



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Immunologie et Maladies infectieuses

Présentée et soutenue par Zaira Esperanza ARELLANO ANAYA

Le 21 septembre 2011

Etude de la multiplication des prions en culture cellulaire et analyse des
formes infectieuses de la protéine PrP.

JURY

Dr. Joëlle CHABRY - RAPPORTEUR

Pr. Christophe CULLIN - RAPPORTEUR

Dr. Sophie MOUILLET-RICHARD - EXAMINATEUR

Pr. Christophe PASQUIER - EXAMINATEUR

Dr. Jean-Michel PEYRIN - EXAMINATEUR

Dr. Didier VILETTE - EXAMINATEUR

Ecole doctorale Biologie Santé Biotechnologies

Unité de recherche : UMR 1225 INRA-ENVT Interactions Hôte-Agent pathogène

Directeur de Thèse : Dr. Didier VILETTE

AUTEUR : ARELLANO ANAYA Zaira Esperanza

TITRE: Etude de la multiplication des prions en culture cellulaire et analyse des formes infectieuses de la protéine PrP.

DIRECTEUR DE THESE : Dr. Didier VILETTE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, le 21 septembre 2011.

RESUME

L'agent infectieux et pathogène des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles, ou maladies à prions, est un conformère anormal (riche en feuillets β et agrégé) de la protéine PrP, s'accumulant spécifiquement dans les cellules infectées. Nous avons tout d'abord développé un test cellulaire permettant de quantifier ces agents infectieux sans recourir à l'inoculation d'animaux. A l'aide cet outil, nous montrons que des cellules chroniquement infectées utilisent la machinerie cellulaire pour être constitutivement sécrétés en association à des microvésicules d'origine endosomale (exosomes). L'efficacité avec laquelle les prions sont sécrétés semble varier fortement en fonction de la nature de la souche infectieuse. L'analyse biochimique de la PrP anormale nous a permis d'identifier des formes infectieuses peu agrégées qui pourraient être générées dans le compartiment endosomal.

MOTS-CLES : Prions, PrP^{res}, scrapie cell assay, exosomes, pouvoir infectieux, petits agrégats protéiques.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Spécialité : Immunologie et Maladies infectieuses.

THESE PREPAREE A : UMR 1225 INRA-ENVT Interactions Hôte-Agent Pathogène

23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 03, FRANCE.

REMERCIEMENTS

Au Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología MEXICO CONACyT (Conseil National de Science et Technologie du Mexique), pour la bourse attribuée pour la réalisation de cette formation doctorale.

A l'Ambassade de France au Mexique, permettant la convention CONACyT-Gouvernement Français 2007, pour la sélection, l'aide administrative, le cours de français en supplément nécessaires pour l'obtention définitive de la bourse et le statut de Boursière du Gouvernement Français.

A l'Université de Toulouse Paul Sabatier et l'Ecole Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies, pour l'acceptation dans le programme d'études doctorales.

A l'Institut National de Recherche Agronomique-ENVT, pour mon hébergement et pour les facilités données pendant 4 ans. Je tiens tout d'abord à remercier M. François Schelcher et M. Olivier Andreatti de m'avoir accueilli dans l'unité de recherche et dans le laboratoire d'encéphalopathies spongiformes transmissibles. Je remercie le service administratif pour toutes les démarches faites pendant mon séjour.

A Didier VILETTE, pour l'acceptation dans son projet de recherche et pour l'encadrement de ma thèse. Je tiens à le remercier pour tout le temps, toute la patience et pour toute son aide. Je tiens ici à lui témoigner mon estime et ma reconnaissance.

A l'équipe Prion, je pense également à tout le personnel du laboratoire, les enseignants, les chercheurs, les étudiants, merci.

Aux membres du jury, j'adresse mes chaleureux remerciements, pour avoir accepté de participer à mon jury de soutenance, pour l'intérêt et le temps dédié, et pour leurs remarques constructives sur mes travaux.

A Mes Parents, pour me soutenir et m'encourager dans mes études. Pour m'avoir donné tout ce qu'ils ont pu.

A Ma Famille, je tiens à les remercier pour leurs pensées et leurs paroles. Une pensée pour qui n'est pas plus dans ce phénomène de vie.

A mes amis, je tiens aussi à remercier ceux qui m'ont soutenue durant ces travaux, notamment Edith Rojas Anaya, Luis Guerrero Cabrera, David A. Gómez Jauregui et Hossein Davarzani. A tous mes amis qui font partie de moi pour toujours ; pour me donner du sourire dans les moments difficiles; pour être restés en contact malgré la distance. Vous me manquez.

A Amaury Legrand et sa famille, pour partager avec moi un peu de la France, pour faire partie de ce voyage de la vie. Pour TOUTE l'aide donnée, j'ai beaucoup à te remercier.

A ce moteur-là qui m'encourage, qui m'incite à continuer, à toi invisible, toujours présente, merci.

Je dédie cette thèse à ...

Ma mère :

Pour tout. Je te remercie du fond de mon cœur pour tout ce tu m'as donné. Tes efforts, tes souffrances, la lutte jour à jour pour nous donner le meilleur. Pour tes paroles de soutien toujours réconfortantes.

Mon père :

Pour tout. Pour ton partage, pour tout le temps passé avec moi, les conseils donnés de toute la vie, pour les longs appels téléphoniques.

Mon Frère Victor :

Pour être tout ce que tu es. Pour les bons moments passés.

Ma nièce Dania et mon neveu Saúl :

Pour être mes petits anges. Pour penser à moi encore, même si je vous ai laissé trop petits.

Mes grands parents :

Pour prendre soin de moi.

Ma famille :

Pour avoir toujours une pensée à moi.

A tous ces êtres-là qui sont partis durant mon absence, sans me dire au revoir. Je tiens à vous remercier pour avoir partagé la vie avec moi, vous êtes dans mes pensées pour toujours.

Cada vez que sientas que la tristeza te persigue, déjala entrar a tu vida, que con ella aprenderás a ser fuerte. La esperanza hace que agite el naufrago sus brazos en medio de las aguas, aún cuando no vea tierra por ningún lado.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	13
Préambule	14
1. <u>Les maladies à prions</u>	
1. 1 Historique	15
1. 2 EST animales et humaines	17
1.2.1 Caractéristiques	17
1.2.2 Les EST humaines et leur étiologie	19
1.2.3 La tremblante classique des ovins	23
1.2.4 La tremblante atypique	23
1.2.5 L'encéphalopathie spongiforme bovine	24
1.2.6 L'encéphalopathie spongiforme bovine atypique	24
1.2.7 La maladie du dépérissement chronique des cervidés	25
1. 3 La protéine PrP cellulaire (PrP ^c)	26
1.3.1 Rôle de la PrP ^c dans les EST	26
1.3.2 La protéine PrP ^c	28
1.3.3 La fonction de la PrP ^c	30
1. 4 La protéine PrP anormale (PrP ^{sc})	32
1.4.1 Caractéristiques structurales	32
1.4.2 Caractéristiques biochimiques	33
1.4.3 Formes anormales de PrP ^{sc} sensibles aux protéases	35
1. 5 Conversion de la PrP ^c en PrP ^{sc}	36
1.5.1 Localisation subcellulaire des sites de conversion	36
1.5.2 Etude de la conversion en systèmes acellulaires	37
1.5.3 Génération <i>de novo</i> de prions	38
1. 6 Physiopathologie	39
1.6.1 Dissémination dans l'organisme	39
1.6.2 Nature des types cellulaires impliqués	40
1. 7 Neurodégénérescence	42
1. 8 Les souches de prions	44
1.8.1 Propriétés biologiques	44
1.8.2 Propriétés biochimiques de la PrP anormale	44

1.8.3 La souche et la conformation de la PrP ^{Sc}	46
2. <u>Autres maladies neurodégénératives liées au mauvais repliement des protéines</u>	47
3. <u>Exosomes</u>	
3.1 Caractéristiques	49
3.2 Biogénèse	50
3.3 Fonctions biologiques	51
3.4 Prions et exosomes	52
OBJECTIFS DE LA THESE	54
METHODOLOGIE	55
RESULTATS	59
A) <u>Résultats 1</u> Développement d'une méthode de titration en culture cellulaire pour quantifier des souches de prion ovine, murine et de campagnol	60
Publication 1	62
Obtention des cellules RK13 exprimant la PrP ^C du campagnol (voRK13)	68
Quantification de la souche de prions de campagnol et des souches murines 22L et Fukuoka-1 par titration cellulaire	69
Conclusion	70
B) <u>Résultats 2</u> Etude de l'externalisation des prions dans le milieu extracellulaire	71
Quantification de la sécrétion des prions ovins PG127	73
Détection du pouvoir infectieux et de la PrP ^{res} associés aux exosomes du MC ovRK13/PG127	76
Quantification de la sécrétion des prions murins 22L	78
Détection du pouvoir infectieux et de la PrP ^{res} associés aux exosomes du MC moRK13/22L	79
Quantification de la sécrétion de prions murins Fukuoka-1 et des prions de campagnol	81
L'infection par les prions ne semble pas stimuler la sécrétion des exosomes	83
PrP ^{res} soluble dans la fraction microvésiculaire P100K	86
Conclusion	87
C) <u>Résultats 3</u> Identification de petits agrégats de PrP ^{res} dans les cultures de cellules chroniquement infectées	88
Publication 2	89
Conclusion	97
DISCUSSION	98
BIBLIOGRAPHIE	107

ANNEXE 121
Publication 3 122
Summary 126

ABREVIATIONS

AD	Maladie d'Alzheimer
APP	Protéine précurseur amyloïde
CDI	Conformation-Dependant Immunoassay
CWD	Maladie de dépérissement chronique des cervidés
DNF	Dégénérescences Neurofibrillaires
Dox	Doxycycline
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EST	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
FDC	Cellule Dendritique Folliculaire
FVO	Farines de viande et d'os
GFAP	Protéine gliofibrillaire acide
GPI	glycosilphosphatydil inositol
GSS	Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
GT1	Neurones hypothalamiques immortalisés de souris
IFF	Insomnie Fatale Familiale
ILV	Vésicule intraluminale
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
fMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale
iMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène
sMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
MovS	Cellules Neurogliales immortalisées
Met	Méthionine
MVBs	Corps multivésiculaires
PETblot	Paraffin-Embedded Tissue blot
PK	Protéinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
PRNP	Gène codant la protéine cellulaire PrP ^c
PrP ^c	Protéine prion cellulaire
PrP ^{res}	Protéine prion anormale résistante aux protéases
PrP ^{sc}	Protéine prion anormale
RK13	Cellules de rein de lapin (rabbit kidney cells)
RML	Souche de prion Rocky Mountain Laboratory
ROS	Reactive oxygen species

SAFs	Scrapie Associated Fibrils
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxide dismutase
Val	Valine

TABLEAU DES FIGURES

	Page
Figure N°1. Histopathologie des maladies à prions	19
Figure N°2. Schéma des mutations trouvées dans le gène humain <i>PRNP</i>	20
Figure N°3. La vMCJ est différente de la forme classique de la MCJ	22
Figure N°4. Structure primaire de la protéine cellulaire	28
Figure N°5. Structure tertiaire de la protéine PrP ^c	29
Figure N°6. Modèle de la structure tridimensionnelle de la PrP ^{sc}	32
Figure N°7. Détection biochimique de la PrP ^c et de la PrP ^{sc}	34
Figure N°8. Formation des fibres de PrP ^{sc}	34
Figure N°9. Trafic de la PrP ^c et de la PrP ^{sc}	37
Figure N°10. Neuroinvasion des prions	39
Figure N°11. Représentation schématique de la neuroinvasion dans les ESTs	41
Figure N°12. Profils moléculaires de la PrP ^{res} de différentes souches	45
Figure N°13. Visualisation par microscopie électronique des exosomes	49
Figure N°14. Formation des corps multivésiculaires	50
Fig. N° 15. Expression de la PrP ^c de campagnol dans les cellules ovRK13.	68
Fig. N° 16. Quantification des souches 22L, Fukuoka-1 et de campagnol par test cellulaire.	69
Fig. N° 17. Schéma général de travail	72
Fig. N° 18. Le milieu de culture provenant des cellules ovRK13/PG127 est infectieux.	74
Fig. N° 19. L'agent infectieux PG127 est associé à des microvésicules membranaires.	75
Fig. N° 20. L'agent infectieux PG127 est présent principalement dans les fractions contenant les exosomes.	76
Fig. N° 21. La PrP ^{res} est détectable dans la fraction microvésiculaire infectieuse.	77
Fig. N° 22. La PrP ^{res} est détectable dans les fractions contenant les exosomes infectieux.	77
Fig. N° 23. Le milieu de culture provenant des cellules moRK13/22L est infectieux et l'agent infectieux est associé à la fraction microvésiculaire.	78
Fig. N° 24. L'agent infectieux 22L est présent principalement dans les fractions contenant les exosomes.	79
Fig. N° 25. La PrP ^{res} est détectable dans la fraction microvésiculaire infectieuse.	80
Fig. N° 26. La PrP ^{res} est détectable dans les fractions contenant les exosomes infectieux.	80

Fig. N° 27. La fraction microvésiculaire provenant du milieu de culture de cellules moRK13/Fukuoka-1 et voRK13/campagnol est infectieuse.	81
Fig. N° 28. La Pr ^{Pres} est détectable dans les fractions microvésiculaires infectieuses provenant des cultures moRK13/Fukuoka-1 et voRK13/campagnol.	82
Fig. N°29. Proportion d'agent infectieux libéré dans le milieu de culture.	83
Fig. N° 30. Analyse d'un marqueur exosomal (flotiline-1) dans la fraction microvésiculaire de cultures ovRK13 infectées ou non par la souche PG127.	84
Fig. N° 31. Analyse de 2 marqueurs exosomaux (flotiline-1 et EF1a) dans les fractions microvésiculaires de différentes cultures infectées ou non.	84
Fig. N° 32. Visualisation de la quantité de Pr ^{Pres} contenue dans les cellules des cinq cultures infectées utilisées pour l'obtention des milieux conditionnés.	85
Fig. N° 33. Détection de Pr ^{Pres} dans la fraction soluble du P100K.	86

INTRODUCTION

Préambule

Les prions sont des agents pathogènes de nature protéique responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) ou encore maladies à prions. Ces maladies mortelles, affectant l'homme et l'animal, se caractérisent par une dégénérescence du système nerveux central. L'accumulation d'une protéine anormale dans le cerveau est l'évènement central de ces pathologies.

L'histoire des maladies à prion commence avec la découverte de la tremblante (ou scrapie) chez le mouton et la chèvre en 1730. Par la suite, d'autres maladies ont été décrites comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob et le Kuru chez l'homme et plus récemment, la maladie du dépérissement chronique des cervidés et l'encéphalopathie spongiforme bovine.

Ces maladies sont transmissibles, soit naturellement soit par inoculation expérimentale de matériel infectieux. Les symptômes varient d'une maladie à l'autre, mais les plus fréquentes sont la démence, les myoclonies et l'ataxie. Ces maladies ont des périodes d'incubation très longues (en années ou dizaines d'années chez l'homme) et elles sont invariablement fatales. Dans le cerveau des individus infectés, on observe la formation de vacuoles (donnant un aspect spongieux au tissu), une mort des neurones et une gliose (multiplication des astrocytes et de la microglie). Ces maladies sont liées à l'accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP^c, sous une conformation anormale (ou mal repliée) dénommée PrP^{sc}.

1. Maladies à prions

1. 1 Historique

La tremblante du mouton (scrapie chez les anglo-saxons) a été décrite vers 1730 au Royaume-Uni ; cette maladie neurologique du mouton est caractérisée par un intense prurit. Le caractère transmissible de la tremblante a été démontré en 1936 après inoculation de moutons et de chèvres par deux vétérinaires français, Cuillé et Chelle (65). L'agent infectieux était capable de traverser des filtres de porcelaine et la période d'incubation de la maladie était particulièrement longue. Une confirmation involontaire de son caractère transmissible et de sa résistance aux moyens classiques de décontamination a été apportée à la même période avec un vaccin préparé contre le « loup-ill » à partir de cerveaux formolés d'ovins : ce vaccin a été responsable en Grande-Bretagne d'une épidémie de tremblante qui a atteint près de 1 200 animaux, quatre ans après la vaccination (90).

A cette époque, l'hypothèse virale quant à la nature de l'agent infectieux était évoquée et en 1954 Sigurdsson, un pathologiste islandais, propose de classer l'agent de la tremblante comme un « virus lent » (208), comme l'agent du visna, une autre maladie infectieuse du mouton à période d'incubation très longue. Pendant les années 1950, une nouvelle maladie humaine a été décrite par Gajdusek et Zigas (85, 259). Cette maladie, nommée « kuru », est caractérisée principalement par une ataxie progressive, et était endémique dans la tribu des Fores, en Papouasie Nouvelle Guinée. Quelques années plus tard, le parallèle avec la tremblante fut remarqué par un vétérinaire américain (Hadlow) (95), suggérant que le kuru pourrait être également transmissible.

La transmissibilité au primate (chimpanzé) du kuru et de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), une démence présénile idiopathique a été établie à la fin des années 1960 par Gajdusek and Gibbs (87). Par la suite, la transmission d'une autre maladie humaine, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheiker (GSS) fut montrée au début des années 80 (84). Tous ces travaux sont à l'origine du concept de « démences transmissibles ». La nature de l'agent transmissible impliqué dans ces maladies a été un sujet extrêmement controversé. A la fin des années 60, Tikvah Alper et ses collègues montrent l'extraordinaire résistance de l'agent de la tremblante à l'inactivation par les irradiations ultraviolettes et les irradiations ionisantes, suggérant que l'agent infectieux pourrait ne pas contenir d'acides nucléiques (9).

Ces résultats ont amené Griffith, un mathématicien, à suggérer que l'agent infectieux pourrait être une protéine anormalement repliée, capable d'auto-réplication (93). Cette hypothèse, qui contredisait les dogmes de la génétique et des mécanismes connus de transmission de l'information dans le monde vivant, reçut un accueil très réservé.

