences between the prion protein from two alleles prnp(a) and prnp(b) of mouse. *Eur J Biochem*, **267**, 2452-2459
- [51] Brown, D. R. (2001a). Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci*, **24**, 85-90.
- [52] Brown, H. R., Goller N. L., Rudelli R. D., *et al.* (1990a). The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol (Berl)*, **80**, 1-6
- [53] Brown, K. L., Stewart K., Ritchie D. L., *et al.* (1999). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein- expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, **5**, 1308-1312
- [54] Brown, P., Rohwer R. G. and Gajdusek D. C. (1984). Sodium hydroxide decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease virus [letter]. *N Engl J Med*, **310**, 727
- [55] Brown, P., Rohwer R. G. and Gajdusek D. C. (1986). Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J Infect Dis*, **153**, 1145-1148
- [56] Brown, P., Liberski P. P., Wolff A., *et al.* (1990b). Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical

- implications. *J Infect Dis*, **161**, 467-472
- [57] **Brown, P. and Gajdusek D. C.** (1991). The human spongiform encephalopathies: kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and the Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol*, **172**, 1-20
- [58] **Brown, P.** (2001b). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Bmj*, **322**, 841-844.
- [59] **Bruce, M., Chree A., McConnell I., et al.** (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **343**, 405-411
- [60] **Bruce, M. E., McBride P. A. and Farquhar C. F.** (1989). Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett*, **102**, 1-6
- [61] **Bruce, M. E.** (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, **49**, 822-838
- [62] **Bruce, M. E., Will R. G., Ironside J. W., et al.** (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments]. *Nature*, **389**, 498-501
- [63] **Bruce, M. E.** (2000). 'New variant' Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy [news]. *Nat Med*, **6**, 258-259
- [64] **Bueler, H., Fischer M., Lang Y., et al.** (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein [see comments]. *Nature*, **356**, 577-582
- [65] **Bueler, H., Aguzzi A., Sailer A., et al.** (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347
- [66] **Bueler, H., Raeber A., Sailer A., et al.** (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
- [67] **Butler, D. A., Scott M. R., Bockman J. M., et al.** (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol*, **62**, 1558-1564
- [68] **Cabral, A. L., Lee K. L. and Martins V. R.** (in press). Regulation of PrPc gene expression depends on chromatin conformation. *J Biol Chem*
- [69] **Carenini, S., Montag D., Cremer H., et al.** (1997). Absence of the myelin-associated glycoprotein (MAG) and the neural cell adhesion molecule (N-CAM) interferes with the maintenance, but not with the formation of peripheral myelin. *Cell Tissue Res*, **287**, 3-9.
- [70] **Carlson, G. A., Kingsbury D. T., Goodman P. A., et al.** (1986). Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, **46**, 503-511
- [71] **Cashman, N. R., Loertscher R., Nalbantoglu J., et al.** (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, **61**, 185-192
- [72] **Caughey, B., Race R. E. and Chesebro B.** (1988). Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *J Gen Virol*, **69**, 711-716
- [73] **Caughey, B., Race R. E., Ernst D., et al.** (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, **63**, 175-181
- [74] **Caughey, B., Neary K., Buller R., et al.** (1990). Normal and scrapie-associated forms of prion protein differ in their sensitivities to phospholipase and proteases in intact neuroblastoma cells. *J Virol*, **64**, 1093-1101
- [75] **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**, 18217-18223
- [76] **Caughey, B., Raymond G. J., Kocisko D. A., et al.** (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J Virol*, **71**, 4107-4110
- [77] **Caughey, B. W., Dong A., Bhat K. S., et al.** (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy [published erratum appears in *Biochemistry* 1991 Oct 29;30(43):10600]. *Biochemistry*, **30**, 7672-7680
- [78] **Cervenakova, L., Goldfarb L. G., Garruto R., et al.** (1998). Phenotype-genotype studies in kuru: implications for new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13239-13241
- [79] **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**, 13203-13207
- [80] **Chan, J. R., Phillips L. J., 2nd and Glaser M.** (1998). Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10459-10464
- [81] **Chan, J. R., Rodriguez-Waitkus P. M., Ng B. K., et al.** (2000). Progesterone synthesized by Schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression. *Mol Biol Cell*, **11**, 2283-2295
- [82] **Chandler, R. L.** (1965). An experimental mixed infection of mice with scrapie and an oncogenic virus. *J Comp Pathol*, **75**, 323-326
- [83] **Chesebro, B., Race R., Wehrly K., et al.** (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333
- [84] **Chishti, M. A., Strome R., Carlson G. A., et al.** (1997). Syrian hamster prion protein (PrP(C)) is expressed in photoreceptor cells of the adult retina. *Neurosci Lett*, **234**, 11-14
- [85] **Collinge, J., Whittington M. A., Sidle K. C., et al.** (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297
- [86] **Collinge, J., Sidle K. C., Meads J., et al.** (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]. *Nature*, **383**, 685-690
- [87] **Collinge, J.** (1999). Variant creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **354**, 317-323
- [88] **Come, J. H., Fraser P. E. and Lansbury P. T., Jr.** (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5959-5963
- [89] **DeArmond, S. J., McKinley M. P., Barry R. A., et al.** (1985). Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell*, **41**, 221-235
- [90] **DeArmond, S. J., Mobley W. C., DeMott D. L., et al.** (1987). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection [published erratum appears in *Neurology* 1987 Nov;37(11):1770]. *Neurology*, **37**, 1271-1280
- [91] **DeArmond, S. J., Sanchez H., Yehiely F., et al.** (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron*, **19**, 1337-1348
- [92] **DeArmond, S. J., Mobley W. C., DeMott D. L., et al.** (1998). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection [classical article]. *Neurology*, **50**, 1271-1280; discussion 1272
- [93] **Delasnerie-Laupretre, N. and Alperovitch A.** (1995). [Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease]. *Pathol Biol (Paris)*, **43**, 22-24
- [94] **Demaimay, R., Harper J., Gordon H., et al.** (1998). Structural aspects of Congo red as an inhibitor of