C'est à Prusiner que revint le mérite de la découverte, en 1982, d'une protéine spécifique de ces maladies, et baptisée « prion » (acronyme de « proteinaceous infectious particle ») (180). Il s'agit d'une sialoglycoprotéine, résistante aux protéases. Cette protéine est le constituant majeur des fractions infectieuses, elle s'accumule dans les tissus infectés et y forme parfois des dépôts amyloïdes. Cette protéine existe dans l'hôte non infecté mais elle adopte une forme anormale lors de la multiplication des prions. Les formes normale (PrP^c) et anormale (PrP^{sc}) ont la même structure primaire mais une conformation spatiale différente. Ce changement de conformation est supposé rendre la protéine PrP infectieuse et neurotoxique.

1.2 EST animales et humaines

1.2.1 Caractéristiques

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles affectent l'homme et de nombreuses espèces animales (Tableau N°1).

Tableau I. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines et animales.

Maladies	Espèces naturellement atteintes	Cause ou facteur de prédisposition
Kuru	Homme	Infection par cannibalisme
Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)	Homme	<ul style="list-style-type: none"> • Iatrogène : infection par hormone de croissance d'origine extractive ; greffe de dure-mère ; transplantation de cornée ; contamination d'électrodes stéréotaxiques. • Sporadique : inconnue • Familiale : susceptibilité héritable par mutation dans le gène de la PrP^c. • Nouveau variant : infection par voie alimentaire par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB).
Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Homme	Susceptibilité héritable par mutation dans le gène de la PrP ^c .
Insomnie fatale familiale (IFF)	Homme	Susceptibilité héritable par mutation dans le gène de la PrP ^c .
Tremblante du mouton (scrapie)	Ovins	Infection chez les individus génétiquement sensibles. Transmission verticale et horizontale.
Encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)	Bovins, ruminants de zoos	Infection par voie alimentaire. Recyclage de l'agent de l'ESB dans la fabrication des farines alimentaires.
Encéphalopathie spongiforme du vison	Vison	Infection par voie alimentaire par une souche d'agent inconnue.
Encéphalopathie spongiforme féline	Chats et félidés de zoos	Infection par voie alimentaire par l'agent de l'ESB.
Syndrome du dépérissement chronique des ruminants sauvages (<i>chronic wasting disease, CWD</i>)	Cervidés sauvages et en captivité	Transmission horizontale.

Chez l'homme on distingue la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le Kuru, le syndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnie familiale fatale (IFF) et la forme variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ).

Chez l'animal, les principales maladies sont la tremblante des ovins, maladie répartie sur l'ensemble du globe, la maladie du dépérissement chronique (Chronic Wasting Disease) des cervidés en Amérique du Nord, et l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE en anglais, ESB en français) qui a principalement affecté les bovins du Royaume Uni.

Les maladies à prions sont caractérisées par un tableau lésionnel neuropathologique (pour revue (214) (Figure N°1):

- Une spongiose révélant la présence de vacuoles
- Une perte neuronale
- Une gliose
- La présence de plaques amyloïdes dans certains cas.

Aucun syndrome inflammatoire manifeste n'est pas observé au cours des ESTs. La spongiose correspond à la présence de vacuoles dans le neuropile. Cette vacuolisation s'effectue aux dépens des corps cellulaires neuronaux et des prolongements nerveux. La spongiose touche le cortex cérébral (dans toute son épaisseur ou dans les couches profondes), le cortex cérébelleux (couche moléculaire) et les noyaux gris centraux (37). La gliose objectivée par une très forte surexpression de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) (72) concerne les astrocytes et les cellules microgliales. Une réaction microgliale est constatée dans le neuropile, au niveau des zones de vacuolisation et aux abords des plaques amyloïdes (15, 94). La présence de plaques amyloïdes n'est pas systématiquement observée. Elles sont décrites dans le cerveau de patients atteints de certaines formes de MCJ, de GSS et de Kuru et chez les bovins atteints d'ESB. Elles sont exceptionnelles chez les ovins atteints de tremblante et chez les rongeurs. Ces plaques sont majoritairement constituées de dépôts extracellulaires de PrP^{Sc} organisés en fibrilles possédant les caractéristiques des amyloïdes (biréfringence après coloration au rouge congo, aspect fibrillaire en microscopie électronique) (133).

Il y a des plaques de type Kuru (plaques arrondies comportant un cœur dense entouré de fibrilles radiaires), des plaques « multicentriques » caractéristiques du syndrome GSS, comprenant plusieurs foyers denses de dépôts amyloïdes sans fibres radiaires. Les plaques florides, constituées d'une plaque de type Kuru entourée d'une couronne de vacuoles, sont caractéristiques de la nouvelle variante de la MCJ (256).

La perte neuronale est constante dans les EST, mais elle peut être d'intensité très variable en fonction de la région cérébrale examinée. Elle peut être très intense dans certaines régions comme dans les formes cérébelleuses de la MCJ avec atrophie de la couche des grains. De plus, les neurones survivants peuvent présenter une perte importante des varicosités dendritiques.

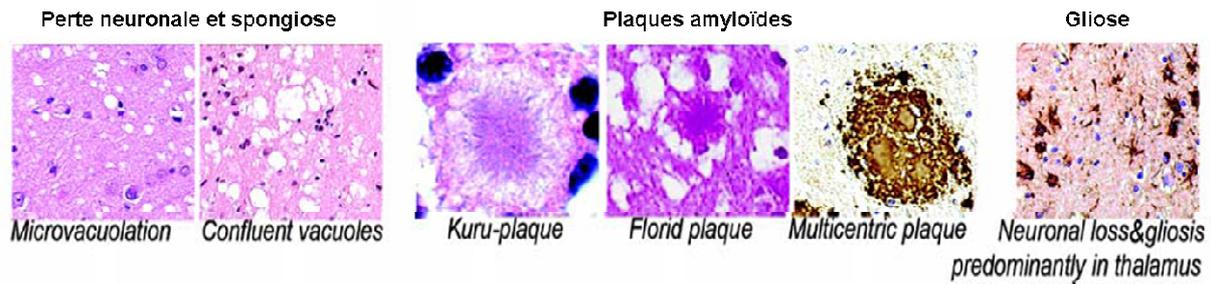


Fig. N°1. Histopathologie des maladies à prions. Dans un cerveau infecté on y détecte de la mort neuronale associée à l'aspect « spongieux » du cerveau. L'accumulation du prion peut être visualisée, dans certains cas, sous la forme de plaques amyloïdes et on détecte de la gliose (D'après (120)).

Typiquement, les EST ont des périodes d'incubation longues allant de quelques mois (chez la souris) à des années (chez les bovins, les moutons, les cervidés), voire des dizaines d'années chez l'homme (pour revue (163)). Durant cette période d'incubation cliniquement silencieuse, les prions colonisent généralement le système lymphoréticulaire.

1.2.2 Les EST humaines et leur étiologie

Les maladies à prions sont très particulières car elles peuvent avoir une origine infectieuse, familiale (héréditaire) ou sporadique (pour revues (99, 249)). Cette triple origine est bien documentée chez l'homme. Des polymorphismes, des insertions, délétions et mutations sur le gène humain *PRNP* liés à ces désordres sont indiqués dans la figure N° 2.

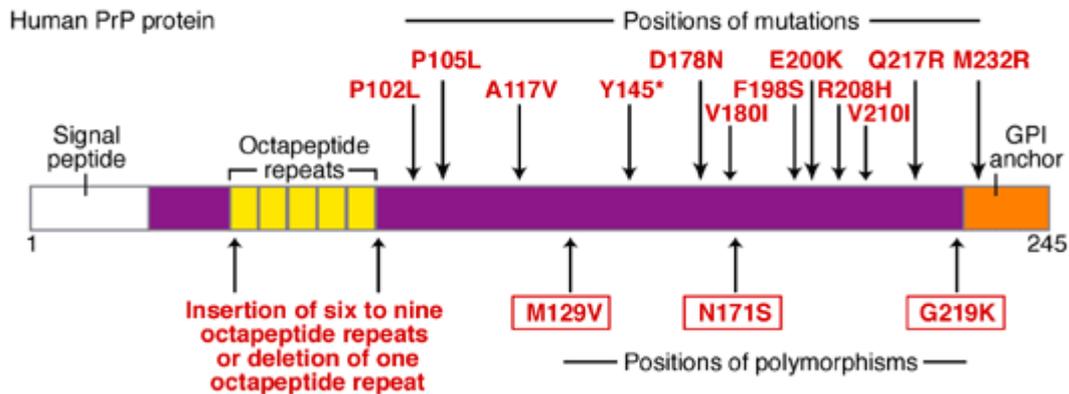


Fig. N°2. Schéma des mutations trouvées dans le gène humain *PRNP* (D'après (147)).

Sporadiques :

- Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (sMCJ)

La plupart de cas de MCJ (80-85%) sont qualifiés de sporadiques, sans cause génétique ou exposition infectieuse identifiée. C'est une maladie rare, qui affecte environ 1 individu par million et par an (pour revue (60)). L'origine de cette maladie n'est pas connue et pourrait être due à une mutation somatique dans le gène *PRNP* ou à une altération structurale de la protéine PrP^c. Les sMCJ se caractérisent par une démence qui évolue rapidement et par des désordres neurologiques incluant l'ataxie et les myoclonies. La durée moyenne de la phase clinique de la maladie est de 4 à 6 mois. L'homozygotie Met/Met au codon 129 est un facteur de risque pour le sMCJ, les hétérozygotes MV présentant une protection partielle (118).

Familiales :

Dix à 20% des MCJ ont une origine génétique. Ces formes sont associées à des mutations du gène *PRNP* (Figure N°2) et leur pénétrance est proche de 100%. Les formes héréditaires sont la maladie de MCJ familiale (fMCJ), la maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF) (pour revue (44)).

- Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (fMCJ)

Les altérations génétiques sont des mutations ponctuelles entre la seconde et troisième hélice alpha et des insertions. Ces insertions ont pour conséquence une augmentation du nombre de répétitions des octapeptides. La maladie fMCJ est caractérisée par une démence progressive et rapide.

- Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

Décrite par la première fois par J. Gerstmann, E. Sträussler et I. Scheinker en 1936, cette maladie présente une ataxie progressive suivie par une phase de démence et par la présence de plaques amyloïdes multacentriques. La mutation ponctuelle du gène *PRNP* la plus couramment observée est P102L.

- Insomnie Fatale Familiale (IFF)

Cette maladie est caractérisée par des insomnies et des hallucinations. Elle est liée à une mutation D178N du gène *PRNP*, mutation associée à une méthionine (Met) au codon 129. Les lésions sont essentiellement observées dans le thalamus et le bulbe. La spongiose est absente ou très modérée.

Acquises :

- Kuru

Cette maladie a été décrite dans la tribu Fore de Nouvelle Guinée (par revue (251)). Elle était due à des pratiques de cannibalisme, au cours desquelles la famille consommait certains tissus (dont le cerveau) des proches décédés. Les symptômes étaient l'ataxie et l'amaigrissement, avec une démence tardive. A l'histochimie, le cervelet était touché, et des dépôts appelés plaques de Kuru étaient observés.

- Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène (iMCJ)

Cette maladie a pour origine une infection par des traitements médicaux. Il s'agit principalement d'infections dues à des injections d'hormone de croissance isolée à partir d'hypophyse de personnes décédées. Cette pratique a principalement concerné la France où une centaine d'enfants est décédée (sur plus de 2000 enfants traités dans les années 80). Des cas de iMCJ ont aussi été observés suite à des greffes de cornée et à l'utilisation d'électrodes neurochirurgicales. Le polymorphisme au codon 129 du gène *PRNP* influence la susceptibilité à la maladie iMCJ. Dans les cas d'infection centrale (greffe de dure-mère), l'homozygotie Met/Met est un facteur de risque. Dans le cas d'infection périphérique (traitement par l'hormone pituitaire), les homozygotes Met /Met et Val/Val sont préférentiellement atteints.

- Nouveau variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ)

En 1996 au Royaume Uni, dix cas de MCJ ont été identifiés présentant des caractéristiques pathologiques et cliniques tout à fait particulières (Figure N° 3), et les données épidémiologiques ont suggéré que cette forme variante avait pour origine une infection humaine par l'agent de l'ESB (pour revue (213)). Depuis, les données expérimentales sont en faveur de l'infection de ces individus par l'agent bovin. A ce jour, environ 200 personnes sont décédées, essentiellement au Royaume Uni. Alors qu'environ 40% de la population est homozygote Met/Met, la totalité des cas cliniques de vMCJ sont Met/Met au codon 129 (96). Le nouveau variant affecte des individus jeunes (moyenne d'âge de 29 ans contre 65 ans pour la sMCJ). Le cours clinique est marqué par des symptômes psychiatriques, incluant la dépression et l'anxiété. L'ataxie se développe plus tardivement. La mort survient entre 14 mois et 3 ans après l'apparition des premiers signes cliniques. La présence de plaques florides dans le cerveau est une atteinte neuropathologique spécifique au vMCJ.

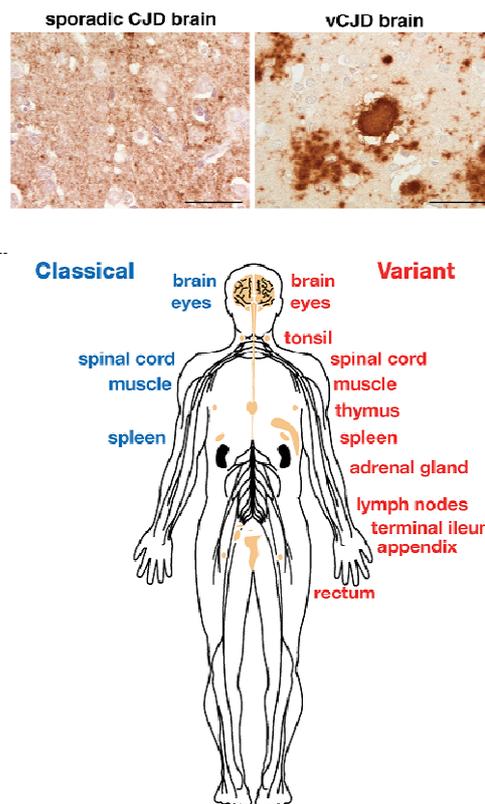


Fig. N°3. La vMCJ est différente de la forme classique de la MCJ. Les dépôts de PrP^{sc} sont diffus dans le cas de la sMCJ, par contre il y a la formation de plaques floridées dans la vMCJ. La distribution de la PrP^{sc} dans les tissus est différente aussi ; dans le cas de vMCJ, le prion a été localisé dans les organes périphériques notamment dans les tissus lymphoréticulaires (D'après (248)).

1.2.3 La tremblante classique des ovins

La tremblante (ou scrapie en anglais) est l'EST la plus anciennement décrite (pour revue (69)). Le terme de « scrapie » fait référence au prurit et au grattage intense qui peut aboutir à la perte de la toison laineuse. Si l'origine de cette maladie est clairement infectieuse, elle présente néanmoins une forte composante génétique car le polymorphisme du gène qui code pour la PrP^c conditionne fortement la susceptibilité individuelle à la maladie (voir 1.3.1). La période d'incubation est longue (de 3 à 5 ans) et la durée de la phase clinique est de l'ordre de quelques mois. Les signes cliniques sont variables en fonction de la race des ovins et de la souche infectieuse. Ils incluent généralement la perte de l'instinct grégaire, le prurit, l'hyperexcitabilité et l'ataxie.

Cette maladie est endémique dans toutes les régions du monde, à l'exception, peut-être, de l'Australie et la Nouvelle Zélande. Cette maladie présente un fort potentiel de transmission horizontale. La salive, les matières fécales (224), l'urine (202) ou des tissus infectés comme le placenta (10) (234) ou les carcasses peuvent contaminer l'environnement qui reste ensuite infectieux pendant des années (201).

1.2.4 La tremblante atypique

Le programme européen de surveillance des ruminants initié à la fin des années 90s a conduit à la détection de cas de tremblante dits « atypiques » (pour revues (17) (22)). Ils ont été diagnostiqués pour la première fois en Norvège en 1998 (isolat Nor98), mais il s'avère maintenant que cette souche infectieuse est très largement répandue au sein des cheptels européens. La protéine PrP^{sc} associée à ces cas atypiques/Nor98 présente un profil électrophorétique très différent de ceux associés aux souches de tremblante classique, en particulier la présence d'une bande d'environ 11-12 kDa. Cette souche cible principalement le cervelet et, au contraire des souches classique, n'est que peu détectable dans l'obex. Contrairement aux souches classiques qui colonisent les organes lymphoïdes, cette souche atypique est peu ou pas détectable en périphérie (11). Enfin, le nombre d'animaux atteints par cette souche est toujours très faible (un ou deux par troupeau), ce qui suggère que cette souche n'est pas contagieuse, à la différence des souches classiques.

1.2.5 L'encéphalopathie spongiforme bovine

L'ESB a été diagnostiquée pour la 1^{ère} fois en 1987 au Royaume Uni. Cette épizootie a atteint massivement le cheptel anglais (pour revue (98)). En effet, près de 300 000 bovins ont été diagnostiqués et on estime qu'environ 1 million d'animaux ont été infectés. Le pic s'est situé en 1992 (avec 35 000 cas recensés) et le nombre de cas est depuis lors en constante régression (163) (une dizaine de cas en 2010). Si cette maladie a essentiellement concerné le Royaume Uni, les cheptels bovins européens (et en particulier français) ont aussi été touchés. L'âge moyen d'apparition des signes cliniques est de 42 mois avec un période d'incubation de 2 à 8 ans. Les symptômes incluent des problèmes locomoteurs, une hypersensibilité aux stimuli, et un comportement agressif. Les données épidémiologiques ont rapidement identifié l'utilisation des farines de viande et d'os (FVO) en temps que compléments alimentaires comme étant à l'origine de cette épizootie. L'hypothèse est que des ruminants infectés (bovins et/ou ovins) auraient été incorporés dans les carcasses utilisées pour l'élaboration des FVO. Depuis l'interdiction des FVO dans l'alimentation bovine, l'ESB est en constante régression. Il est extrêmement probable que la forme variante de MCJ (vMCJ) a pour origine une transmission de l'agent bovin à l'homme (5). Si la preuve expérimentale directe ne peut évidemment être obtenue, toutes les données neuropathologiques, épidémiologiques et biochimiques suggèrent fortement que le vMCJ résulte de la transmission à l'homme de l'agent responsable de l'ESB, probablement via la consommation de produits provenant de bovins infectés.