- protease-resistant prion protein formation. *J Neurochem*, **71**, 2534-2541
- [95] Demart, S., Fournier J. G., Creminon C., *et al.* (1999). New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 652-657
- [96] Desarnaud, F., Do Thi A. N., Brown A. M., *et al.* (1998). Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J Neurochem*, **71**, 1765-1768
- [97] Dickinson, A. G., Meikle V. M. and Fraser H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol*, **78**, 293-299
- [98] Dickinson, A. G. and Taylor D. M. (1978). Resistance of scrapie agent to decontamination [letter]. *N Engl J Med*, **299**, 1413-1414
- [99] Diedrich, J. F., Bendheim P. E., Kim Y. S., *et al.* (1991). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 375-379
- [100] Diringer, H., Hilmert H., Simon D., *et al.* (1983). Towards purification of the scrapie agent. *Eur J Biochem*, **134**, 555-560
- [101] Dodelet, V. C. and Cashman N. R. (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood*, **91**, 1556-1561
- [102] Doetzlhofer, A., Rotheneder H., Lagger G., *et al.* (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol*, **19**, 5504-5511
- [103] Dupree, J. L., Girault J. A. and Popko B. (1999). Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins. *J Cell Biol*, **147**, 1145-1152
- [104] Eklund, C. M., Kennedy R. C. and Hadlow W. J. (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis*, **117**, 15-22
- [105] Fischer, M., Rulicke T., Raeber A., *et al.* (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J*, **15**, 1255-1264
- [106] Fisher, E., Telling G. and Collinge J. (1998). Prions and the prion disorders. *Mamm Genome*, **9**, 497-502
- [107] Follet, J., Lemaire-Vieille C., Blanquet-Grossard F., *et al.* (in press). PrP expression and replication by Schwann cell: implication in prion spreading. *J Virol*
- [108] Foster, J. D., McKelvey W. A., Mylne M. J., *et al.* (1992). Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet Rec*, **130**, 341-343
- [109] Foster, J. D., Parnham D. W., Hunter N., *et al.* (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, **82**, 2319-2326.
- [110] Fournier, J., Escaig-Haye F., Billette de Villemeur T., *et al.* (1998). Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res*, **292**, 77-84
- [111] Fraser, H. and Dickinson A. G. (1967). Distribution of experimentally induced scrapie lesions in the brain. *Nature*, **216**, 1310-1311
- [112] Fraser, H. and Dickinson A. G. (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*, **226**, 462-463
- [113] 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**, 563-573

- [114] **Fraser, H. and Farquhar C. F.** (1987). Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol*, **13**, 211-223
- [115] **Fraser, J. R.** (1996). Infectivity in extraneural tissues following intraocular scrapie infection. *J Gen Virol*, **77**, 2663-2668
- [116] **Frigg, R., Klein M. A., Hegyi I., et al.** (1999). Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. *J Virol*, **73**, 9584-9588
- [117] **Funke-Kaiser, H., Theis S., Behrouzi T., et al.** (2001). Functional characterization of the human prion protein promoter in neuronal and endothelial cells. *J Mol Med*, **79**, 529-535.
- [118] **Gabizon, R., McKinley M. P., Groth D. F., et al.** (1988). Properties of scrapie prion protein liposomes. *J Biol Chem*, **263**, 4950-4955
- [119] **Gabriel, J. M., Oesch B., Kretschmar H., et al.** (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9097-9101
- [120] **Gajdusek, C.** (1967). Discussion on kuru, scrapie and the experimental kuru-like syndrome in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol*, **40**, 59-63
- [121] **Gajdusek, D. C., Gibbs C. J. and Alpers M.** (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**, 794-796
- [122] **Gajdusek, D. C.** (1972). Spongiform virus encephalopathies. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, **6**, 78-83
- [123] **Gajdusek, D. C.** (1994). Spontaneous generation of infectious nucleating amyloids in the transmissible and nontransmissible cerebral amyloidoses. *Mol Neurobiol*, **8**, 1-13
- [124] **Gambetti, P.** (1996). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: a tale of two diseases with the same genetic mutation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **207**, 19-25
- [125] **Garbay, B., Heape A. M., Sargueil F., et al.** (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, **61**, 267-304.
- [126] **Gasset, M., Baldwin M. A., Lloyd D. H., et al.** (1992). Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10940-10944
- [127] **Gauczynski, S., Peyrin J. M., Haik S., et al.** (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J*, **20**, 5863-5875.
- [128] **Ghani, A. C., Ferguson N. M., Donnelly C. A., et al.** (2000). Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature*, **406**, 583-584
- [129] **Glatzel, M. and Aguzzi A.** (2000a). PrPC expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion invasion. *J Gen Virol*, **81**, 2813-2821
- [130] **Glatzel, M. and Aguzzi A.** (2000b). PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol*, **81 Pt 11**, 2813-2821.
- [131] **Glatzel, M., Heppner F. L., Albers K. M., et al.** (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron*, **31**, 25-34.
- [132] **Goldfarb, L. G., Petersen R. B., Tabaton M., et al.** (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, **258**, 806-808

- [133] **Goldmann, W., O'Neill G., Cheung F., et al.** (1999). PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J Gen Virol*, **80**, 2275-2283
- [134] **Griffith, J. S.** (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044
- [135] **Groschup, M. H., Weiland F., Straub O. C., et al.** (1996). Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis*, **3**, 191-195
- [136] **Groschup, M. H., Beekes M., McBride P. A., et al.** (1999). Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol (Berl)*, **98**, 453-457
- [137] **Gruss, P. and Khoury G.** (1980). Rescue of a splicing defective mutant by insertion of an heterologous intron. *Nature*, **286**, 634-637
- [138] **Guennoun, R., Benmessahel Y., Delespierre B., et al.** (2001). Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells. *Brain Res Mol Brain Res*, **90**, 75-82
- [139] **Hadlow, W. J., Kennedy R. C. and Race R. E.** (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis*, **146**, 657-664
- [140] **Hainfellner, J. A. and Budka H.** (1999). Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol (Berl)*, **98**, 458-460
- [141] **Harper, J. D. and Lansbury P. T., Jr.** (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem*, **66**, 385-407
- [142] **Harris, D. A., Huber M. T., van Dijken P., et al.** (1993a). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C- terminal cleavage sites. *Biochemistry*, **32**, 1009-1016
- [143] **Harris, D. A., Lele P. and Snider W. D.** (1993b). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4309-4313
- [144] **Hauw, J. J., Naccache P. Y., Seilhean D., et al.** (1995). [Neuropathology of non conventional infectious agents or prions]. *Pathol Biol (Paris)*, **43**, 43-52
- [145] **Hecker, R., Taraboulos A., Scott M., et al.** (1992). Replication of distinct scrapie prion isolates is region specific in brains of transgenic mice and hamsters. *Genes Dev*, **6**, 1213-1228
- [146] **Heggebo, R., Press C. M., Gunnes G., et al.** (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol*, **81**, 2327-2337
- [147] **Hepner, F. L., Christ A. D., Klein M. A., et al.** (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med*, **7**, 976-977.
- [148] **Herms, J., Tings T., Gall S., et al.** (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci*, **19**, 8866-8875
- [149] **Herrmann, L. M., Davis W. C., Knowles D. P., et al.** (2001). Cellular prion protein is expressed on peripheral blood mononuclear cells but not platelets of normal and scrapie-infected sheep. *Haematologica*, **86**, 146-153.
- [150] **Hill, A. F., Desbruslais M., Joiner S., et al.** (1997a). The same prion strain causes vCJD and BSE [letter] [see comments]. *Nature*, **389**, 448-450, 526
- [151] **Hill, A. F., Zeidler M., Ironside J., et al.** (1997b). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by

- tonsil biopsy [see comments]. *Lancet*, **349**, 99-100
- [152] **Hill, A. F., Butterworth R. J., Joiner S., et al.** (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples [In Process Citation]. *Lancet*, **353**, 183-189
- [153] **Hilton, D. A., Fathers E., Edwards P., et al.** (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease [letter]. *Lancet*, **352**, 703-704
- [154] **Hogan, B., Costantini F. and Lacy E.** (1986). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*
- [155] **Hope, J. and Manson J.** (1991). The scrapie fibril protein and its cellular isoform. *Curr Top Microbiol Immunol*, **172**, 57-74
- [156] **Horiuchi, M., Yamazaki N., Ikeda T., et al.** (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol*, **76**, 2583-2587
- [157] **Horiuchi, M., Ishiguro N., Nagasawa H., et al.** (1997). Alternative usage of exon 1 of bovine PrP mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 650-654
- [158] **Horiuchi, M., Ishiguro N., Nagasawa H., et al.** (1998). Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Anim Genet*, **29**, 37-40
- [159] **Horiuchi, M. and Caughey B.** (1999). Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure Fold Des*, **7**, R231-240
- [160] **Hornshaw, M. P., McDermott J. R., Candy J. M., et al.** (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, **214**, 993-999
- [161] **Hotchin, J., Sikora E. and Baker F.** (1983). Disappearance of scrapie virus from tissues of the mouse. *Intervirology*, **19**, 205-212
- [162] **Hsiao, K., Baker H. F., Crow T. J., et al.** (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, **338**, 342-345
- [163] **Hsiao, K. and Prusiner S. B.** (1990). Inherited human prion diseases. *Neurology*, **40**, 1820-1827
- [164] **Hsu, H. Y., Nicholson A. C. and Hajjar D. P.** (1994). Basic fibroblast growth factor-induced low density lipoprotein receptor transcription and surface expression. Signal transduction pathways mediated by the bFGF receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **269**, 9213-9220
- [165] **Huang, Z., Gabriel J. M., Baldwin M. A., et al.** (1994). Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7139-7143
- [166] **Huang, Z., Prusiner S. B. and Cohen F. E.** (1996). Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*, **207**, 49-67
- [167] **Hundt, C., Peyrin J. M., Haik S., et al.** (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J*, **20**, 5876-5886.
- [168] **Hunter, G. D. and Millson G. C.** (1967). Attempts to release the scrapie agent from tissue debris. *J Comp Pathol*, **77**, 301-307
- [169] **Hunter, G. D., Gibbons R. A., Kimberlin R. H., et al.** (1969). Further studies of the infectivity and stability of extracts and homogenates derived from scrapie affected mouse brains. *J Comp Pathol*, **79**, 101-108
- [170] **Hunter, N.** (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, **5**,