1.2.6 L'encéphalopathie spongiforme bovine atypique

Le programme de surveillance active des EST chez les ruminants, instauré dans les pays européens depuis le début des années 2000, a permis d'identifier de rares cas présentant des profils de PrP^{res} différents de celui de l'ESB (pour revue (17)). Ont ainsi été définis le type L (Low ou encore BASE) et le type H (High), selon les tailles moléculaires de la forme résistante à la protéinase K (PK) de la protéine PrP^{sc} en Western Blot. Des expériences de transmission à différents types de souris transgéniques ont ensuite montré qu'il s'agit d'entités infectieuses différentes de l'agent de l'ESB classique. Ces cas sont très rares (2 pour 10⁶ bovins de plus de 8 ans) et pourraient correspondre à des cas d'EST sporadique du bovin. Leur potentiel zoonotique n'est pas connu.

1.2.7 La maladie du dépérissement chronique des cervidés (CWD)

Cette maladie (CWD en anglais) est un désordre neurodégénératif fatal qui affecte les ruminants sauvages et en captivité de la famille des cervidés (élan, cerf, etc.). Cette maladie, au départ identifiée dans le Colorado et le Wyoming aux Etats-Unis dans les années 60s, a depuis lors été détectée dans de nombreux autres états et au Canada (pour revue (207)). Les signes cliniques incluent des changements de comportement, une perte progressive de poids et la mort de l'animal. La période d'incubation, déterminée par inoculation expérimentale par la voie intracérébrale est de l'ordre de 2 ans. Comme pour le vMCJ chez l'homme et la tremblante classique des ovins, l'agent infectieux et la PrP anormale sont présents à des niveaux significatifs dans les tissus périphériques (organes lymphoïdes, sang, urine, muscles). Bien que le mode exact de transmission entre les animaux soit inconnu, la transmission horizontale semble particulièrement efficace et elle est probablement liée à la contamination de l'environnement par l'agent infectieux (219) (97). La susceptibilité de l'homme aux agents infectieux responsables du CWD n'est pas connue. Cependant, les données actuelles suggèrent que la barrière d'espèce pourrait être importante. En effet, l'incidence de MCJ n'est pas supérieure chez les chasseurs en contact avec les cervidés (ou en ayant consommé). Par ailleurs, ces agents sont peu ou pas transmissibles à des souris transgéniques surexprimant la PrP^c humaine (119).

1.3 La protéine PrP cellulaire (PrP^c)

1.3.1 Rôle de la PrP^c dans les ESTs

L'utilisation de souris transgéniques invalidées pour la PrP^c ou surexprimant une PrP^c homologue ou hétérologue a grandement contribué à l'étude des maladies à prion (pour revue (245)). Le rôle essentiel de la protéine PrP^c dans la propagation du prion a été démontré en utilisant des souris invalidées pour le gène *Prnp* (*Prnp*^{0/0}). Ces animaux sont résistants à l'infection par les prions (38). Les prions ne s'y propagent plus et la réintroduction du transgène *Prnp* restaure la susceptibilité à l'infection (82). Par la suite, des souris transgéniques surexprimant la PrP^c de souris ont été développées. Ces animaux développent la maladie beaucoup plus rapidement que des souris sauvages. A titre d'exemple, la lignée tg20 surexprimant 6 fois la PrP^c développe la maladie en 60 jours suite à l'inoculation par la souche RML, contre 130 jours pour une souris sauvage (82).

La protéine PrP^c contrôle étroitement la barrière d'espèce dans les maladies à prions (200). La transmission expérimentale des prions à des animaux de la même espèce est très reproductible, en particulier chez la souris ou le hamster : la totalité des animaux développe la maladie et la période d'incubation est très similaire entre les individus. La transmission à une autre espèce est par contre bien moins efficace, illustrant ainsi la difficulté pour des prions d'une espèce donnée à infecter une espèce hétérologue. La dénomination « franchissement de la barrière d'espèce » illustre cette difficulté. Suite à une primotransmission, seule une petite partie des animaux tombera malade (l'incidence est faible) et les périodes d'incubations seront longues et variables. Au cours des transmissions ultérieures dans le nouvel hôte, l'incidence va progressivement augmenter jusqu'à atteindre 100% et les durées d'incubations vont diminuer et se stabiliser. A ce stade, la souche infectieuse est stabilisée à son nouvel hôte. Le processus d'adaptation des prions à un nouvel hôte n'est absolument pas compris.

Dans certains cas, la souche adaptée a conservé sa pathogénicité vis à vis de l'espèce d'origine, dans d'autres cas, non. Par ailleurs, l'importance de la barrière entre 2 espèces peut être très variable en fonction de la souche infectieuse. Par exemple, environ 30% des isolats infectieux ovins ne sont pas transmissibles à la souris sauvage. Dans la plupart des cas, la PrP^c contrôle étroitement la barrière d'espèce: la totalité des isolats ovins sont transmissibles à des souris transgéniques exprimant la PrP^c ovine en lieu et place de la PrP^c endogène de souris (64) (246).

De la même façon, des souris transgéniques exprimant la PrP^c bovine (40), de cervidé (34) ou humaine (248) sont beaucoup plus permissives aux agents infectieux correspondants que des souris sauvages. Ces données indiquent donc que l'homologie entre la PrP anormale infectante et la PrP^c du nouvel hôte est un élément clef dans le processus de multiplication des prions. Il faut cependant noter qu'il existe des exceptions à cette règle. L'agent infectieux humain responsable du vMCJ se transmet beaucoup mieux à des souris sauvages exprimant la PrP^c de souris que les agents humains responsables des MCJ sporadiques ou iatrogènes (36) (104).

Une autre indication de l'importance de la protéine PrP^c dans les maladies à prions concerne les MCJ familiaux observés chez l'homme (voir 1.2.2). Tous ces cas sont associés à une altération génétique du gène codant pour la PrP^c. L'hypothèse souvent évoquée est que la PrP^c mutée pourrait être plus encline à acquérir une conformation infectieuse. Pour tester cette hypothèse, un grand nombre de souris transgéniques exprimant différentes PrP^c mutées ont été générées (248). Globalement, les résultats sont décevants dans la mesure où aucune de ces études n'a permis de démontrer que ces souris développaient une encéphalopathie spongiforme transmissible à une souris sauvage. Plusieurs explications peuvent être invoquées. Les mutations humaines sont en général introduites dans la séquence PrP^c de souris et il n'est pas sûr que les mutations humaines aient les mêmes effets structuraux dans un contexte souris. Par ailleurs, il est aussi possible que la durée de vie d'une souris soit trop courte pour mimer un processus pathologique qui se déroule chez l'homme sur plusieurs dizaines d'années. Cependant, dans un travail récent, le groupe de Susan Linqvist annonce qu'il a créé un modèle murin de l'IFF humaine. En effet, des souris transgéniques surexprimant une version murine mutée D178N développent spontanément une EST ressemblant à l'IFF humaine (dans laquelle notamment la PrP^{res} est peu ou pas détectable) et transmissible (110).

Enfin, les EST présentent une forte composante génétique dans la mesure où le polymorphisme du gène qui code pour la PrP^c peut conditionner fortement la susceptibilité individuelle à la maladie. Cette situation est particulièrement bien documentée chez les ovins et chez l'homme. Chez les ovins, il existe plus d'une vingtaine de variants de la protéine PrP^c, dont la fréquence varie en fonction des races. Un petit nombre de ces variants a une influence déterminante sur la susceptibilité individuelle de l'animal à développer une EST (105) (20). Les codons importants sont situés aux positions 136 (alanine A ou valine V), 154 (arginine R ou histidine H) et 171 (arginine R ou glutamine Q). Les animaux homozygotes A¹³⁶R¹⁵⁴R¹⁷¹ sont extrêmement résistants aux souches de tremblante classique, que ce soit en conditions naturelles ou expérimentales. A l'inverse, les animaux V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹/V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹ sont très sensibles. Les moutons A¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹/A¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹ présentent une sensibilité intermédiaire.

Dans un troupeau infecté, jusqu'à 80% des animaux $V^{136}R^{154}Q^{171}/V^{136}R^{154}Q^{171}$ développeront la maladie alors qu'aucun mouton $A^{136}R^{154}R^{171}/A^{136}R^{154}R^{171}$ ne sera pas touché (78). Cette préférence allélique dépend de la souche infectieuse. Par exemple, la souche atypique Nor98 (voir 1.2.4) infecte les animaux homozygotes $A^{136}R^{154}R^{171}$, mais pas les $V^{136}R^{154}Q^{171}/V^{136}R^{154}Q^{171}$ (21).

Chez l'homme, le polymorphisme au codon 129 (Met ou Val) peut représenter un facteur de risque pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) (257) et sa forme variante (vMCJ). Alors qu'environ 40% de la population normale est homozygote Met/Met, la totalité des patients décédés du vMCJ sont Met/Met au codon 129 ce qui indique que cette homozygotie est un facteur prédisposant à cette maladie (154).

1.3.2 La protéine PrP^c

La protéine cellulaire PrP^c est codée par le gène *PRNP* localisé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme (143), sur le chromosome 2 chez la souris et sur le chromosome 13 chez le mouton. La séquence codante est incluse dans un unique exon. Ce gène code pour une protéine de 256 à 264 acides aminés, selon les espèces, de poids moléculaire compris entre 33 et 38 kDa dont les structures primaires et secondaires sont fortement conservées chez les mammifères (137).

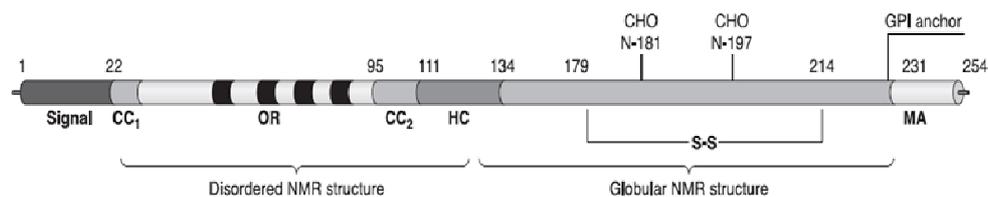


Fig. N°4. Structure primaire de la protéine cellulaire PrP^c. Le peptide signal est localisé dans l'extrémité N-terminale. CC1 et CC2 représentent les clusters positifs, OR la zone de répétitions d'octapeptides, HC représente le centre hydrophobe, S-S indique le pont disulfure, et MA la région d'attache à la membrane. Les sites de glycosylation sont indiqués par CHO (D'après (5)).

La partie amino-terminale de la protéine PrP^c (23 à 124) est une séquence flexible non structurée contenant des répétitions d'octapeptides riches en proline et glycine, entourée de deux clusters chargés positivement, CC1 (aa 23-27) et CC2 (aa 95-110). Un domaine hydrophobique, la région HC (aa 111-134), se trouve dans le centre de la structure (Figure N° 4) (5). L'extrémité carboxy-terminale est caractérisée par un domaine globulaire avec une organisation en trois hélices alpha correspondant aux résidus 144-154 (hélice H1), 173-194 (hélice H2) et 200-228 (hélice H3), et un feuillet plissé antiparallèle formé par les feuillets β des résidus 128-131 et 161-164. Un pont disulfure relie les résidus cystéine 179 et 214 et il existe deux sites de N-glycosylation. L'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) est liée à l'acide aminé 231 et elle est responsable de l'ancrage de la PrP^c aux membranes. La partie carboxy-terminale de la PrP^c est essentiellement structurée en hélices α (42%) et ne contient que 3% de feuillets β (49) (Figure N° 5). La partie amino-terminale ne semble pas structurée, au moins quand la protéine est en solution (188).

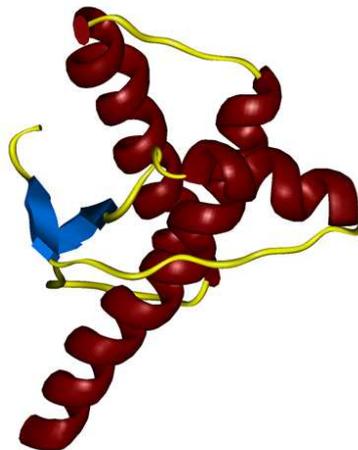


Fig. N°5. Structure tertiaire de la protéine PrP^c.

Cette protéine contient un pourcentage plus important d'hélices α que de feuillets β (D'après (187)).

La protéine PrP^c est exprimée au cours de l'embryogenèse, et est principalement présente chez l'adulte dans les neurones centraux (cerveau et moelle épinière) et périphériques. Elle est aussi présente dans les cellules gliales du système nerveux central et dans de nombreux tissus périphériques, dont notamment les organes lymphoïdes secondaires, le muscle squelettique, le rein et le cœur (99).

Le chemin biosynthétique de la PrP^c est similaire à celui des protéines transmembranaires ou secrétées (43). Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granulaire, transite à travers l'appareil de Golgi pour être ensuite acheminée à la surface cellulaire. Au cours de ce transit, elle subit un certain nombre de maturations post-traductionnelles : clivage du peptide signal, ajout de l'ancre, glycosylation et pont disulfure intra-chaine.

Comme la majorité des protéines GPI-ancrées, la PrP^c est présente dans des domaines membranaires riches en sphingomyéline et cholestérol, dénommés radeaux lipidiques ou rafts. Après son export à la membrane plasmique, la PrP^c entre dans des cycles d'internalisation au cours desquels une partie est dégradée dans le compartiment lysosomal tandis qu'une partie est réexportée vers la membrane. Les mécanismes d'internalisation varient en fonction du type cellulaire et plusieurs voies pourraient même coexister dans un même type cellulaire (179). L'endocytose de la PrP^c au niveau de puits à clathrine (205) (123) est observée dans le cerveau, dans différentes lignées cellulaires ainsi que dans des neurones en culture primaire. Dans ce cas, la PrP^c membranaire quitte les rafts pour s'associer aux puits à clathrine (217). Cependant, l'internalisation de la PrP^c peut aussi survenir par d'autres voies mettant en jeu des mécanismes dépendants des rafts et/ou des cavéoles (149) (175) (221). L'exposition aux ions Cu²⁺ stimule l'internalisation de la PrP^c membranaire (170) (173). Au cours des cycles d'endocytose, une partie de la PrP^c subit des clivages protéolytiques (206) (51). Le clivage principal a lieu entre les acides aminés 111 et 112 et un autre aux environs de l'acide aminé 90, libérant ainsi de petits fragments amino-terminaux, les portions carboxy-terminales restants associées à la membrane.

1.3.3 La fonction de la PrP^c

L'étude de sa fonction pourrait être importante pour comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des encéphalopathies spongiformes transmissibles et pour identifier des possibilités de traitement. Cependant, malgré les avancées dans la caractérisation de sa structure, le rôle biologique de la protéine PrP^c est encore mal connu. De nombreuses lignées de souris invalidées pour le gène *Prnp* ont été obtenues dans différents laboratoires. Cependant, l'absence de la protéine PrP^c n'affecte ni leur viabilité, ni leur développement ni leur comportement (39) (146). L'invalidation du gène n'a donc pas permis d'émettre des hypothèses quant à la fonction de la PrP^c. Plusieurs fonctions sont généralement attribuées à la PrP^c. Elles incluent un rôle dans la survie cellulaire, dans la protection vis-à-vis du stress oxydatif, dans l'intégrité des synapses et dans la croissance neuritique (8) (254). L'activité cytoprotectrice de la protéine PrP^c a été décrite *in vitro*, dans des cultures cellulaires et *in vivo*, chez la souris.

Dans différents modèles cellulaires, la PrP^c protège de différents stimuli pro-apoptotiques comme la surexpression de Bax ou le traitement par le TNF α (31) (70). In vivo, l'expression de la PrP^c protège de la neurodégénérescence induite par certains mutants de délétion de la PrP^c (204) (128). Par ailleurs, une fonction protectrice de la PrP^c a été mise en évidence dans le tissu cérébral soumis à une ischémie et dans des explants rétiniens soumis à un stimulus pro-apoptotique. Il faut cependant noter que d'autres études, un rôle pro-apoptotique de la PrP^c a été observé (164).

Un rôle de la PrP^c dans la protection vis à vis du stress oxydatif pourrait aussi participer à son activité neuroprotectrice (156). Il semble exister un lien entre l'expression de la protéine PrP^c et la capacité à résister à un stress oxydatif, que ce soit dans des cultures cellulaires (255) ou in vivo (258). Cette propriété pourrait être due à une augmentation de l'activité superoxyde dismutase dépendante du cuivre (SOD) cellulaire permettant l'élimination des ROS (ROS : reactive oxygen species) et /ou à la fixation par la PrP^c des ions Cu²⁺. Quoiqu'il en soit, la possibilité que la PrP^c présente une fonction SOD est controversée (4). L'hypothèse d'un rôle de la PrP^c dans la biologie de la synapse provient de données électrophysiologiques obtenues sur des neurones de l'hippocampe provenant d'animaux invalidés pour la PrP^c (62) (145). Cependant, les altérations dans la transmission synaptique n'ont pas été observées par d'autres auteurs (134) (140) et des facteurs génétiques autres que la PrP^c pourraient expliquer ces observations discordantes. En culture cellulaire, il a été rapporté que l'exposition de neurones de l'hippocampe à de la PrP^c recombinante induit la formation de boutons synaptiques (112) et plusieurs études ont montré que la PrP^c est impliquée dans la croissance neuritique des neurones (135) (196).

En raison de la localisation de la PrP^c à la surface cellulaire, il est raisonnable de faire l'hypothèse que cette protéine puisse participer à des processus de reconnaissance et de signalisation cellulaires. Plusieurs cascades signalétiques dépendent de, ou sont déclenchées par, le pontage de la PrP^c (158) (159) (231). Etant donné que sa chaîne polypeptidique est totalement extracellulaire, il est alors postulé que la protéine PrP^c interagisse avec des protéines adaptateurs transmembranaires pour la transduction des signaux à l'intérieur du cytoplasme. Enfin, certaines protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, par exemple la molécule d'adhésion N-CAM, semblent interagir avec la PrP^c (198). Dans le cas de N-CAM, cette interaction induit la redistribution de N-CAM vers les radeaux lipidiques, l'activation de la fyn kinase et la croissance neuritique (196).

1.4 La protéine PrP anormale (PrP^{sc})

La PrP anormale, dénommé PrP^{sc}, est le conformère anormal de la protéine PrP^c, et cette isoforme est spécifiquement présente dans les tissus infectés.

1.4.1 Caractéristiques structurales

Alors que la structure cristallographique de la PrP^c recombinante ou extractive est connue, les propriétés agrégatives de la PrP anormale (voir plus loin) et les difficultés rencontrées pour la purifier à l'homogénéité ne permettent pas à ce jour de disposer de données structurales fines. Les données basse résolution disponibles quant à la structure secondaire de la PrP^{sc} (obtenues par spectroscopie infrarouge de transformation de Fourier et dichroïsme circulaire) indiquent que la conversion implique un changement structural important aboutissant à une structuration riche en feuillets β (Figure N° 6) (49) (165) (191). Différents modèles d'organisation structurale ont cependant été proposés, selon lesquels la forme anormale riche en structure β conserverait des hélices α (59) (92). Selon un autre modèle, la PrP^{sc} ne conserverait pas d'hélice α (56). Des résultats très récents, obtenus après analyse par spectroscopie infrarouge de PrP anormale hautement purifiée, sont en faveur d'une absence d'hélices α (212).

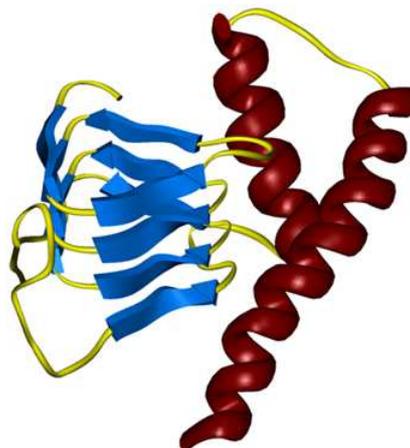


Fig. N°6. Modèle de la structure tridimensionnelle de PrP^{sc}.

La forme anormale contient plus de feuillets β (43%) que d'hélices α (30%) (D'après (92)).

1.4.2 Caractéristiques biochimiques

Ce changement structural confère à la PrP^{sc} deux propriétés qui permettent de la différencier de la protéine cellulaire PrP^c : une résistance partielle à la digestion par les protéases et une insolubilité. Les principales différences entre la forme cellulaire et la forme anormale sont les suivantes :

PrP^c	PrP^{sc}
Structure secondaire: hélices α .	Structure secondaire : feuillets β .
Sensible aux protéases	Résistante aux protéases
Protéine monomérique	Agrégats protéiques
Soluble en détergents non dénaturants	Insoluble en détergents
Libérée après digestion par la PI-PLC.	Non libérée après digestion par la PI-PLC.

En l'absence d'anticorps reconnaissant spécifiquement la PrP anormale, ces différences de comportement biochimique sont exploitées pour mettre en évidence la PrP^{sc} dans les tissus ou les cellules infectées. Après solubilisation dans des détergents non ioniques, la PrP^c est totalement dégradée par un traitement protéolytique (la protéinase K [PK] est généralement utilisée). La PrP^{sc} est partiellement résistante aux protéases : la partie amino-terminale est dégradée mais la portion centrale et carboxy-terminale sont résistantes. L'action de la PK génère donc un fragment de PrP^{sc} de 27 à 30 kDa (appelé PrP 27-30 ou PrP^{res}), spécifiquement détectée dans les échantillons infectés (Figure N° 7). La PrP^{res} ainsi générée est insoluble et peut donc être isolée par centrifugation. L'observation en microscopie électronique montre qu'elle est organisée sous forme de fibres, appelées Scrapie Associated Fibrils (SAFs) (155) ou rods (181), selon les auteurs (Figure N° 8).

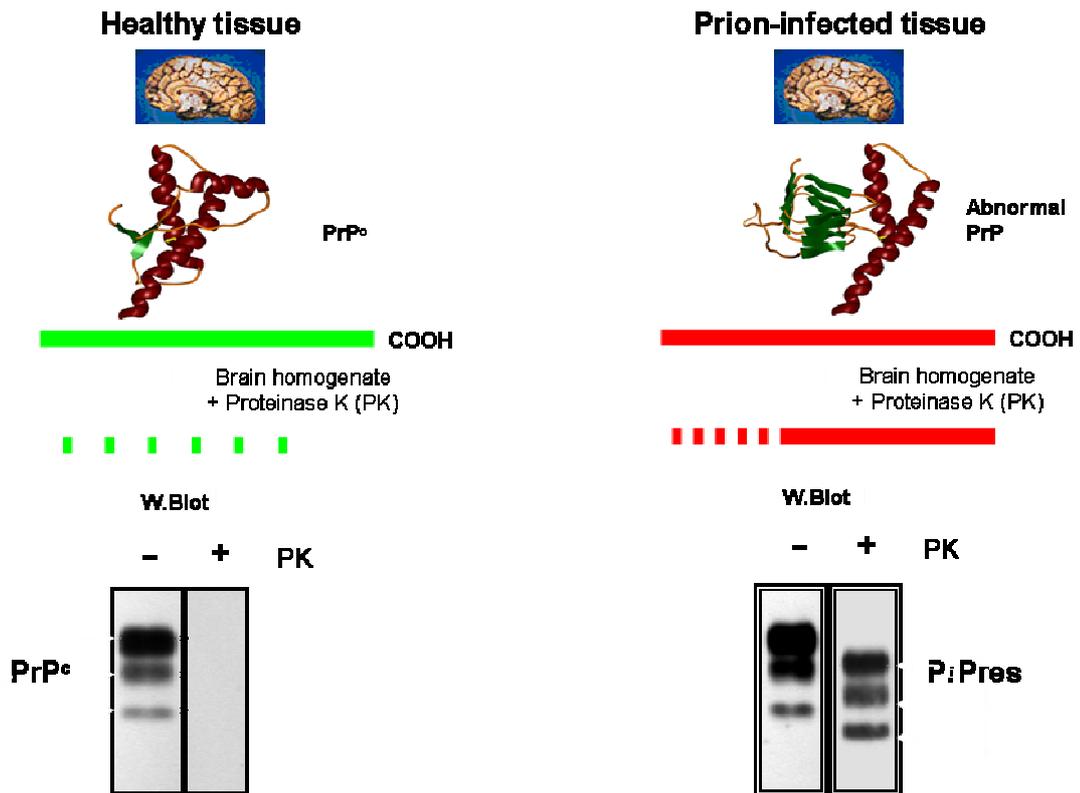


Fig. N° 7. Détection biochimique de la PrP^c et de la PrP^{sc}. La protéine cellulaire PrP^c provenant d'un tissu ou culture cellulaire non infectés est complètement dégradée après digestion par les protéases. Par contre, dans un tissu infecté par le prion, la PrP^c est dégradée mais la protéine anormale résistante (PrP^{res}) peut être visualisée en Western blot.

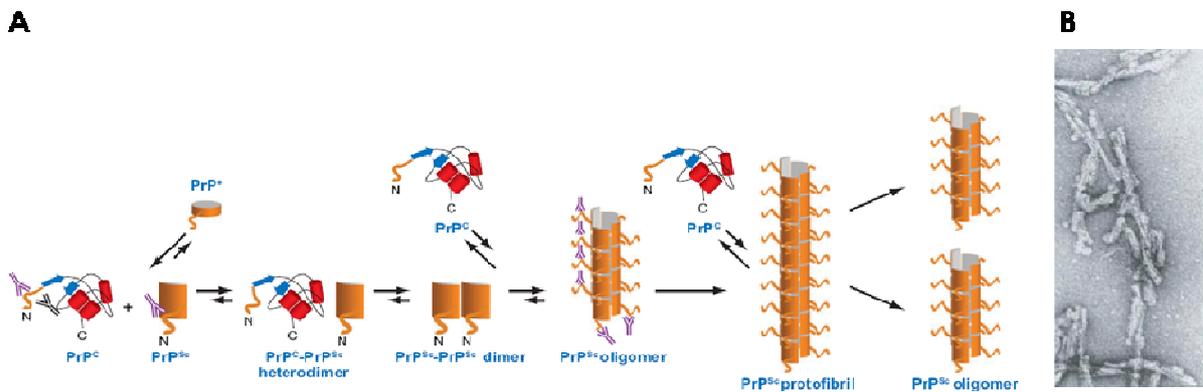


Fig. N°8. Formation des fibres de PrP^{sc}. **A.** La protéine PrP^{sc} converti la forme PrP^c en forme anormale. Les formes anormales évoluent en oligomères qui s'associent en fibres. **B.** Fibres de prions composées par la protéine PrP27-30, colorée négativement avec de l'acétate d'uranyle (D'après (5)).

1.4.3 Formes anormales de PrP sensibles aux protéases

La PrP^{res} (ou PrP²⁷⁻³⁰) a longtemps été considérée comme la seule forme de PrP anormale (180). Il s'avère maintenant que la situation est bien plus complexe. Depuis quelques années, d'autres formes de PrP anormales ont été décrites puis caractérisées. A la fin des années 1990, le groupe de Prusiner a décrit des formes de PrP^{sc} qui sont sensibles aux protéases (192). Ces formes sont détectées par CDI (Conformation-Dependant Immunoassay). Ce CDI consiste à dénaturer la PrP^{sc} par des agents chaotropes, avec pour conséquence l'exposition d'épitopes qui sont normalement masqués dans la PrP^{sc} native. L'augmentation d'immunoréactivité après dénaturation est beaucoup plus forte avant traitement par la PK, suggérant qu'une partie importante de la PrP^{sc} est détruite par la protéase. Ces formes, initialement détectées dans des cerveaux de hamsters infectés par différentes souches, ont été observées dans d'autres espèces (225), y compris chez l'homme (193). Elles ont été par la suite purifiées par gel filtration (236) ou par ultracentrifugation différentielle (169). Ces formes anormales, appelées senPrP^{sc}, sont sensibles à la PK et correspondent à des formes de plus petite taille que la PrP^{res}. Bien que la senPrP^{sc} soit active dans des tests de PMCA (169) (voir ci-après), aucun résultat démontrant que ces formes sont infectieuses n'a été publié à ce jour. Quoiqu'il en soit, ces travaux, ainsi que ceux décrits dans la publication N° 2, montrent que la PrP anormale est très probablement un ensemble hétérogène d'espèces moléculaires.

1.5 Conversion de la PrP^c en PrP^{sc}

1.5.1 Localisation subcellulaire des sites de conversion

La conversion de la protéine PrP^c en PrP anormale PrP^{sc} est un événement central dans la pathogenèse des encéphalopathies spongiformes dont les détails moléculaires ne sont pas bien compris. La distribution subcellulaire de la PrP anormale est difficile à établir en raison de l'absence d'anticorps spécifiques de la PrP^{sc} et car sa détection immunohistochimique ou par immunofluorescence nécessite des traitements dénaturants drastiques qui altèrent l'intégrité cellulaire. D'une façon générale, la PrP anormale est le plus souvent détectée à la membrane plasmique (127) (242) et dans le compartiment endolysosomal (220) (153) (13). Cependant, l'identification des sites d'accumulation de la PrP^{sc} ne permet pour autant pas d'identifier où s'opère la conversion. L'acquisition de la résistance à la PK et l'insolubilité sont des phénomènes post-traductionnels qui surviennent une fois la PrP^c à la membrane plasmique (46) (30). La conversion pourrait donc survenir à la membrane plasmique lors de l'interaction de la PrP^{sc} infectante avec la forme normale et/ou lors des cycles ultérieurs d'endocytose (Figure N° 9). Des résultats obtenus précédemment au laboratoire indiquent que la PrP^{sc} infectante est internalisée indépendamment de présence de la PrP^c. Cependant cette PrP^{sc} ne peut infecter les cellules que si la PrP^c est présente à la membrane au moment du contact entre la cellule et la PrP^{sc} (166). Cette observation est tout à fait compatible avec l'hypothèse d'une conversion initiée à la membrane plasmique. Une étude très récemment publiée a en outre apporté des arguments expérimentaux directs en faveur de la membrane plasmique comme site subcellulaire précoce de la conversion de la PrP^c en PrP^{sc} (89).

Les formes normale et anormale de la PrP sont associées aux radeaux lipidiques. Ces rafts semblent jouer un rôle important dans la conversion (177). En effet, la déplétion en cholestérol ou la dissociation de la PrP^c d'avec les rafts (par adjonction d'un domaine transmembranaire) inhibe sa conversion en PrP^{sc}. Les rafts pourraient être un lieu de rendez vous entre la PrP^c, la PrP^{sc} et d'autres éventuels cofacteurs (43).

potentiel d'amplification permet en outre d'envisager des tests de détection bien plus sensibles que ceux disponibles auparavant (190). Enfin, cette technique permet d'envisager l'identification des co-facteurs nécessaires à la conversion. Dans sa version originale, la PMCA est réalisée en utilisant comme milieu réactionnel des extraits de tissu cérébral. De nombreuses tentatives ont depuis lors été conduites dans des milieux moins complexes et mieux définis. Le groupe de Suppatapone a ainsi montré que des ARN (probablement via leurs charges négatives) peuvent être d'importants co-facteurs pour propager la PrP^{sc} par PMCA (66). L'ajout de certains phospholipides de synthèse est aussi un facteur critique pour amplifier des prions en milieu défini. D'une façon plus générale, le fractionnement d'extraits tissulaires est actuellement utilisé pour tenter d'identifier les facteurs importants dans l'amplification de prions par PMCA (1).

1.5.3 Génération de novo de prions

Une prédiction importante de l'hypothèse de la protéine seule est que des prions infectieux devraient pouvoir être générés *in vitro*, en utilisant de préférence de la protéine PrP^c recombinante. De fait, les très nombreuses tentatives de différents laboratoires au cours des 15 dernières années soit n'ont pas été couronnées de succès soit pouvaient donner lieu à des critiques méthodologiques, soulignant la difficulté de générer une conformation infectieuse dans un tube à essai (23). Cependant, trois études ont été publiées dans les deux dernières années montrant que la démonstration définitive de la théorie protéique pourrait avoir été faite (18) (142) (252). Dans les trois cas, des prions infectieux ont été générés/amplifiés par PMCA à partir de tissus sains ou de protéine PrP^c recombinante. Dans l'étude menée par le groupe de Ma, un mélange réactionnel contenant de la PrP^c recombinante, des vésicules lipidiques et des ARN a généré après PMCA de la PrP^{sc} insoluble, résistante à la PK. Ce mélange est infectieux et bien que le titre infectieux n'a pas été déterminé, la période d'incubation chez la souris sauvage est courte (150 jours), suggérant que les échantillons sont très infectieux (252).

1.6 Physiopathologie

1.6.1 Dissémination dans l'organisme

Bien que l'inoculation intracérébrale est de loin la méthode d'infection la plus efficace et la plus rapide, l'immense majorité des cas de transmissions naturelles survient par voie périphérique et notamment orale. Après infection périphérique, les prions sont détectés dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, amygdales, ganglions) bien plus précocement que dans le cerveau (Figure N°10) (pour revue (162) (3) (139)). La multiplication dans les tissus lymphoïdes périphériques est importante pour la neuroinvasion dans la mesure où la splénectomie ralenti considérablement l'évolution de la maladie (88). Cependant, il est très clair que l'ampleur de la multiplication périphérique dans les organes lymphoïdes est très variable en fonction de la souche infectieuse et de l'hôte.

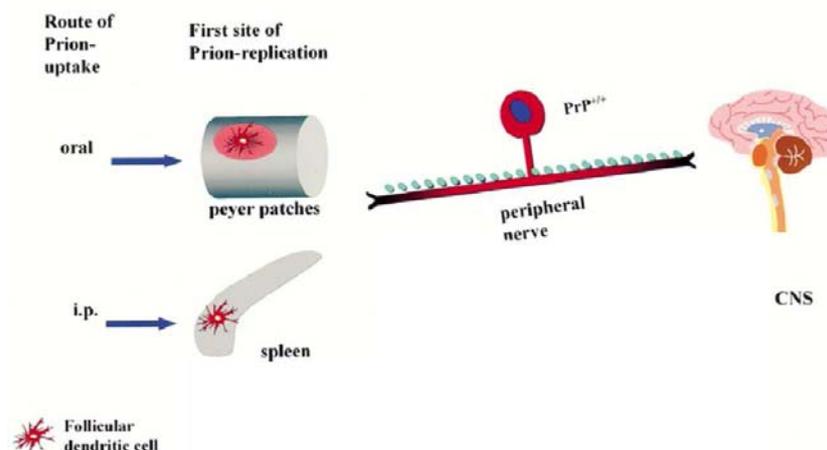


Fig. N° 10. Neuroinvasion des prions. Généralement, le tissu lymphoïde est le premier site de réplication de prions, qui se disséminent ensuite dans le système nerveux périphérique jusqu'à leur arrivée dans le cerveau (D'après (88)).

Chez l'homme atteint de MCJ sporadique, l'agent infectieux est très peu présent dans les organes lymphoïdes, contrairement aux cas de vMCJ où les prions (et la PrP^{res}) sont aisément détectables dans les structures lymphoïdes périphériques (248) (Figure N°3). Cette différence de tropisme pour les organes lymphoïdes est aussi observée parmi les souches infectieuses ovines. Dans le cas de la souche de tremblante atypique (Nor98), l'agent infectieux est quasi-exclusivement présent dans le SNC alors que pour les souches de tremblante classique, les organes lymphoïdes sont très infectés (11).