331-334

- [171] **Ingrasso, L., Ladogana A. and Pocchiari M.** (1995). Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J Virol*, **69**, 506-508
- [172] **Inoue, S., Tanaka M., Horiuchi M., et al.** (1997). Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J Vet Med Sci*, **59**, 175-183
- [173] **Jeffrey, M., Goodsir C. M., Bruce M. E., et al.** (1992). Infection specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie infected mice. *Neurosci Lett*, **147**, 106-109
- [174] **Jung-Testas, I., Schumacher M., Robel P., et al.** (1994). Actions of steroid hormones- and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **48**, 145-154
- [175] **Kadoya, H., Ikeda K., Nakatani K., et al.** (2001). Cellular prion protein expression in non-ciliated epithelial cells (Clara cells) of proliferating bronchioles during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamster. *Osaka City Med J*, **47**, 23-32.
- [176] **Kaltschmidt, B., Uherek M., Volk B., et al.** (1997). Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2642-2647
- [177] **Kapasi, Z. F., Burton G. F., Shultz L. D., et al.** (1993). Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol*, **150**, 2648-2658
- [178] **Kellings, K., Meyer N., Miranda C., et al.** (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J Gen Virol*, **73**, 1025-1029
- [179] **Kimberlin, R. H. and Walker C. A.** (1979). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol*, **89**, 551-562
- [180] **Kimberlin, R. H. and Walker C. A.** (1980). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol*, **51**, 183-187
- [181] **Kimberlin, R. H.** (1982). Scrapie agent: prions or virinos? [news]. *Nature*, **297**, 107-108
- [182] **Kimberlin, R. H. and Walker C. A.** (1982). Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection. *J R Soc Med*, **75**, 618-624
- [183] **Kimberlin, R. H., Hall S. M. and Walker C. A.** (1983a). Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *J Neurol Sci*, **61**, 315-325
- [184] **Kimberlin, R. H., Walker C. A., Millson G. C., et al.** (1983b). Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci*, **59**, 355-369
- [185] **Kimberlin, R. H. and Walker C. A.** (1986). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol*, **67**, 255-263
- [186] **Kimberlin, R. H. and Walker C. A.** (1989a). Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res*, **12**, 213-220
- [187] **Kimberlin, R. H. and Walker C. A.** (1989b). The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res*, **12**, 201-211
- [188] **Kimberlin, R. H.** (1990). Transmissible encephalopathies in animals. *Can J Vet Res*, **54**, 30-37

- [189] Kimberlin, R. H. and Wilesmith J. W. (1994). Bovine spongiform encephalopathy. Epidemiology, low dose exposure and risks. *Ann N Y Acad Sci*, **724**, 210-220
- [190] Kingsbury, D. T., Kasper K. C., Stites D. P., *et al.* (1983). Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Immunol*, **131**, 491-496
- [191] Kitamoto, T., Muramoto T., Mohri S., *et al.* (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, **65**, 6292-6295
- [192] Kitamoto, T., Amano N., Terao Y., *et al.* (1993). A new inherited prion disease (PrP-P105L mutation) showing spastic paraparesis. *Ann Neurol*, **34**, 808-813
- [193] Kitamura, Y., Shimohama S., Ota T., *et al.* (1997). Alteration of transcription factors NF-kappaB and STAT1 in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett*, **237**, 17-20
- [194] Klein, M. A., Frigg R., Flechsig E., *et al.* (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie [see comments]. *Nature*, **390**, 687-690
- [195] Koenig, H. L., Schumacher M., Ferzaz B., *et al.* (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, **268**, 1500-1503
- [196] Kooyman, D. L., Byrne G. W., McClellan S., *et al.* (1995). In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science*, **269**, 89-92.
- [197] Kopf, M., Herren S., Wiles M. V., *et al.* (1998). Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med*, **188**, 1895-1906
- [198] Korczyn, A. D. (1991). Creutzfeldt-Jakob disease among Libyan Jews. *Eur J Epidemiol*, **7**, 490-493
- [199] Korth, C., May B. C., Cohen F. E., *et al.* (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9836-9841.
- [200] Krasemann, S., Groschup M., Hunsmann G., *et al.* (1996a). Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP0/0 mice. *J Immunol Methods*, **199**, 109-118
- [201] Krasemann, S., Groschup M. H., Harmeyer S., *et al.* (1996b). Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice. *Mol Med*, **2**, 725-734
- [202] Kremer, B., Goldberg P., Andrew S. E., *et al.* (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med*, **330**, 1401-1406
- [203] Kretzschmar, H. A., Prusiner S. B., Stowring L. E., *et al.* (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*, **122**, 1-5
- [204] Kretzschmar, H. A., Tings T., Madlung A., *et al.* (2000). Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl*, **37**, 239-249.
- [205] Kristensson, K., Feuerstein B., Taraboulos A., *et al.* (1993). Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology*, **43**, 2335-2341
- [206] Kuwahara, C., Takeuchi A. M., Nishimura T., *et al.* (1999). Prions prevent neuronal cell-line death [letter]. *Nature*, **400**, 225-226
- [207] Lasmezas, C., Deslys J. P. and Dormont D. (1993). Recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I induce PrP gene expression in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 1163-1169
- [208] Lasmezas, C. I., Cesbron J. Y., Deslys J. P., *et al.* (1996a). Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol*, **70**, 1292-1295