L'espèce infectée joue aussi un rôle déterminant dans la multiplication périphérique. On observe une multiplication périphérique importante de l'agent de l'ESB chez les ovins au contraire de ce qui est observé chez l'hôte naturel, le bovin. Il est donc clair que les mécanismes qui conduisent à la neuroinvasion peuvent être très différents selon le paradigme considéré.

Les prions dans les organes lymphoïdes sont ensuite transportés vers la moelle épinière thoracique par les nerfs splanchniques (système orthosympathique) qui innervent ces formations (100). L'agent infectieux progresse alors dans la moelle de façon ascendante (et descendante) et gagne ainsi le cerveau. Comme indiqué précédemment, ce schéma de dissémination peut varier en fonction des souches infectieuses et/ou de l'hôte infecté. Dans certains cas, la neuroinvasion peut s'opérer sans mettre en jeu la rate et la moelle épinière. Les prions sont alors transportés vers le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMNV) situé dans le tronc par l'innervation parasympathique (nerf vague) qui relie la muqueuse intestinale (et les tissus lymphoïdes associés) au tronc cérébral. Lors de l'infection par voie orale (Figure N° 11), les prions sont tout d'abord détectés dans la muqueuse intestinale et plus précisément dans le tissu lymphoïde qui y est associé (GALT). Le franchissement de la muqueuse pourrait survenir par transcytose au niveau des cellules M (102) (83). Les cellules dendritiques pourraient alors capter et transporter les prions dans le tissu lymphoïde associé.

1.6.2 Nature des types cellulaires impliqués

La thymectomie (152) et l'utilisation de différentes lignées de souris transgéniques (116) ont démontré que les lymphocytes T ne sont pas impliqués dans la pathogénèse des EST. A l'inverse, la présence de lymphocytes B conditionne la multiplication des prions dans la rate et la neuroinvasion ultérieure (115). Le rôle des lymphocytes B est indirect. Ils sont nécessaires à la maturation des cellules folliculaires dendritiques (FDC) dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes (138). Les FDC, cellules post-mitotiques importantes dans la présentation antigénique, sont permissives à la multiplication des prions et assurent leur amplification dans les organes lymphoïdes (33). Les macrophages des centres germinatifs des organes lymphoïdes (tingible-body macrophage) contiennent des quantités aisément détectables de PrP anormale. La déplétion de ces macrophages par traitement pharmacologique augmente la multiplication des prions dans la rate et provoque une diminution de la période d'incubation (24). Il est donc considéré que ces macrophages jouent un rôle inhibiteur dans la pathogénie via la capture et la dégradation des prions.

Les mécanismes de transfert entre les FDC et les terminaisons nerveuses ne sont pas connus. Ils pourraient impliquer des cellules mobiles (cellules dendritiques, macrophages) et/ou la diffusion de prions acellulaires (associés par exemple à des microvésicules). Quoiqu'il en soit, les prions colonisent alors progressivement la partie supérieure de la moelle épinière et sont ainsi acheminés vers le cerveau. Enfin, le rôle du sang dans la neuroinvasion est débattu. Dans de nombreuses espèces, le sang est infectieux, y compris lors de la phase préclinique chez l'homme atteint de vMCJ (235). La barrière hémato-encéphalique ne permet normalement pas aux cellules sanguines d'accéder au cerveau. Cependant, cette barrière est bien moins étanche dans certaines structures cérébrales (notamment au niveau de l'hypothalamus) où l'endothélium des capillaires est fenêtré. Ces structures (circumventricular organs, CVO), dont il a été montré qu'elles peuvent contenir de la PrP anormale, pourraient représenter des portes d'entrées pour des formes acellulaires de prions (211).

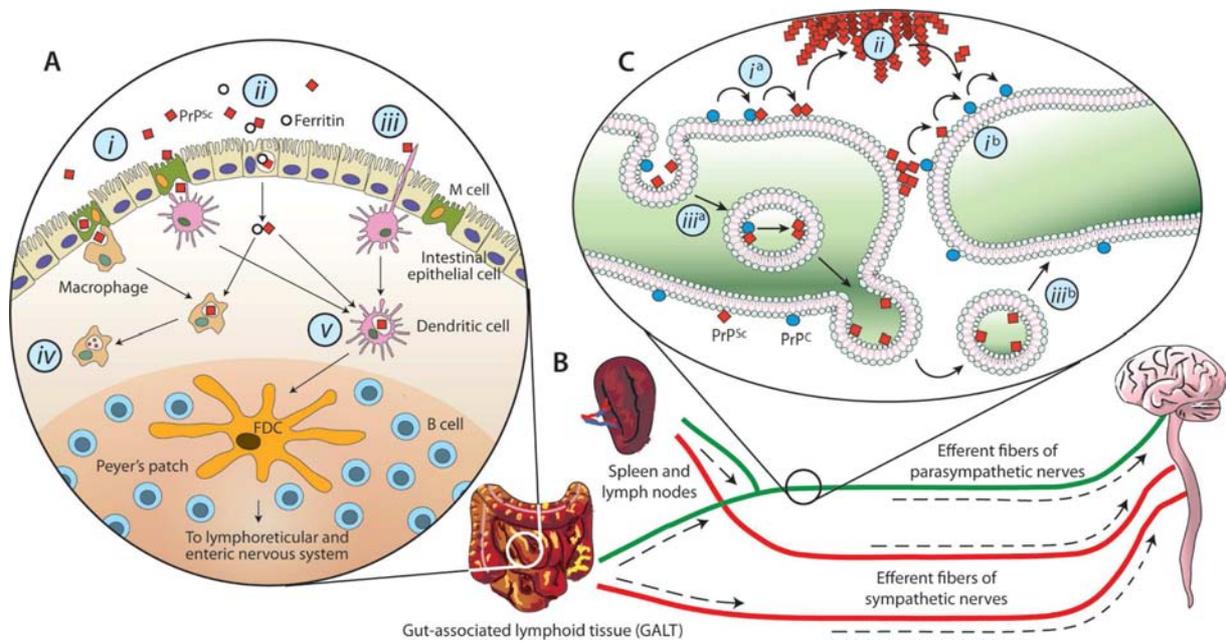


Fig. N° 11. Représentation schématique de la neuroinvasion dans les ESTs. (A) L'entrée du prion à partir de la lumière intestinale pourrait se produire par différents mécanismes, incluant la transcytose par les cellules M (i), la transcytose dépendante de ferritine à travers des cellules épithéliales intestinales (ii), ou par capture directe par les cellules dendritiques (iii). Si les macrophages semblent pouvoir dégrader la PrP^{Sc} (iv), les cellules dendritiques pourraient délivrer le prion aux cellules dendritiques folliculaires (FDCs) qui l'amplifient(v). (B) Après la multiplication du prion dans les tissus lymphoïdes comme le GALT ou le rate, l'invasion du SNC se produit par les nerfs périphériques (innervations sympathétique et parasympathétique). (C) Le transport rétrograde et la propagation de la PrP^{Sc} dans les neurones pourrait survenir par des interactions localisées à la surface cellulaire (ia et ib), par des dépôts extracellulaires (ii), ou par des mécanismes impliquant la sécrétion de vésicules infectieuses (iiia et iiib) (D'après (57)).

1.7 Neurodégénérescence

Les mécanismes qui conduisent à la mort de certaines populations neuronales ne sont pas très bien définis. On considère généralement que la mort neuronale procède par un processus de type apoptotique (54). Des vacuoles autophagiques peuvent cependant être observées dans les neurones de tissus infectés (209) (132). Le rôle de l'autophagie dans l'infection n'est pas clair (elle pourrait promouvoir ou au contraire inhiber la multiplication des prions (101)) et il n'est pas sûr qu'elle ait un rôle causal dans la mort neuronale (122). D'un point de vue neuropathologique, les maladies à prion sont caractérisées par une perte neuronale, une astrogliose ainsi qu'une activation microgliale (214). Il est probable que ces différents types cellulaires peuvent altérer de manière significative et par différents mécanismes la fonctionnalité des neurones et contribuent ainsi à la mort neuronale. Par exemple, les cellules microgliales activées par la PrP^{res} peuvent libérer des molécules neurotoxiques (NO₂, cytokines) (148). Il est cependant peu aisé de faire la part entre les effets bénéfiques d'une activation microgliale (via par exemple la dégradation de la PrP anormale) et son impact négatif sur la mort neuronale (214).

D'un point de vue moléculaire, la nature des formes de PrP responsables de la mort des neurones infectés n'est pas non plus connue avec précision (53) (6). Deux types d'hypothèses peuvent être évoqués. Selon la 1^{ère}, la PrP^c ne pourrait plus assurer sa fonction biologique normale après sa conversion et cette perte de fonction aurait des conséquences néfastes sur la survie neuronale (103). Si les fonctions cytoprotectrices de la PrP^c évoquées précédemment (1.3.3) militent en faveur de cette possibilité, plusieurs arguments expérimentaux excluent qu'une perte de fonction puisse à elle seule rendre compte de la mort neuronale. Les souris *Prnp*^{0/0} ne souffrent d'aucune neurodégénérescence, y compris quand l'invalidation est induite de façon post-natale (145). Par ailleurs, un tissu cérébral *Prnp*^{+/+} infecté et greffé dans un cerveau *Prnp*^{0/0} ne provoque aucune neuropathologie dans le tissu *Prnp*^{0/0} malgré la diffusion de la PrP^{sc} du greffon (32). L'inhibition de l'expression de la PrP^c dans les neurones de souris en tout début de phase clinique stoppe la neurodégénérescence et prolonge la survie des animaux malgré la multiplication des prions dans les cellules astrocytaires (144). Enfin, le cerveau de souris transgéniques exprimant un variant sécrété de la PrP^c (forme GPI-) accumule des quantités importantes de prions et de PrP^{res} et ce sans atteinte neuropathologique (52). Ces données militent donc en faveur d'une 2^{nde} hypothèse selon laquelle la PrP anormale serait à l'origine d'un signal neurotoxique et que la PrP^c ancrée dans la membrane serait ensuite nécessaire pour que ce signal aboutisse à la mort cellulaire. La nature du signal neurotoxique est débattue.

La PrP anormale qui s'accumule dans les cellules infectées pourrait être à l'origine de dysfonctionnements conduisant à la mort cellulaire. Selon un 1^{er} scénario, elle serait à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique conduisant à la rétrotranslocation de protéines vers le cytoplasme pour une dégradation protéasome-dépendante (184). La présence de PrP^c dans le cytoplasme pourrait alors générer un signal neurotoxique, de même que la saturation de l'activité protéolytique du protéasome pourrait déclencher un processus apoptotique. D'autres études ont montré que des préparations de PrP^{res} ou de protéines PrP^c recombinantes anormalement repliées peuvent provoquer une inhibition du protéasome et induire la mort cellulaire (121).

Ces différents mécanismes ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs. Il est par exemple tout à fait possible d'envisager que l'action neurotoxique de la PrP anormale soit amplifiée par une perte substantielle de l'effet neuroprotecteur de la PrP^c. Enfin, et pour rajouter à la complexité de la situation, il est important de garder en mémoire que dans certains modèles expérimentaux des phénomènes de dégénérescence sont observés en absence de PrP anormale détectable (126) (19). Ces observations suggèrent que la PrP anormale classique (PK résistante, agrégée et détectable en immunohistologie) n'est pas la seule entité neurotoxique.

1.8 Les souches de prions

Une souche de prions est définie comme une source infectieuse qui se propage de façon stable au cours des transmissions successives chez un même hôte (157). Historiquement, les caractéristiques qui distinguaient les différentes souches étaient d'ordre biologique. Ils incluent la période d'incubation après inoculation expérimentale, les signes cliniques et la neuropathologie (les profils lésionnels) observée dans le SNC. Plus récemment, les propriétés biochimiques de la PrP anormale et sa distribution régionale dans le cerveau sont des éléments employés de plus en plus fréquemment pour différencier les souches de prions.

1.8.1 Propriétés biologiques

Historiquement, la mise évidence et la caractérisation de différentes souches de prions ont été conduites chez les rongeurs (la souris principalement) après transmission expérimentale d'échantillons infectieux provenant d'autres espèces. Après stabilisation de l'agent à son nouvel hôte (voir 1.3.1), la période d'incubation devient remarquablement stable au cours des passages ultérieurs. Chaque souche est alors caractérisée par sa période d'incubation et par la distribution des lésions neuropathologiques qu'elle provoque dans le cerveau des animaux infectés (35). Ce profil lésionnel est établi en déterminant l'intensité de la vacuolisation dans neuf zones de la substance grise et trois zones de la substance blanche (253). Cette signature anatomopathologique est spécifique de chaque souche. Cette analyse est cependant complexe et elle est maîtrisée par peu de laboratoires. Une alternative à la détection régionale de la vacuolisation consiste à visualiser par PET blot (Paraffin-Embedded Tissue blot) (199) la distribution de la PrP anormale au sein du tissu cérébral. Cette technique permet de visualiser de façon précise les sites neuroanatomiques où la PrP^{sc} s'accumule préférentiellement. Ce type d'analyse montre que certaines souches présentent des distributions très différentes. Cette régionalisation souche dépendante peut donc être utilisée pour identifier une souche infectieuse.

1.8.2 Propriétés biochimiques de la PrP anormale

La caractérisation biochimique de la PrP^{sc} associée à différentes souches révèle des différences importantes. Elles concernent la structure secondaire, le profil électrophorétique et le degré de résistance à la protéinase K ou à la dénaturation. Ces analyses peuvent permettre d'une part d'identifier certaines souches infectieuses et confortent d'autre part l'hypothèse selon laquelle la conformation des agrégats de PrP anormale est à l'origine de l'identité de chaque souche.

Structure secondaire :

L'analyse de la structure secondaire de la PrP anormale associée à différentes souches de prions murins a été conduite par spectroscopie à infrarouge. Ces travaux ont montré que la structure secondaire de la PrP^{res} varie en fonction de la souche infectieuse (47) (229) (216). Ces données ont été récemment confirmées (16) en utilisant 1) différents échantillons extrêmement purs de PrP^{res} générée par des souches murines et 2) de la PrP^{res} peu glycosylée dépourvue d'ancre GPI.

Profil électrophorétique :

Le profil électrophorétique de la PrP^{res} correspondant à différentes souches peut varier de façon importante après analyse en western blot. Le profil électrophorétique est défini d'une part par la taille des fragments de PrP anormale générés après action de la PK et d'autre part par leur degré de glycosylation. Cette situation, initialement décrite pour deux souches infectieuses de hamster (26), est aussi observée pour certains agents murins, bovins et ovins. Chez l'homme, 4 types de PrP^{res} ont été identifiés (les types 1, 2, 3 et 4) qui diffèrent par la taille des fragments résistants à la PK et par leur degré de glycosylation (Figure N° 12). La majorité de la PrP^{res} des types 1 à 3 est mono-glycosylée (glycosylée à l'un des deux sites possibles) alors que la PrP^{res} du type 4 est principalement bi-glycosylée. Les MCJ sporadiques et iatrogènes sont associées aux types 1 à 3, et le type 4 est associé au variant vMCJ (61).

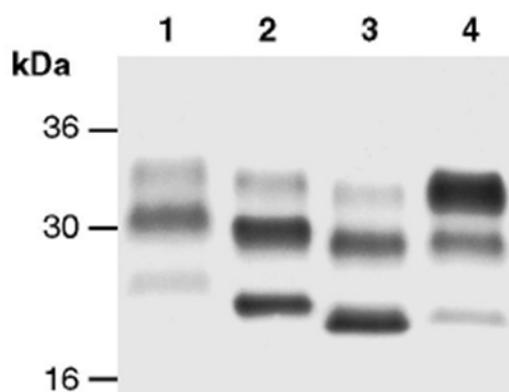


Fig. N° 12. Profils moléculaires de la PrP^{res} de différentes souches. Différents profils électrophorétiques ont été identifiés chez l'homme. Cette image montre différents types de PrP^{sc} (type 1-4) à l'aide de l'anticorps 3F4 (D'après (250)).

L'hypothèse pour rendre compte des différentes tailles générées après protéolyse par la PK est que ces PrP anormales ont des structures bi- ou tri-dimensionnelles différentes capables de moduler l'accessibilité vis-à-vis de la PK.

Degré de résistance à la dégradation protéolytique :

Dans certains cas, le degré de résistance à la dégradation par la PK de la PrP anormale varie en fonction de la souche (27) (237). On peut ainsi identifier des souches dont la PrP anormale est 5 à 10 fois plus résistante à la protéolyse que d'autres.

Profil de dénaturation de la PrP anormale :

La dénaturation de la PrP anormale peut aussi varier de façon importante en fonction de la souche infectieuse. Après incubation en présence de concentrations croissantes d'agent chaotrope (guanidine par exemple) (192), la dénaturation de la PrP anormale peut être mesurée par différentes techniques. Il est possible de mesurer l'exposition de certains épitopes qui sont masqués dans la forme native (test CDI). Il est aussi possible de suivre la dénaturation de la PrP anormale par la perte de sa résistance à la PK ou par la perte de son insolubilité. Ces mesures, qui permettent d'établir le profil de dénaturation de la PrP^{sc} en fonction de la quantité de chaotrope, montrent que ces profils peuvent être très différents d'une souche à l'autre (174).

1.8.3 La souche et la conformation de la PrP^{sc}

Nous venons de voir que la PrP anormale peut présenter des propriétés biochimiques ou structurales particulières en fonction de la souche infectieuse. Le fait que ces propriétés se propagent stablement au cours des passages itératifs chez l'animal est un argument fort associant la conformation des agrégats PrP anormale et l'identité de chaque souche. Dans certains cas, notamment chez l'homme, il n'est évidemment pas possible de transmettre la souche infectieuse à l'hôte naturel. Des isolats infectieux humains ont été transmis à des souris transgéniques exprimant la PrP^c humaine ou une PrP^c chimérique murine/humaine (223) (222). Ces expériences ont montré que les profils électrophorétiques souche-dépendant de la PrP anormale dans le tissu humain (taille du fragment non glycosylé après PK et répartition des différents glycoformes) sont toujours observés après transmission à la souris transgénique.

2. Autres maladies neurodégénératives liées au mauvais repliement des protéines.

Chez l'homme, une dizaine de maladies neurodégénératives sont imputées à l'accumulation de protéines anormalement repliées en feuillets β . Ces maladies, dont les plus connues sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, présentent des caractéristiques communes avec les EST (109). Ce sont des maladies sporadiques qui peuvent cependant présenter une composante génétique. On observe une dégénérescence sélective de certaines populations neuronales ainsi que l'accumulation d'agrégats protéiques ou peptidiques. Cependant, à la différence des maladies à prions, ces maladies ne sont pas transmissibles.

La maladie d'Alzheimer (AD) est un désordre neurologique avec une perte progressive de la mémoire et des capacités cognitives. Elle est la démence sénile la plus couramment rencontrée et le vieillissement de la population fera de cette maladie un problème majeur de santé publique dans les années à venir. D'un point de vue neuropathologique, cette maladie est caractérisée par l'agrégation extracellulaire des peptides $A\beta$ sous forme de plaques amyloïdes et par la présence de dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Les peptides $A\beta$ proviennent de la protéine précurseur amyloïde APP (après coupure protéolytique par les sécrétases β et γ) et les DNF ont pour origine l'agrégation de la protéine tau. Les coupures protéolytiques à l'origine des peptides $A\beta$ amyloïdogènes représentent un événement extrêmement important dans le processus agrégatif. Nous verrons plus loin qu'il pourrait survenir dans les MVBs (183), structure subcellulaire à l'origine des exosomes. La plupart des cas d'AD sont sporadiques. Cependant, dans environ 1% des cas cette maladie à une origine génétique. Certaines des mutations touchent la protéine APP et conduisent à une augmentation des clivages générant les peptides $A\beta$.

En termes de fréquence, la maladie de Parkinson est la 2nde maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Elle se traduit par des anomalies des mouvements. La structure cérébrale touchée est la substance noire dans laquelle on constate une perte des neurones pigmentés dopaminergiques et la présence d'inclusions (corps de Lewy) dans les neurones survivants. Ces corps de Lewy contiennent principalement des agrégats de la protéine α -synucléine. Là encore, si cette maladie est principalement sporadique, il existe des altérations génétiques du gène codant pour l' α -synucléine (mutations ou amplification) directement liées à l'apparition de la maladie. Cette protéine est localisée au niveau présynaptique, au niveau de la membrane des vésicules synaptiques. La fonction de l' α -

synucléine est mal connue. Elle pourrait être impliquée dans la sécrétion des neurotransmetteurs et avoir un rôle de chaperone.

Bien que ces maladies ne soient pas transmissibles, des travaux très récents indiquent que, comme dans les maladies à prions, le phénomène agrégatif peut dans certains cas se transmettre de cellule à cellule (7). Après plus d'une dizaine d'années, des neurones embryonnaires greffés dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson peuvent développer la neuropathologie (corps de Lewy et agrégats d' α -synucléine (130)). Par ailleurs, des agrégats exogènes d' α -synucléine peuvent entrer dans les cellules en culture pour y induire l'agrégation de la protéine endogène (136). Ces agrégats nouvellement formés peuvent être externalisés dans le milieu extracellulaire, être captés par de nouvelles cellules et promouvoir ainsi la dissémination du phénotype agrégé (68). D'autres travaux, menés notamment avec les protéines tau (55) et APP (77), avec l'huntingtine (186) (protéine dont l'agrégation est responsable de la maladie d'Huntington), suggèrent que des agrégats protéiques intracellulaires peuvent être sécrétés par les cellules pour être ensuite internalisés et induire l'agrégation dans d'autres cellules. Ces données suggèrent que la dissémination intercellulaire d'agrégats protéiques pourrait donc dépasser le cadre strict des maladies à prions.

3. EXOSOMES

3.1 Caractéristiques

Les cellules communiquent entre elles via la libération de molécules (peptides, protéines, lipides, acides nucléiques) qui peuvent alors diffuser et se fixer ou être incorporés dans les cellules cibles. Les cellules peuvent aussi sécréter des microvésicules membranaires contenant diverses macromolécules (80). Les exosomes correspondent à une classe particulière de microvésicules (58). Ces vésicules sont générées dans un compartiment endosomal appelé corps multivésiculaire (MVBs), compartiment de recyclage entre la membrane plasmique et les lysosomes (29). Au cours de la maturation de ces endosomes, on assiste à l'invagination de la membrane endosomale aboutissant à la formation de vésicules intraluminales (ILVs) qui s'accumulent dans les MVBs. Ces MVBs peuvent fusionner avec les lysosomes ou alors avec la membrane plasmique. Dans ce cas, le contenu de ces endosomes est exporté dans le milieu extracellulaire (Figure N° 14). Les vésicules intraluminales (ILVs) libérées sont alors appelées exosomes. A l'examen en microscopie électronique, ces microvésicules ont un diamètre de 50-100 nm (Figure N° 13) (67). Les cellules capables de sécréter des exosomes sont très diverses et incluent des cellules d'origine hématopoïétique (cellules B, cellules dendritiques, cellules T, plaquettes) ou non (cellules épithéliales intestinales, cellules de Schwann, cellules neuronales, cellules microgliales et de nombreuses cellules tumorales). Les exosomes sont présents dans de nombreux fluides corporels comme l'urine, le sang, le lait, et les fluides amniotiques ou broncho alvéolaires.

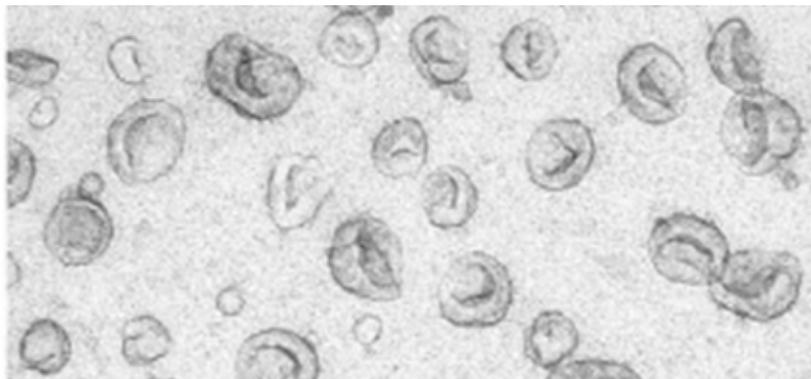


Fig. N° 13. Visualisation par microscopie électronique des exosomes. Les exosomes apparaissent sous forme de microvésicules membranaires de diamètre compris entre 50 et 100 nm (D'après (80)).

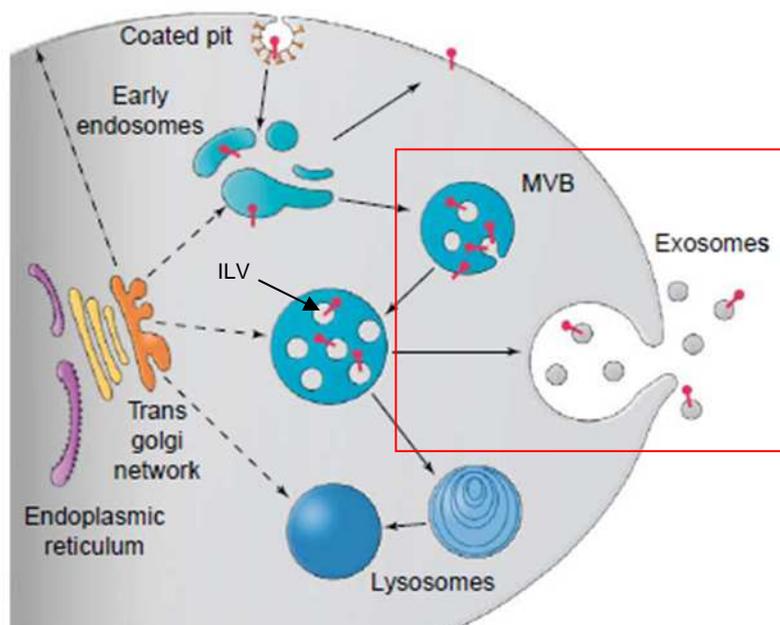


Fig. N° 14. Formation des corps multivésiculaires. Les corps multivésiculaires sont formés après l'invagination de la membrane limitante des endosomes primaires. Les vésicules intraluminales (ILVs) sont libérées sous forme d'exosomes après fusion des MVBs avec la membrane plasmique (D'après (80)).

L'analyse protéomique révèle que les exosomes contiennent de nombreuses protéines (151). Certaines sont communes aux exosomes sécrétés par différents types cellulaires et représentent des protéines impliquées dans les processus de maturation endosomale, dans ceux responsables de la formation des ILVs et de la fusion avec la membrane plasmique. A l'inverse, certaines protéines sont spécifiques du type cellulaire sécrétant ces exosomes. Enfin, des données très récentes indiquent que ces microvésicules peuvent contenir des acides nucléiques, que ce soient des ARN messagers (238), des ARN non codants (miRNA) (172) ou des séquences d'ADN (14).

3.2 Biogénèse

L'identification des mécanismes impliqués dans la formation des ILVs et dans la fusion des MVBs avec la membrane fait l'objet d'intenses recherches, sans qu'un consensus ne se dégage à ce jour (29). Dans certains modèles, les protéines incorporées dans les MVBs sont ubiquitinylées (182), interagissent avec le complexe protéique ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) pour être incorporées dans les ILVs (106) (171). Dans d'autres, l'ubiquitylation et la machinerie ESCRT ne semblent pas impliqués dans le ciblage

de certaines protéines vers les ILVs (226). Les mécanismes ESCRT indépendant pourraient mettre en jeu des lipides (céramide) et les tétraspanines (150) (232) (41). Les hypothèses actuelles évoquent une certaine hétérogénéité des MVBs ayant pour origine des différences dans leur biogénèse. En conséquence, les exosomes pourraient correspondre en fait à une famille de microvésicules provenant de la fusion de différents types de MVBs avec la membrane plasmique. Une fois à l'extérieur de la cellule, l'interaction exosome/cellule réceptrice pourrait mettre en jeu différents mécanismes, non exhaustifs : 1) interaction de type ligand-récepteur ; 2) adhésion puis fusion avec la membrane plasmique de la cellule réceptrice; et 3) internalisation de l'exosome par endocytose. De récents résultats font état de fusions membranaires (168), sans qu'il soit possible de dire si elles se produisent à la membrane plasmique et/ou dans des compartiments internes.

3.3 Fonctions biologiques

La sécrétion des exosomes a été initialement décrite il y a 25 ans, au cours de la différenciation des érythroblastes en érythrocytes (111). Il est maintenant clair que le rôle biologique de ces microvésicules n'est probablement pas restreint à l'élimination de matériels devenus superflus pour la cellule. Il s'avère que les exosomes pourraient jouer un rôle important dans les phénomènes de communication intercellulaire, en particulier au sein du système immunitaire (29). D'une façon générale, il semble que des exosomes transportant des antigènes et/ou des complexes peptides antigéniques/ MHC soient capables d'initier une réponse immunitaire, en interagissant soit avec les cellules dendritiques soit directement avec les lymphocytes T. Des exosomes produits par des cellules tumorales (107), ou par des cellules infectées par différents pathogènes, sont capables d'activité anti tumorale (ou anti infectieuse) (131). Un essai clinique en phase deux utilisant des exosomes dans le traitement du cancer du poumon à petites cellules est en cours à l'Institut Gustave Roussy (50). Il faut cependant noter que les exosomes tumoraux peuvent aussi présenter des activités immunosuppressives in vitro et in vivo. La difficulté à inhiber spécifiquement la formation et/ou la sécrétion des exosomes rend l'appréciation de leur rôle physiologique réel encore difficile à établir. Cependant, leur utilité comme biomarqueurs de différents états physiologiques ou pathologiques est avérée (114).

3.4 Prions et exosomes

Suite à une infection expérimentale ou naturelle, les prions se disséminent dans l'organisme et au sein des tissus infectés. Un certain nombre de cellules mobiles (cellules dendritiques, cellules sanguines) peuvent contribuer au transfert de l'agent infectieux au sein d'un tissu ou entre différents organes. Cependant, les mécanismes qui permettent le transfert de cellule à cellule des prions sont mal connus. D'un point de vue expérimental et dans différents types de cocultures entre des cellules infectées et des cellules saines, on constate le transfert de l'agent infectieux et sa multiplication dans les cellules réceptrices. Différents mécanismes peuvent être évoqués pour expliquer ce passage de cellule à cellule. La PrP anormale à la surface des cellules infectées pourrait interagir avec la PrP^c membranaire des cellules adjacentes et promouvoir ainsi le phénomène de conversion dans les cellules cibles et leur infection. Il faut cependant noter que le contact avec des cellules infectantes fixées est bien moins efficace que lorsque les cellules donneuses sont vivantes, ce qui suggère que le transfert nécessite une structure vivante (113) (167). Par ailleurs, dans des cocultures entre des cellules dendritiques infectées et des neurones en culture primaire, le transfert de la PrP anormale vers les neurones survient via l'établissement de nanotubes entre les deux types cellulaires (91). Cependant, d'autres mécanismes, mettant en jeu notamment la libération de formes acellulaires de prions pourraient participer à leur dissémination intercellulaire. En effet, une étude avait montré il y a une quinzaine d'années que le milieu de culture de cellules infectées par une souche murine (GT1/RML) était infectieux (197).

En collaboration avec le groupe de Graça Raposo à l'Institut Curie, le laboratoire a entrepris il y a quelques années de caractériser la nature des prions présents dans le milieu extracellulaire. En utilisant comme modèles deux lignées cellulaires (une d'origine rabique : RK13 (244), l'autre d'origine murine : MovS (12)) exprimant la PrP^c ovine, il a tout d'abord été montré que ces cellules sécrètent la PrP^c dans le milieu extracellulaire et que cette PrP^c est associée aux microvésicules exosomales. Lorsque ces cellules sont infectées par la souche de prions ovins PG127, les exosomes sécrétés sont infectieux et contiennent de la PrP^{res} (81). Suite à ce travail, la présence d'exosomes infectieux a été détectée dans le milieu de culture provenant des cellules GT1 infectées par la souche RML (241).

En résumé, ces données, même si elles sont parcellaires, suggèrent que les mécanismes impliqués dans la dissémination intercellulaire des prions sont divers, au moins dans les modèles de cellules en culture.

En tout état de cause, l'existence de formes libres de prions permet d'émettre l'hypothèse que des microvésiculaires membranaires pourraient servir de véhicule aux prions, participant ainsi à la dissémination de ces agents infectieux au sein des tissus voire dans l'organisme. En effet, de nombreux fluides biologiques infectieux (le sang (42), des liquides interstitiels (240), le lait (2), l'urine (178)) infectieux contiennent des microvésicules d'origine cellulaire et notamment des exosomes. Dans ce mémoire, nous qualifierons de formes libres (ou acellulaires) toute forme de prions non associée physiquement à des cellules, sans préjuger de leur nature. Ces formes, libérées à partir des cellules infectées, peuvent être ou non associées à des microvésicules.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'externalisation des prions dans le milieu extracellulaire, via leur association à des microvésicules d'origine cellulaire appelées exosomes.

Cette étude est menée à l'aide de cultures cellulaires chroniquement infectées par différentes souches infectieuses de prions. Pour chacun de ces paradigmes, nous avons tout d'abord déterminé la proportion d'agent infectieux sécrété par les cellules. Nous avons par ailleurs procédé à une analyse des propriétés biochimiques des formes anormales de la protéine PrP dans les microvésicules sécrétées et dans les cellules. Pour réaliser ce travail, nous avons au préalable mis au point et développé un test de titration en culture cellulaire permettant de s'affranchir de l'animal pour quantifier le pouvoir infectieux de nos différents échantillons.

METHODOLOGIE

METHODOLOGIE

Souches infectieuses

Les souches murines 22L, Fukuoka-1 et RML proviennent de souris tg20 en phase terminale de la maladie. La souche ovine PG127 provient de souris tg338 et la souche campagnol (176) (fournie par U. Agrimi) de campagnols. Le tissu cérébral de ces animaux est homogénéisé dans du 5% glucose. L'homogénat 10% (masse/volume) est ensuite aliquoté et stocké à -80°C.

Infection des cultures cellulaires

Les cellules RK13 sontensemencées dans des plaques à 12 puits. Pour induire l'expression de la protéine PrP^c (soit ovine, murine ou campagnol), les cellules sont exposées au milieu de culture contenant de la doxycycline (1 µg/ml). Deux jours plus tard, elles sont infectées par ajout de l'homogénat infectieux (homogénat cérébral à 10% dilué 20 fois dans le milieu de culture + dox). Cinq jours plus tard les cellules sont trypsinées et transférées dans une T-25 cm². Ces cultures sont ensuite propagées pendant plusieurs semaines (1 passage chaque semaine, dilution de la culture au quart). Toutes les cultures se font en présence de 1 µg/ml de dox.

Obtention des milieux conditionnés et des cellules provenant des cultures chroniquement infectées

Le protocole utilisé pour isoler les microvésicules et les exosomes a été déjà décrit (227). Chaque culture infectée estensemencée (dilution au 1/4) dans 8 T-150 cm² dans du milieu OptiMEM + 10% SVF + 1 µg/ml de dox (25 ml par T-150 cm²). Dans certaines expériences, le milieu de culture est préalablement déplété en microvésicules sériques par ultracentrifugation à 100 000 xg pendant 18h. Une semaine plus tard, les cellules et les milieux conditionnés sont collectés. Une partie des cellules est solubilisée dans un tampon NaDOC (10 ml/T-150 cm²). Ce lysat cellulaire est ensuite clarifié et congelé. Une partie des cellules est collectée par grattage, centrifugée et le culot cellulaire est resuspendu dans du glucose 5% (1-2 ml par T-150 cm²). Cette suspension cellulaire est ensuite homogénéisée dans des tubes contenant des billes. Les milieux de cultures (environ 200 ml) sont centrifugés à 2 000 xg 20 min puis à 10 000 xg 30 min à 4°C pour éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires.