- [209] Lasmezas, C. I., Deslys J. P., Demalmay R., *et al.* (1996b). BSE transmission to macaques [letter]. *Nature*, **381**, 743-744
- [210] Lasmezas, C. I., Deslys J. P., Robain O., *et al.* (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, **275**, 402-405
- [211] Latarjet, R., Muel B., Haig D. A., *et al.* (1970). Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature*, **227**, 1341-1343
- [212] Lazarini, F., Castelnau P., Chermann J. F., *et al.* (1994). Modulation of prion protein gene expression by growth factors in cultured mouse astrocytes and PC-12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*, **22**, 268-274
- [213] LeBlanc, A. C. and Poduslo J. F. (1990). Regulation of apolipoprotein E gene expression after injury of the rat sciatic nerve. *J Neurosci Res*, **25**, 162-171.
- [214] Lee, I. Y., Westaway D., Smit A. F., *et al.* (1998). Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res*, **8**, 1022-1037
- [215] Lehmann, S. and Harris D. A. (1996). Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J Biol Chem*, **271**, 1633-1637
- [216] Lehmann, S. and Harris D. A. (1997). Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells [published erratum appears in J Biol Chem 1998 Mar 6;273(10):5988]. *J Biol Chem*, **272**, 21479-21487
- [217] Lemaire-Vieille, C., Schulze T., Podevin-Dimster V., *et al.* (2000). Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5422-5427
- [218] Li, G. and Bolton D. C. (1997). A novel hamster prion protein mRNA contains an extra exon: increased expression in scrapie. *Brain Res*, **751**, 265-274
- [219] Liang, P. and Pardee A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971
- [220] Liberski, P. P., Yanagihara R., Gibbs C. J., Jr., *et al.* (1991). Mechanism of the damage to myelinated axons in experimental Creutzfeldt- Jakob disease in mice: an ultrastructural study. *Eur J Epidemiol*, **7**, 545-550
- [221] Liberski, P. P. and Gajdusek D. C. (1997). Myelinated axon undergoes complete demyelination in the panencephalopathic--but it is merely subjected to the Wallerian degeneration in the polyoencephalopathic type of transmissible spongiform encephalopathies. *Pol J Pathol*, **48**, 163-171
- [222] Mabbott, N. A., Brown K. L., Manson J., *et al.* (1997). T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology*, **92**, 161-165
- [223] Mabbott, N. A., Williams A., Farquhar C. F., *et al.* (2000). Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol*, **74**, 3338-3344
- [224] MacGibbon, G. A., Lawlor P. A., Walton M., *et al.* (1997). Expression of Fos, Jun, and Krox family proteins in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, **147**, 316-332
- [225] Mahal, S. P., Asante E. A., Antoniou M., *et al.* (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*, **268**, 105-114.
- [226] Maignien, T., Lasmezas C. I., Beringue V., *et al.* (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*, **80**, 3035-3042

- [227] **Mange, A., Nishida N., Milhavet O., et al.** (2000). Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures [In Process Citation]. *J Virol*, **74**, 3135-3140
- [228] **Manson, J., West J. D., Thomson V., et al.** (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, **115**, 117-122
- [229] **Manson, J. C., Clarke A. R., Hooper M. L., et al.** (1994a). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, **8**, 121-127
- [230] **Manson, J. C., Clarke A. R., McBride P. A., et al.** (1994b). PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration*, **3**, 331-340
- [231] **Manuelidis, L., Murdoch G. and Manuelidis E. E.** (1988). Potential involvement of retroviral elements in human dementias. *Ciba Found Symp*, **135**, 117-134
- [232] **Manuelidis, L., Sklaviadis T., Akowitz A., et al.** (1995). Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5124-5128
- [233] **Manuelidis, L., Zaitsev I., Koni P., et al.** (2000). Follicular dendritic cells and dissemination of creutzfeldt-jakob disease [In Process Citation]. *J Virol*, **74**, 8614-8622
- [234] **Markovits, P., Dormont D., Maunoury R., et al.** (1982). [In vitro modification of the morphology and the growth of cells infected with scrapie (author's trans)]. *C R Seances Acad Sci III*, **294**, 305-312
- [235] **Marsh, R. F. and Kimberlin R. H.** (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis. *J Infect Dis*, **131**, 104-110
- [236] **McBride, P. A., Eikelenboom P., Kraal G., et al.** (1992). PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol*, **168**, 413-418
- [237] **McBride, P. A. and Beekes M.** (1999). Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie [In Process Citation]. *Neurosci Lett*, **265**, 135-138
- [238] **McBride, P. A., Schulz-Schaeffer W. J., Donaldson M., et al.** (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**, 9320-9327
- [239] **McKinley, M. P., Masiarz F. R. and Prusiner S. B.** (1981). Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science*, **214**, 1259-1261
- [240] **McKinley, M. P., Bolton D. C. and Prusiner S. B.** (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, **35**, 57-62
- [241] **McKinley, M. P., Meyer R. K., Kenaga L., et al.** (1991a). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol*, **65**, 1340-1351
- [242] **McKinley, M. P., Taraboulos A., Kenaga L., et al.** (1991b). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest*, **65**, 622-630
- [243] **Medley, G. F.** (2001). EPIDEMIOLOGY: Predicting the Unpredictable. *Science*, **294**, 1663-1664
- [244] **Medori, R., Tritschler H. J., LeBlanc A., et al.** (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene [see comments]. *N Engl J Med*, **326**, 444-449
- [245] **Melcangi, R. C., Magnaghi V., Cavarretta I., et al.** (1999). Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and P0 gene expression: possible mechanisms of action. *J Neurosci Res*, **56**, 349-357

- [246] **Mercier, G., Turque N. and Schumacher M.** (2001). Rapid effects of triiodothyronine on immediately early gene expression in Schwann cells. *Glia*, **35**, 81-89
- [247] **Meyer, R. K., McKinley M. P., Bowman K. A., et al.** (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2310-2314
- [248] **Miele, G., Manson J. and Clinton M.** (2001). A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med*, **7**, 361-364.
- [249] **Milhavel, O., McMahon H. E., Rachidi W., et al.** (2000). Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13937-13942.
- [250] **Mishima, K., Dake Y., Amemiya T., et al.** (1996). Electron microscopic study of optic nerves of macular mice. *Exp Eye Res*, **63**, 85-90.
- [251] **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**, 1187-1189
- [252] **Montrasio, F., Frigg R., Glatzel M., et al.** (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, **288**, 1257-1259
- [253] **Moore, R. C., Lee I. Y., Silverman G. L., 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
- [254] **Moore, R. C., Xiang F., Monaghan J., et al.** (2001). Huntington Disease Phenocopy Is a Familial Prion Disease. *Am J Hum Genet*, **69**, 6
- [255] **Morgan, K. L., Nicholas K., Glover M. J., et al.** (1990). A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain [see comments]. *Vet Rec*, **127**, 373-376
- [256] **Moser, M., Colello R. J., Pott U., et al.** (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, **14**, 509-517
- [257] **Mouillet-Richard, S., Ermonval M., Chebassier C., et al.** (2000). Signal transduction through prion protein. *Science*, **289**, 1925-1928.
- [258] **Muramoto, T., Kitamoto T., Tateishi J., et al.** (1992). The sequential development of abnormal prion protein accumulation in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*, **140**, 1411-1420
- [259] **Muramoto, T., Kitamoto T., Hoque M. Z., et al.** (1993). Species barrier prevents an abnormal isoform of prion protein from accumulating in follicular dendritic cells of mice with Creutzfeldt- Jakob disease. *J Virol*, **67**, 6808-6810
- [260] **Narwa, R. and Harris D. A.** (1999). Prion proteins carrying pathogenic mutations are resistant to phospholipase cleavage of their glycolipid anchors [In Process Citation]. *Biochemistry*, **38**, 8770-8777
- [261] **Nathanson, N., Wilesmith J. and Griot C.** (1997). Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am J Epidemiol*, **145**, 959-969
- [262] **Nehls, M., Pfeifer D., Schorpp M., et al.** (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*, **372**, 103-107
- [263] **Neufeld, M. Y., Josiphov J. and Korczyn A. D.** (1992). Demyelinating peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Muscle Nerve*, **15**, 1234-1239
- [264] **Neutra, M. R., Frey A. and Kraehenbuhl J. P.** (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, **86**, 345-348
- [265] **Nishida, N., Katamine S., Shigematsu K., et al.** (1997). Prion protein is necessary for latent learning and

- long-term memory retention. *Cell Mol Neurobiol*, **17**, 537-545
- [266] Nishida, N., Tremblay P., Sugimoto 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**, 689-697
- [267] Nishida, N., Harris D. A., Vilette D., *et al.* (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
- [268] Obermaier, G., Kretzschmar H. A., Hafner A., *et al.* (1995). Spongiform central nervous system myelinopathy in African dwarf goats. *J Comp Pathol*, **113**, 357-372
- [269] O'Connor, S. E. and Imperiali B. (1996). Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. *Chem Biol*, **3**, 803-812
- [270] Oesch, B., Westaway D., Walchli M., *et al.* (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746
- [271] Owen, F., Poulter M., Collinge J., *et al.* (1990). Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians [letter; comment]. *Am J Hum Genet*, **46**, 1215-1216
- [272] Pammer, J., Weninger W. and Tschachler E. (1998). Human keratinocytes express cellular prion-related protein in vitro and during inflammatory skin diseases. *Am J Pathol*, **153**, 1353-1358
- [273] Pan, K. M., Baldwin M., Nguyen J., *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**, 10962-10966
- [274] Pattison, I. H. and Jones K. M. (1968a). Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res Vet Sci*, **9**, 408-410
- [275] Pattison, I. H. and Jones K. M. (1968b). Detection of the scrapie agent in tissues of normal mice and in tumours of tumour-bearing but otherwise normal mice. *Nature*, **217**, 102-104
- [276] Pauly, P. C. and Harris D. A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*, **273**, 33107-33110
- [277] Payne, R. J. and Krakauer D. C. (1998). The spatial dynamics of prion disease [In Process Citation]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **265**, 2341-2346
- [278] Peles, E. and Salzer J. L. (2000). Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 558-565
- [279] Peretz, D., Williamson R. A., Kaneko K., *et al.* (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, **412**, 739-743.
- [280] Pergami, P., Jaffe H. and Safar J. (1996). Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal Biochem*, **236**, 63-73
- [281] Popko, B. (2000). Myelin galactolipids: mediators of axon-glia interactions? *Glia*, **29**, 149-153
- [282] Priola, S. A., Raines A. and Caughey W. S. (2000). Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, **287**, 1503-1506
- [283] Prusiner, S. B., Groth D. F., Bildstein C., *et al.* (1980a). Electrophoretic properties of the scrapie agent in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2984-2988
- [284] Prusiner, S. B., Groth D. F., Cochran S. P., *et al.* (1980b). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*, **19**, 4883-4891

- [285] **Prusiner, S. B., Groth D. F., Cochran S. P., et al.** (1980c). Gel electrophoresis and glass permeation chromatography of the hamster scrapie agent after enzymatic digestion and detergent extraction. *Biochemistry*, **19**, 4892-4898
- [286] **Prusiner, S. B., Groth D. F., McKinley M. P., et al.** (1981a). Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 4606-4610
- [287] **Prusiner, S. B., McKinley M. P., Groth D. F., et al.** (1981b). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6675-6679
- [288] **Prusiner, S. B.** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144
- [289] **Prusiner, S. B., Bolton D. C., Groth D. F., et al.** (1982a). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, **21**, 6942-6950
- [290] **Prusiner, S. B., Cochran S. P., Groth D. F., et al.** (1982b). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol*, **11**, 353-358
- [291] **Prusiner, S. B., Groth D. F., Bolton D. C., et al.** (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*, **38**, 127-134
- [292] **Prusiner, S. B., Scott M., Foster D., et al.** (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, **63**, 673-686
- [293] **Prusiner, S. B.** (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, **252**, 1515-1522
- [294] **Prusiner, S. B., Groth D., Serban A., et al.** (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**, 10608-10612
- [295] **Prusiner, S. B.** (1996). Molecular biology and genetics of prion diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **61**, 473-493
- [296] **Prusiner, S. B.** (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13363-13383
- [297] **Puckett, C., Concannon P., Casey C., et al.** (1991). Genomic structure of the human prion protein gene [see comments]. *Am J Hum Genet*, **49**, 320-329
- [298] **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**, 828-833
- [299] **Race, R. E., Fadness L. H. and Chesebro B.** (1987). Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*, **68**, 1391-1399
- [300] **Race, R. E., Caughey B., Graham K., et al.** (1988). Analyses of frequency of infection, specific infectivity, and prion protein biosynthesis in scrapie-infected neuroblastoma cell clones. *J Virol*, **62**, 2845-2849
- [301] **Race, R. E. and Ernst D.** (1992). Detection of proteinase K-resistant prion protein and infectivity in mouse spleen by 2 weeks after scrapie agent inoculation. *J Gen Virol*, **73**, 3319-3323
- [302] **Race, R. E., Priola S. A., Bessen R. A., et al.** (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron*, **15**, 1183-1191
- [303] **Raeber, A. J., Klein M. A., Frigg R., et al.** (1999a). PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *Embo J*, **18**, 2702-2706