Obtention de la fraction microvésiculaire P100K et purification des exosomes sur gradient de sucrose

Le milieu conditionné clarifié (CM) est ultracentrifugé à 100 000 xg 1h à 4°C dans des tubes de polyallomère dans un rotor SW32 (Beckman). Après élimination du surnageant, les culots sont resuspendus dans un grand volume de PBS (35 ml final) et ultracentrifugés à nouveau. Le culot final P100K est alors resuspendu dans 400-800 µl en PBS et stockée à -20°C.

Le culot P100K correspondant à 100 ml de MC est déposé au fond d'un tube pour un rotor SW32. Quatre ml des différentes solutions de sucrose (0.25M à 2M) sont ensuite successivement déposées. Après ultracentrifugation à 100 000 xg 18h à 4°C, 9 fractions de 4 ml sont prélevées à partir du haut et leur densité est déterminée à l'aide d'un réfractomètre. Les fractions sont ensuite stockées à -20°C. Le matériel de chaque fraction est concentré par précipitation avec 4 volumes de méthanol. Après 18h à -20°C et centrifugation à 20 000 xg pendant 30 min, les culots sont resuspendus dans un tampon adéquat.

Digestion des différents échantillons par la PK

La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par BCA. Chaque échantillon est ensuite incubé pendant 2h à 37°C en présence de PK, à raison de 2 µg de PK pour 500 µg d'échantillon protéique. Lorsque la concentration protéique des échantillons est trop faible pour être déterminée précisément (fractions P100K, fractions de gradient précipitées au méthanol), ils sont mélangés à un lysat protéique de concentration connue avant d'être traités à la PK. Après inactivation de la PK par 4 mM de Péfabloc, les échantillons sont centrifugés à 20 000 xg 30 min. Les culots sont alors analysés par immunoblotting.

Quantification du pouvoir infectieux des échantillons

Des cellules saines en plaques 6 puits sont exposées à 3 ml de milieu de culture (avec ou sans 1 µg/ml de dox selon les cas) contenant les différents échantillons pendant 1 semaine. Ce milieu est ensuite éliminé et remplacé par du milieu frais (+/- dox selon les cas). Trois semaines plus tard (le milieu est changé chaque semaine), les cultures sont solubilisées dans

le tampon NaDOC (1 ml/puits). La concentration protéique est déterminée et la détection de PrP^{res} dans ces lysats cellulaires est réalisée comme décrit précédemment.

Immunoblotting

Les échantillons ont été séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12% et transférés sur des membranes de PVDF. La PrP^c et PrP^{res} sont détectées à l'aide des anticorps monoclonaux Sha31 ou SAF32, la flotiline-1 par l'anticorps monoclonal anti-flotiline-1 (BD Bioscience) et EF1 α par l'anticorps monoclonal anti EF1 α (Millipore). Après incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, la luminescence est visualisée en utilisant le kit ECL+ (Amersham-GE Healthcare) et le système Bio-Rad VersaDoc. Dans le cas des anticorps SAF32, flotiline-1 et EF1 α la membrane est préalablement bloquée dans du TBST contenant 0,5% de lait demi-écrémé en poudre.

RESULTATS

RESULTATS-1

Développement d'une méthode de titration en culture cellulaire pour quantifier des souches de prions ovine, murine et de campagnol

Introduction

La titration des prions est un outil expérimental absolument déterminant dans l'étude des maladies à prions et de leurs agents. La méthode de référence pour détecter et quantifier les prions dans un échantillon donné consiste à inoculer différents lots d'animaux (en général des souris) par différentes dilutions de l'échantillon pour déterminer la quantité de matériel infectieux capable de transmettre la maladie à 50% des animaux. Cette méthode (end-point dilution) permet de calculer le nombre de doses létales capables de tuer 50% des animaux (LD50) dans l'échantillon étudié. Ces techniques de quantification chez l'animal (end-point dilution et méthode de la période d'incubation) s'échelonnent sur des durées importantes (6 mois à 2 ans), requièrent un nombre très important d'animaux, des installations et du personnel dédié, et coutent très cher.

Ces inconvénients sont un obstacle réel à l'avancée de la recherche sur les prions et l'identification de méthodes alternatives représenterait une avancée méthodologique considérable. Une méthode de titration en culture cellulaire a été développée à partir des années 2003 par le groupe de Charles Weissmann. Elle consiste à infecter des cultures cellulaires permissives avec des dilutions en série d'un échantillon infectieux. Ces cultures sont ensuite propagées pendant quelques semaines puis le nombre de cellules infectées est quantifié par un test de détection de la Pr^{Pres} (117).

Cette procédure (Scrapie Cell Assay, SCA) est 10 fois plus rapide et bien moins onéreuse (au moins 100 fois) que la titration chez l'animal de laboratoire. Sa sensibilité est bien entendu directement fonction du type de culture cellulaire réceptrice utilisée. L'utilisation de sous clones extrêmement permissifs de la lignée de neuroblastome N2a permet de titrer des souches de prions de souris (RML, 22L) avec une sensibilité similaire ou supérieure à celle de la titration en souris. La rapidité, la sensibilité et le caractère peu onéreux de ce type de titration ont donc levé un verrou méthodologique considérable, permettant à nombre de laboratoires de s'affranchir de l'utilisation des animaux.

Cependant, cette approche est strictement dépendante de l'identification de lignées cellulaires très permissives à la souche de prions que l'on souhaite titrer. En pratique, cette méthode est à ce jour essentiellement utilisée pour titrer certaines souches de prions de souris. En raison des limites inhérentes de la titration chez l'animal, la mise au point d'un test de détection cellulaire des prions ovins, de souris et de campagnol était absolument indispensable à l'étude de la sécrétion des prions dans le milieu extracellulaire que nous souhaitions mener. Nous avons utilisé la lignée cellulaire RK13 pour développer une procédure permettant la titration de prions d'origine ovine, murine, et de campagnol. Les cellules RK13 (lignée épithéliale dérivée de rein de lapin) ne sont naturellement pas permissives à la multiplication de ces souches de prions. Cependant, l'expression de la PrP^c ovine, de souris ou de campagnol confère à ces cellules la capacité à propager stablement des prions ovins, murins ou de campagnol, respectivement (244) (63).

Dans ce travail nous avons généré et/ou utilisé des cultures RK13 exprimant stablement et de façon inductible les PrP^c ovine, murine ou de campagnol (ovRK13, moRK13, voRK13, respectivement) pour mettre au point une procédure permettant la titration en culture cellulaire de différentes souches de prions. La publication 1 décrit les résultats obtenus pour la souche de prions ovins PG127 et pour une souche de prions murins (RML). Sont ensuite présentés les résultats obtenus pour 2 autres souches murines (22L et Fukuoka-1) et pour une souche de prions de campagnol.

A Simple, Versatile and Sensitive Cell-Based Assay for Prions from Various Species

Zaira E. Arellano-Anaya, Jimmy Savistchenko, Jacinthe Mathey, Alvina Huor, Caroline Lacroux, Olivier Andréoletti, Didier Vilette*

UMR INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) 1225, Interactions Hôte Agent Pathogène, Toulouse, France

Abstract

Detection and quantification of prion infectivity is a crucial step for various fundamental and applied aspects of prion research. Identification of cell lines highly sensitive to prion infection led to the development of cell-based titration procedures aiming at replacing animal bioassays, usually performed in mice or hamsters. However, most of these cell lines are only permissive to mouse-adapted prions strains and do not allow titration of prions from other species. In this study, we show that epithelial RK13, a cell line permissive to mouse and bank vole prion strains and to natural prion agents from sheep and cervids, enables a robust and sensitive detection of mouse and ovine-derived prions. Importantly, the cell culture work is strongly reduced as the RK13 cell assay procedure designed here does not require subcultivation of the inoculated cultures. We also show that prions effectively bind to culture plastic vessel and are quantitatively detected by the cell assay. The possibility to easily quantify a wider range of prions, including rodent experimental strains but also natural agents from sheep and cervids, should prompt the spread of cell assays for routine prion titration and lead to valuable information in fundamental and applied studies.

Citation: Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, Huor A, Lacroux C, et al. (2011) A Simple, Versatile and Sensitive Cell-Based Assay for Prions from Various Species. PLoS ONE 6(5): e20563. doi:10.1371/journal.pone.0020563

Editor: Jason C. Bartz, Creighton University, United States of America

Received: March 29, 2011; **Accepted:** May 3, 2011; **Published:** May 31, 2011

Copyright: © 2011 Arellano-Anaya et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was partly supported by a grant from ANR-08-MIEN-010 (France) and Z. Arellano was a recipient of a fellowship from Mexican CONACYT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: d.vilette@envt.fr

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies, or prion diseases, are fatal degenerative disorders of the central nervous system affecting both humans and animals. They are characterized by deposits of abnormal conformers of the PrP protein and the most widely accepted model of prion multiplication is that abnormally-folded PrP recruits and converts the host PrP into new abnormal forms [1,2,3]. Abnormal PrP is usually isolated from infected cells and tissues as a detergent-insoluble, protease-resistant, infectious form, named PrP^{res} [4,5]. However, accumulating evidence has recently highlighted the presence of other abnormal PrP forms beside large PrP^{res} aggregates [6,7,8,9,10,11,12,13,14], some of which may also be infectious.

The gold standard for detection and quantification of prion infectivity relies on inoculation of appropriate animals and determination of the time to terminal disease (incubation period method) or the dilution at which a given sample transmits disease to 50% of the inoculated animals (endpoint titration method). Over more than 3 decades, a huge number of titrations have been carried out and provided invaluable information in many aspects of prion research [15], *e.g.*, tissue distribution of prions. Yet bioassays are slow, rather imprecise, costly and require dedicated facilities and large numbers of animals. A major breakthrough was introduced by Weissmann and collaborators showing that some murine prion strains could be titrated in a cell-based assay named Standard Scrapie Cell Assay (SSCA) [16]. The SSCA uses neuroblastoma N2a subclones highly sensitive to 22L and RML

strains of mouse prions. In this paradigm, samples to be titrated are incubated with N2a cells grown in microtiter plates. To allow prions to multiply to a biochemically detectable level, all individual inoculated cultures are subpassaged at least 3 times. At the end of the assay, individual PrP^{res}-containing cells are immunodetected and automatically enumerated. The SSCA is at least as sensitive as bioassay, cheap, rapid and robust. Since then, cell-based titrations have been instrumental in various aspects of prion research, including the study and the evolution of prion strains [17,18], their kinetics of multiplication [19], their persistence in the environment [20], the effectiveness of prion decontamination/removal procedures [21,22], the spontaneous generation of prions [23] and infectivity fractionation [10,24,25]. However, applicability is restricted by the limited number of prion strains that can be successfully assayed in N2a cells and by the time-consuming cell culture work, even if SSCA may be suitable to automation.

In strong contrast to N2a cells that are only susceptible to mouse prion strains, RK13 cells expressing the appropriate PrP protein can propagate prions strains from different species [26]. Genetically engineered RK13 cells are permissive to several murine strains (22L, Chandler, Fukuoka-1, RML, MU-02) [27,28,29], to a bank vole strain [27] and to natural prion agents from sheep scrapie [30,31] and Chronic Wasting Disease [32]. Using sheep and mouse prions, we investigated whether RK13 cells are sensitive enough for cell-based detection assays of prion infectivity. We report on an experimental procedure that allows a simple, versatile, robust and sensitive detection of prions. More specifically, the cell culture work is strongly reduced compared with all

other prion cell assays as RK13 cultures do not require to be sub-passaged after challenge. Interestingly, we also show that infectivity is efficiently bound by cell culture plastic and quantitatively detected by our cell assay.

Results

Previous studies demonstrated that expression of ovine, elk, mouse or bank vole PrP in the RK13 cell line renders the resulting ovRK13, eRK13, moRK13 or voRK13 cells permissive to prions of the corresponding species, as assessed by accumulation of PrP^{res} and infectivity in the infected cultures [26]. By using doxycycline (dox)-regulatable PrP constructs, no detectable PrP^{res} accumulates when the cells do not express the transfected PrP, *i.e.*, when the experiments are performed in the absence of dox [27,30,31].

OvRK13 cell assay of sheep prions

To determine the sensitivity of the RK13 cell assay to sheep prion infection, we used PG127, a natural sheep scrapie isolate [33] propagated in *tg338* transgenic mice expressing the ovine PrP [34]. Infectivity of PG127 10% brain homogenate was assessed by intracerebral inoculation of 10-fold dilutions into *tg338* mice. The last dilution inducing clinical disease in 100% of the inoculated animals ($n = 6$) was 10^{-5} (the incubation period was 106 days \pm 6 days, mean \pm SD and the calculated infectious titer was $10^{7.7}$ LD₅₀/ml).

This PG127 10% brain homogenate was serially diluted in cell culture medium and 10-fold dilutions (from 10^{-4} to 10^{-6}) were applied to confluent ovRK13 cells in 6-well plates (one well per dilution). One week later, the infected media were removed and replaced by fresh medium. RK13 cells, like many other epithelial cell lines [35] can be kept for weeks as viable, confluent monolayers of polarized cells ([36–37] and Fig. 1A). The inoculated ovRK13 cultures were kept for 3 more weeks in the same wells (the medium being changed once a week) and detergent-solubilized, digested with proteinase K (PK) and assayed for PrP^{res} by immunoblotting. Transmission was scored positive when a typical PrP^{res} signal (Fig. 1B, left) was observed. Data from 16 independent transmissions carried out by 4 different operators over a 6 month-period demonstrated positive transmission for all cultures inoculated with PG127 dilutions down to 10^{-5} . No detectable PrP^{res} was observed in cultures inoculated with 10^{-6} dilutions. A representative immunoblot is shown in Fig. 1B, right. When the experiments were performed in the absence of dox, the inoculated cultures were PrP^{res} negative. This important control demonstrates that the detected PrP^{res} indeed results from *de novo* infection of the cells and not from residual PrP^{res} from the diluted inocula. In addition, immunoblotting was not sensitive enough to detect the very low amounts of PrP^{res} in the 10^{-5} dilutions (data not shown).

We also determined the sensitivity of our cell assay by analyzing the number of PrP^{res}-containing cells in the inoculated cultures. In this assay, 50,000 cells from the same experiment shown in Fig. 1B were filtered onto membranes of Elispot microtiter plates, the cells were then lysed, PK-digested and PrP^{res} was immunodetected after guanidine hydrochloride (GdnHCl) denaturation. The resulting spots, representing individual PrP^{res}-containing cells, are depicted in Fig. 1C, (left) and were automatically counted with an imaging equipment. Double-logarithmic plots of PG127 dilution values *versus* detected spots are shown in Fig. 1C, (right). In our conditions, the sensitivity of detection by Elispot was similar to that by immunoblotting, *i.e.*, positive transmission was observed for a 10^{-5} dilution of PG127 (42 ± 16 spots per 50,000 cells) and spot number was linear between two logs of dilutions. Consistent with immunoblot analysis (Fig. 1B), PrP^{res} from PG127 inoculum diluted beyond 10^{-3} was not detected in inoculated, non

dox-treated cultures. Although Elispot and immunoblotting were equally sensitive for detecting infected cultures in our experimental conditions, these two techniques have distinct characteristics that must be considered for their use in cell-based assays. The whole Elispot procedure, including trypsinization, filtration, immunolabelling of cells and counting is suitable to automatization, which is a major advantage for large scale titrations. Immunoblot detection is less rapid and more labor intensive but does not rely on sophisticated equipments and allows analytical assessment of PrP^{res}.

In cultures infected with low doses of inoculum, a very small number of cells has detectable PrP^{res} amounts ($42 \text{ cells} \pm 16 \text{ cells}$ out of 50,000 cells for 10^{-5} dilution of PG127), suggesting that infectivity is clustered in a very small number of highly infected cells. We thought that physical disruption of these cells would redistribute the prions, allowing infection of more cells during a second round of cell-based assay. To test this possibility, duplicate cultures of ovRK13 were inoculated, one series was lysed one month post-challenge while cells from each well from the 2nd series was homogenized and used to inoculate new ovRK13 cells for a 2nd round of cell assay. PrP^{res} levels after one or two rounds were analyzed by immunoblot. Typical results (Fig. 1D) revealed that inoculated cultures that appear negative in the first round (10^{-6} and 10^{-7}) contained infectivity that was detected upon a 2nd round of cell assay. Thus, performing two successive rounds dramatically improved (by 100-fold) the cell assay sensitivity. Infectivity in 10^{-7} dilutions, not detected upon inoculation into *tg338* mice, was clearly evidenced through the ovRK13 cell assay.

MoRK13 cell assay of mouse RML prions

To determine the sensitivity of the RK13-based assay for prion strains from other species, we chose RML, widely used in the mouse scrapie model. Serial 10-fold dilutions of RML 10% brain homogenate inoculated into *tg20* mice showed that the last dilution inducing clinical disease in all mice ($n = 6$) was 10^{-6} (the incubation period was 108 days \pm 6 days, mean \pm SD). Serial 10-fold dilutions of this RML 10% brain homogenate (from 10^{-4} to 10^{-8}) were inoculated to moRK13 cells. The cultures were solubilized 4 weeks later, PK-digested and analyzed for the presence of PrP^{res}. Out of 8 independent experiments, all cultures inoculated with 10^{-5} were PrP^{res} positive (a typical result is shown in Fig. 2A). In two experiments, a PrP^{res} signal was also detected in cells inoculated with the 10^{-6} dilution of RML. As observed with ovine prions, a second round of cell assay increased the sensitivity of RML detection by 100-fold (Fig. 2B), *i.e.*, inoculated cultures that appear negative in the first round (10^{-6} and 10^{-7}) contained infectivity that was detected upon a 2nd round of cell assay. Thus, 10^{-7} dilutions that do not transmit disease to *tg20* mice lead to a detectable infection of moRK13 cultures.