- [304] **Raeber, A. J., Sailer A., Hegyi I., et al.** (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**, 3987-3992
- [305] **Rieger, R., Edenhofer F., Lasmezas C. I., et al.** (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells [see comments]. *Nat Med*, **3**, 1383-1388
- [306] **Riek, R., Hornemann S., Wider G., et al.** (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, **382**, 180-182
- [307] **Robakis, N. K., Sawh P. R., Wolfe G. C., et al.** (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**, 6377-6381
- [308] **Rodolfo, K., Hassig R., Moya K. L., et al.** (1999). A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport. *Neuroreport*, **10**, 3639-3644
- [309] **Rogers, M., Taraboulos A., Scott M., et al.** (1990). Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. *Glycobiology*, **1**, 101-109
- [310] **Roikhel, V. M., Fokina G. I., Lisak V. M., et al.** (1987). Persistence of the scrapie agent in glial cells from rat Gasserian ganglion. *Acta Virol*, **31**, 36-42
- [311] **Rosenthal, N. P., Keesey J., Crandall B., et al.** (1976). Familial neurological disease associated with spongiform encephalopathy. *Arch Neurol*, **33**, 252-259
- [312] **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**, 2191-2198
- [313] **Rubenstein, R., Scalici C. L., Papini M. C., et al.** (1990). Further characterization of scrapie replication in PC12 cells. *J Gen Virol*, **71**, 825-831
- [314] **Rudyk, H., Vasiljevic S., Hennion R. M., et al.** (2000). Screening Congo Red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells. *J Gen Virol*, **81**, 1155-1164
- [315] **Russo, M. W., Severson B. R. and Milbrandt J.** (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6873-6877
- [316] **Ryan, A. K. and Rosenfeld M. G.** (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev*, **11**, 1207-1225
- [317] **Saborio, G. P., Permanne B. and Soto C.** (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813.
- [318] **Sachs, A. B.** (1993). Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell*, **74**, 413-421
- [319] **Saeki, K., Matsumoto Y., Hirota Y., et al.** (1996a). Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. *Virus Genes*, **12**, 15-20
- [320] **Saeki, K., Matsumoto Y., Matsumoto Y., et al.** (1996b). Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **219**, 47-52
- [321] **Safar, J., Ceroni M., Gajdusek D. C., et al.** (1991). Differences in the membrane interaction of scrapie amyloid precursor proteins in normal and scrapie- or Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains. *J Infect Dis*, **163**, 488-494
- [322] **Safar, J., Wille H., Itri V., et al.** (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations [see comments]. *Nat Med*, **4**, 1157-1165

- [323] Sakaguchi, S., Katamine S., Shigematsu K., *et al.* (1995). Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol*, **69**, 7586-7592
- [324] Sakaguchi, S., Katamine S., Nishida N., *et al.* (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, **380**, 528-531
- [325] Sales, N., Rodolfo K., Hassig R., *et al.* (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci*, **10**, 2464-2471
- [326] Sarkozi, E., Askanas V. and Engel W. K. (1994). Abnormal accumulation of prion protein mRNA in muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathy [see comments]. *Am J Pathol*, **145**, 1280-1284
- [327] Sato, T., Xiao D. M., Li H., *et al.* (1995). Structure and regulation of the gene encoding the neuron-specific protein kinase C substrate neurogranin (RC3 protein). *J Biol Chem*, **270**, 10314-10322
- [328] Schaeren-Wiemers, N. and Gerfin-Moser A. (1993). A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry*, **100**, 431-440
- [329] Schatzl, H. M., Laszlo L., Holtzman D. M., *et al.* (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol*, **71**, 8821-8831
- [330] Scherer, S. S. (1997). The biology and pathobiology of Schwann cells. *Curr Opin Neurol*, **10**, 386-397
- [331] Scott, J. R. (1993). Scrapie pathogenesis. *Br Med Bull*, **49**, 778-791
- [332] Scott, M., Foster D., Mirenda C., *et al.* (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, **59**, 847-857
- [333] Shaked, G. M., Shaked Y., Kariv-Inbal Z., *et al.* (2001). A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem*, **276**, 31479-31482.
- [334] Shmakov, A. N., McLennan N. F., McBride P., *et al.* (2000). Cellular prion protein is expressed in the human enteric nervous system [letter]. *Nat Med*, **6**, 840-841
- [335] Shmerling, D., Hegyi I., Fischer M., *et al.* (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*, **93**, 203-214
- [336] Smith, K. J., Hall S. M. and Schaaf C. L. (1985). Vesicular demyelination induced by raised intracellular calcium. *J Neurol Sci*, **71**, 19-37.
- [337] Somerville, R. A., Chong A., Mulqueen O. U., *et al.* (1997). Biochemical typing of scrapie strains [letter; comment]. *Nature*, **386**, 564
- [338] Spielhauser, C. and Schatzl H. M. (2001). PrPc directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem*, **24**, 24
- [339] Stahl, N., Borchelt D. R. and Prusiner S. B. (1990). Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry*, **29**, 5405-5412
- [340] Stahl, N., Baldwin M. A., Hecker R., *et al.* (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*, **31**, 5043-5053
- [341] Stahl, N., Baldwin M. A., Teplow D. B., *et al.* (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991-2002

- [342] **Supattapone, S., Nguyen H. O., Cohen F. E., et al.** (1999). Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14529-14534
- [343] **Tanji, K., Saeki K., Matsumoto Y., et al.** (1995). Analysis of PrP^c mRNA by in situ hybridization in brain, placenta, uterus and testis of rats. *Intervirology*, **38**, 309-315
- [344] **Taraboulos, A., Rogers M., Borchelt D. R., et al.** (1990a). Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie- infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8262-8266
- [345] **Taraboulos, A., Serban D. and Prusiner S. B.** (1990b). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol*, **110**, 2117-2132
- [346] **Taraboulos, A., Raeber A. J., Borchelt D. R., et al.** (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell*, **3**, 851-863
- [347] **Taraboulos, A., Scott M., Semenov A., et al.** (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform [published erratum appears in *J Cell Biol* 1995 Jul;130(2):501]. *J Cell Biol*, **129**, 121-132
- [348] **Tateishi, J., Tashima T. and Kitamoto T.** (1988). Inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent [letter]. *Ann Neurol*, **24**, 466
- [349] **Telling, G. C., Scott M., Mastrianni J., et al.** (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, **83**, 79-90
- [350] **Tiffany, H. L., Handen J. S. and Rosenberg H. F.** (1996). Enhanced expression of the eosinophil-derived neurotoxin ribonuclease (RNS2) gene requires interaction between the promoter and intron. *J Biol Chem*, **271**, 12387-12393
- [351] **Tobler, I., Gaus S. E., Deboer T., et al.** (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, **380**, 639-642
- [352] **Tobler, I., Deboer T. and Fischer M.** (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci*, **17**, 1869-1879
- [353] **Umemori, H., Kadowaki Y., Hirosawa K., et al.** (1999). Stimulation of myelin basic protein gene transcription by Fyn tyrosine kinase for myelination. *J Neurosci*, **19**, 1393-1397
- [354] **Valleron, A. J., Boelle P. Y., Will R., et al.** (2001). Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science*, **294**, 1726-1728
- [355] **van Keulen, L. J., Schreuder B. E., Vromans M. E., et al.** (1999a). Scrapie-associated Prion Protein in the Gastro-intestinal Tract of Sheep with Natural Scrapie. *J Comp Pathol*, **121**, 55-63
- [356] **van Keulen, L. J., Schreuder B. E., Vromans M. E., et al.** (1999b). Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol*, **121**, 55-63
- [357] **Vilette, D., Andreoletti O., Archer F., et al.** (2001). Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4055-4059.
- [358] **Wadsworth, J. D., Joiner S., Hill A. F., et al.** (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*, **358**, 171-180.
- [359] **Walmsley, A. R., Zeng F. and Hooper N. M.** (2001). Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *Embo J*, **20**, 703-712.

- [360] **Weissmann, C.** (1991). A 'unified theory' of prion propagation [see comments]. *Nature*, **352**, 679-683
- [361] **Weissmann, C., Bueler H., Sailer A., et al.** (1993). Role of PrP in prion diseases. *Br Med Bull*, **49**, 995-1011
- [362] **Weissmann, C.** (1999). Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies [In Process Citation]. *J Biol Chem*, **274**, 3-6
- [363] **Westaway, D., Goodman P. A., Mirenda C. A., et al.** (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, **51**, 651-662
- [364] **Westaway, D., Mirenda C. A., Foster D., et al.** (1991). Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice. *Neuron*, **7**, 59-68
- [365] **Westaway, D., Cooper C., Turner S., et al.** (1994a). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6418-6422
- [366] **Westaway, D., DeArmond S. J., Cayetano-Canlas J., et al.** (1994b). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*, **76**, 117-129
- [367] **Westaway, D., Zuliani V., Cooper C. M., et al.** (1994c). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev*, **8**, 959-969
- [368] **Wilesmith, J. W.** (1988). Bovine spongiform encephalopathy [letter]. *Vet Rec*, **122**, 614
- [369] **Will, R. G., Ironside J. W., Zeidler M., et al.** (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK [see comments]. *Lancet*, **347**, 921-925
- [370] **Wisniewski, H. M., Lossinsky A. S., Moretz R. C., et al.** (1983). Increased blood-brain barrier permeability in scrapie-infected mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, **42**, 615-626
- [371] **Wong, B. S., Pan T., Liu T., et al.** (2000). Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo [In Process Citation]. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 136-139
- [372] **Wong, K., Qiu Y., Hyun W., et al.** (1996). Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP3 release. *Neurology*, **47**, 741-750
- [373] **Yoshikawa, H., Seo H., Oyamada T., et al.** (1996). Histopathology of enzootic ataxia in Sika deer (*Cervus nippon Temminck*). *J Vet Med Sci*, **58**, 849-854.
- [374] **Yoshimoto, J., Iinuma T., Ishiguro N., et al.** (1992). Comparative sequence analysis and expression of bovine PrP gene in mouse L-929 cells. *Virus Genes*, **6**, 343-356
- [375] **Zigas, V.** (1970). Kuru in New Guinea: discovery and epidemiology. *Am J Trop Med Hyg*, **19**, 130-132