Cell assay of prions bound to plastic surface

Prions strongly bind to stainless steel wires and the contaminated wires efficiently transmit disease to mice [38,39,40] and infection to recipient cultured target cells [21]. Prion-coated wires, as models of contaminated surgical metal devices, were used to assess the effectiveness of decontamination procedures [38,39,41] [21] [42] [43,44]. The propensity of prions for steel surface binding led recently to a blood-based assay of vCJD [45]. There is also suggestion that prions bound to tissue culture plastic may elicit infection of seeded cultured cells [46]. To further examine this possibility, the 10% PG127 homogenate was diluted in complete culture medium and serial 10-fold dilutions were deposited for 2 h in tissue culture plastic wells. Since it would be also useful to detect prion infectivity in detergents buffers used in cell or tissue fractionation [6,10] or in PMCA reactions [47,48], the 10%

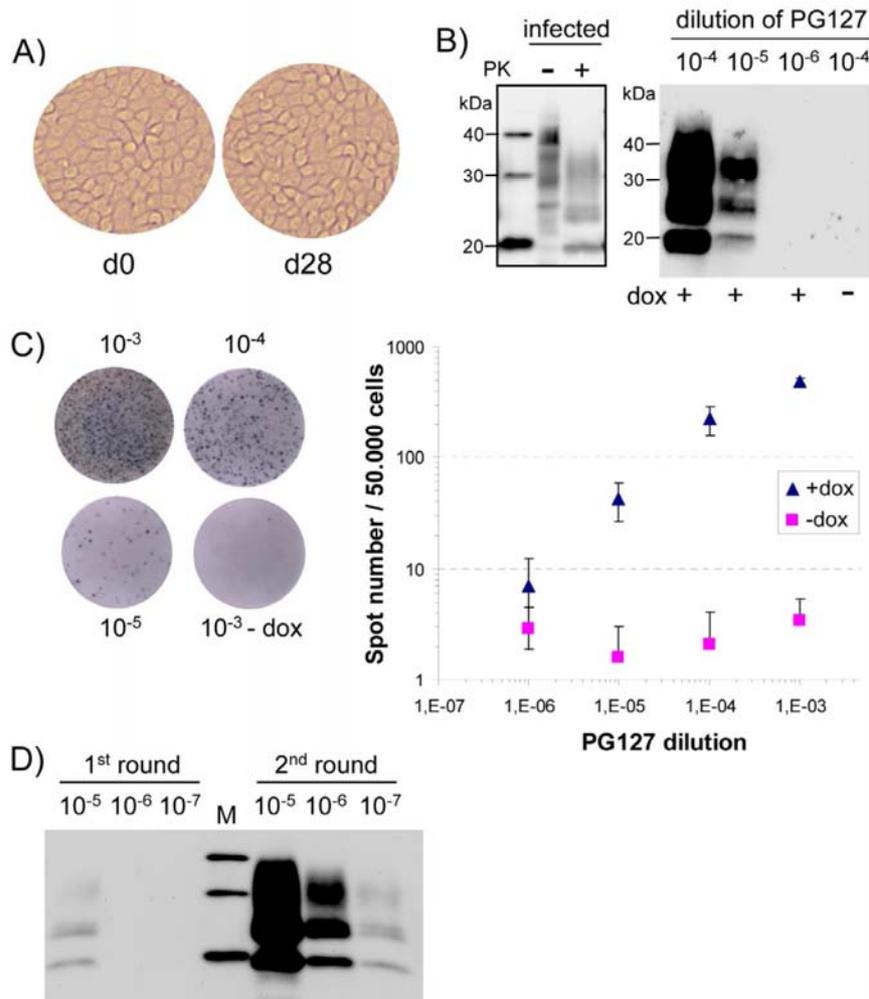


Figure 1. Sensitivity of ovRK13 cell assay for the detection of PG127 ovine prion. A) Morphology of inoculated ovRK13 cultures kept in the same wells during the whole cell assay procedure (d0 is the time of inoculation and d28 is 4 weeks later). B) Sensitivity of ovRK13 cell assay as assessed by immunoblotting. *Right panel:* Serial 10-fold dilutions (from 10⁻⁴ to 10⁻⁶) of infectious PG127 10% brain homogenate were inoculated to single wells of ovRK13 cells. Four weeks later, inoculated cultures were analyzed for PrP^{res} by immunoblotting. Positive transmission was detected for dilutions up to 10⁻⁵. No PrP^{res} was observed when inoculated ovRK13 did not express the ovine PrP (dox-). *Left panel:* total PrP from infected cells was analyzed before (-) or after (+) PK digestion to illustrate band shift upon PK proteolysis. M are standard molecular mass marker proteins (20, 30 and 40 kDa). C) Sensitivity of ovRK13 cell assay as assessed by Elispot. Replicate wells from the same experiment shown in Fig. 1B were analyzed. Left: representative wells of an Elispot plate showing spots given by ovRK13 cells exposed to the indicated dilutions of PG127. Right: double-logarithmic plot of spot number versus PG127 dilution shown for inoculations in the presence (triangle) or in the absence (square) of dox. For each dilution, the mean value ± SD of 8 measurements is shown. Background values for ovRK13 cells inoculated in the absence of dox are less than 4 spots per 50,000 cells. D) Sensitivity is strongly improved by 2 successive rounds of cell assay. Serial 10-fold dilutions (from 10⁻⁵ to 10⁻⁷) of infectious PG127 10% brain homogenate were inoculated to duplicate wells of ovRK13 cells. Four weeks later, PrP^{res} in a 1st set of inoculated cultures was isolated (1st round) while cultures of the 2nd set were homogenized to inoculate new ovRK13 cells. Four weeks later, PrP^{res} was isolated (2nd round) and all the samples were analyzed by immunoblotting. M are standard molecular mass marker proteins (20, 30 and 40 kDa). doi:10.1371/journal.pone.0020563.g001

PG127 was solubilized, serially diluted in Triton-DOC lysis buffer and deposited in plastic wells as well. The samples were then removed, the wells thoroughly washed with PBS and air-dried for 2 h. OvRK13 cells were seeded into these wells and infection was allowed to proceed for 4 weeks. We found (representative data from 4 experiments are shown in Fig. 3) that infection of cultures seeded in prion-coated wells was as efficient as that observed with the standard procedure, *i.e.*, cultures seeded in 10⁻⁵-coated wells were PrP^{res} positive. Interestingly, coating and cell detection of

detergent-solubilized prions were also very effective. These findings indicate that prions can be quantitatively detected by our cell assay upon binding to plastic surfaces.

Discussion

The cell-based assay designed in this study allows a simple, versatile, rapid, robust and sensitive detection of ovine-derived and mouse RML prions. Since RK13 cells are permissive to several

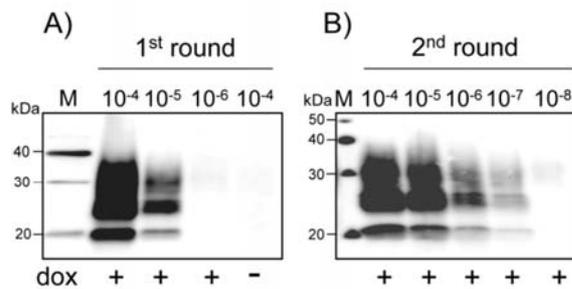


Figure 2. Sensitivity of moRK13 cell assay for the detection of RML mouse prions. Serial 10-fold dilutions (from 10^{-4} to 10^{-8}) of RML 10% brain homogenate were inoculated in duplicate to moRK13 cells and the inoculated cultures were proceeded as in figure 1D. PrP^{res} was analyzed by western blot after one (A) or two rounds (B) of cell assay. M are standard molecular mass marker proteins in kDa.
doi:10.1371/journal.pone.0020563.g002

natural sheep scrapie isolates [30,31], to 22L, Chandler, Fukuoka-1, RML and MU-02 strains of mouse prions [27,28,29], to a strain of bank vole prions [27], the procedure described here should be useful for an easy and sensitive detection of a wide range of prions. Notably, it should improve and/or facilitate the recently reported RK13-based titration of Chronic Wasting Disease agent [32]. Performing two successive rounds of infection increased the sensitivity of the ovRK13 and moRK13 cell-based assays by a 100-fold, allowing detection of infectivity in 10^{-7} dilutions of 10% PG127 and RML homogenates, albeit at the cost of prolonging the assay time. In that case, sensitivity of the RK13 cell assay appears similar to that of the mouse bioassay. The amount of 10% PG127 or RML brain homogenates to infect ovRK13 or moRK13 cells, respectively, was $3 \times 10^{-4} \mu\text{l}$ ($3,000 \mu\text{l} \times 10^{-7}$). This is very similar to the lower amount of 10% PG127 or RML that transmits disease to 100% of *tg338* or *tg20* mice, *i.e.*, $2 \times 10^{-4} \mu\text{l}$ ($20 \mu\text{l} \times 10^{-5}$). Considering that $3,000 \mu\text{l}$ of PG127 at a 10^{-5} dilution resulted in 42 spots (cell units), there are about 1.3×10^6 cell units/ml of 10% PG127. Since a second round increases the sensitivity by about 100-fold, we estimate that 10% PG127 contains about 1.3×10^8 cell units/ml, a value closed to the titer obtained by *tg338* bioassay ($10^{7.7}$ LD₅₀/ml). The accurate comparison of moRK13 sensitivity to that of other cell lines widely used for mouse prion titration (*e.g.*, PK1, CAD5, LD9) would require the use of the same RML preparations. However, these cell lines led to a detectable infection for RML dilutions up to 10^{-5} – 10^{-6} (10^{-6} – 10^{-7} in the designation's authors as their 10% RML brain homogenate was set as the 10^{-1} dilution) [18,49]. This suggests that moRK13 cells have a sensitivity roughly similar to these lines.

In sharp contrast to the other cell lines previously used to titrate mouse [18] and sheep prions [50], no subcultivation of inoculated RK13 epithelial cultures is required before analysis. This unique feature is a crucial operational advantage as serial passaging of inoculated cultures is very time-consuming and costly, especially when assaying large numbers of samples. For example, inoculated MovS cultures [51] have to be passaged 8 times for optimal PG127 detection [50]. In addition, the slow down of cell division may participate in high sensitivity of the assay as cell division was reported to decrease steady state levels of PrP^{res} [52]. In contrast with N2a and other sublines whose susceptibility is not preserved during prolonged subcultivation [18], we did not observe any decline in sensitivity when ovRK13 and moRK13 cells were serially passaged for six months (*i.e.*, 24 serial 1:4 splits, longer periods of subcultivation were

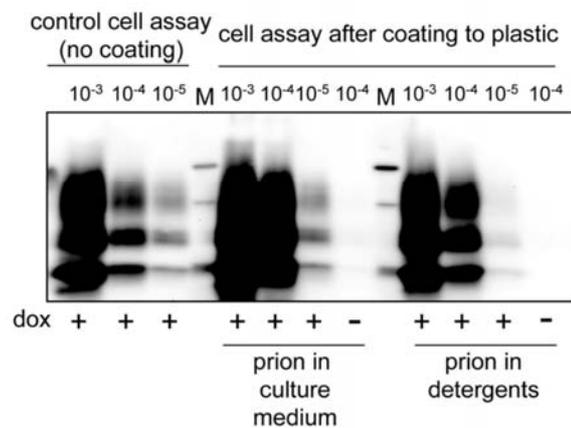


Figure 3. Cell assay detection of plastic-bound prions. Infectivity from 10% PG127 brain homogenate was diluted either in culture medium (prion in culture medium) or in Triton-DOC lysis buffer (prion in detergents) and incubated for 2 h into plastic wells. Samples were removed, wells were thoroughly rinsed and air-dried. OvRK13 cells were then seeded in the presence (+) or in the absence (-) of dox. PrP^{res} in the cultures was analyzed 4 weeks later by immunoblotting and compared to PrP^{res} levels in ovRK13 cultures subjected to the standard cell assay (no coating). M are standard molecular mass marker proteins (20, 30 and 40 kDa).
doi:10.1371/journal.pone.0020563.g003

not systematically explored). Such stability contributes to the ease-of-use of the RK13 cell assay.

The binding of prions onto a plastic surface is a further example of prion avidity for various surfaces including steel [38,40] and soil particles [53]. This amazing propensity of prions to bind solid surfaces and/or particles is an efficient and inexpensive mean to concentrate prions as illustrated by the detection of steel-bound vCJD blood prions [45]. How prions adsorb to these surfaces is unknown but there is compelling evidence that bound prions remain infectious [20,21,38,54]. Further studies are underway to establish whether small amounts of prions in biological fluids can be concentrated onto plastic surface and be detected by our cell assay.

Over the recent past years, cell-based assays have proven to be valuable tools for prion detection and titration. We believe that our easy to handle and labor non intensive RK13-based assay will further contribute to routine detection of prions and may help to substitute cultured cells for animal bioassay in various aspects of prion research. In addition, the remarkable binding property of prions to tissue culture plastic should allow routine detection of prion infectivity in samples that are toxic for cells, including those from PMCA reactions.

Materials And Methods

Ethics statement

All animal experiments were performed in compliance with our institutional and national guidelines, in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC. The experimental protocols were approved by the INRA Toulouse/ENVT ethics committees, and were performed in the approved animal facilities (C 31 555 27) of author's institution by an agreed experimenter (311055503).

Cells

OvRK13 cells expressing the ovine PrP protein (the Rov9 clone) have been previously described [31]. We generated moRK13 cells

expressing the mouse PrP (allele a) as described previously [27] and the cell clone used in this study was mo1. The cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in Opti-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 10 µg/ml streptomycin. To induce the expression of ovine or mouse PrP, 1 µg/ml doxycycline (Sigma-Aldrich) was added to the culture medium.

Prion agents

The sheep isolate (PG127)[33], propagated once in sheep, was amplified in *tg338* mice [34] and prepared as described previously [6]. The mouse RML strain was propagated in C57BL/6 mice. At the terminal stage, brains were homogenized at 10% (wt/vol) in 5% sterile glucose using a high-speed homogenizer (TeSeE Precess 48 system).

Cell-based assay procedure

OvRK13 or moRK13 cells were seeded in six-well plates (TPP) with or without doxycycline treatment. When confluent, the cultures were exposed to 3 ml of culture medium containing serial 10-fold dilutions of the PG127 or RML 10% infectious brain homogenates. One week later, the media were renewed. Infection was allowed to proceed for 3 more weeks with one medium change per week. At the end, the cells were either solubilized for immunoblot analysis of PrP^{res} or processed for Elispot detection of PrP^{res}-containing cells. Alternatively, the cells were trypsinized, the cell pellets from each well were resuspended in 500 µl of 5% sterile glucose and were homogenized with the high-speed homogenizer. Half of the resulting cell extracts was used to inoculate ovRK13 or moRK13 cells for a second round of cell assay.

Coating of prions to plastic

Three µl of 10% PG127 brain homogenate (this corresponds to the amount of PG127 in 3 ml of a 10⁻³ dilution) were diluted into 250 µl of culture medium and then serially diluted 10-fold into 250 µl of culture medium. Alternatively, the same amount of PG127 was diluted into 250 µl of normal sheep brain proteins (1 mg/ml) solubilized in Triton-DOC lysis buffer and further diluted 10-fold into the same buffer. All the samples (250 µl) were incubated into pre-wet polystyrene wells of six-well plates (TPP) at room temperature with occasional agitation. Two hours later, the samples were removed, the wells were washed twice with 3 ml of PBS and air dried for 2 h. OvRK13 cells (300,000 cells in 3 ml of culture medium with or without dox, as indicated) were seeded into the wells and the cultures were kept for 4 weeks with one medium change every week.

Immunoblotting detection of PrP^{res} in inoculated cultures

Cell cultures were rinsed with cold PBS and solubilized for 10 min at 4°C in Triton-DOC lysis buffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 0.5%

Triton-X100, 0.5% sodium deoxycholate). The lysates were clarified by low speed centrifugation (425 X g, 1 min) and cellular proteins in the post-nuclear supernatants were quantified by bicinchoninic acid (BCA, Pierce). Digestion of 750 µg – 1,000 µg of proteins with PK (recombinant grade, Roche) was performed for 2 h at 37°C with a mass ratio of 4 µg of PK per mg of cellular proteins and the reaction was stopped by addition of Pefabloc (Sigma-Aldrich) to 4 mM. PK-digested samples were centrifuged for 30 min at 20,000 X g and pellets were analyzed by western blot. Samples separated by 12% SDS-PAGE electrophoresis were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad). The western blots were stained for PrP with Sha31 mAb [55]. Filters were developed using an ECL+ reagent kit (Amersham-GE Healthcare) and visualized with a Bio-Rad VersaDoc imaging system.

Elispot detection of infected cells

The procedure has been described in detail [56]. Trypsinized cells were resuspended in PBS and 50,000 cells were aspirated into each well of a Multiscreen 96-well filter plate (Millipore). The plate was incubated at 50°C for 1 h. Dried wells were incubated for 30 min at 37°C with 20 µg/ml of PK in Triton-DOC lysis buffer and digestion was stopped with 4 mM Pefabloc. Proteins were denatured with GdnHCl 8 M in PBS for 10 min. Filters were saturated for 1 h with 0.5% BSA in tris-buffered saline with tween20 (TBST), incubated with Sha31 mAb and then with peroxidase-coupled secondary antibody. Bound antibodies were visualized with TMB stabilized substrate for horseradish peroxidase (Promega) and spots were detected and enumerated with an Elispot reader system (AID GmbH).

Mice bioassays

10% PG127 or 10% RML brain homogenates were serially 10-fold diluted into Opti-MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 10 µg/ml streptomycin, and 20 µl were inoculated intracerebrally into *tg338* [34] or *tg20* [57] mice, respectively. Mice were then clinically monitored until the occurrence of scrapie clinical signs, at which time they were euthanized.

Acknowledgments

We thank J. Grassi (CEA, Saclay, France) for Sha31 mAb, H. Laude and J.L. Vilotte (INRA, Jouy-en-Josas, France) for *tg338* mice, and C. Weissmann (now at the Scripps Research Institute, Florida, United States) for *tg20* mice. We thank M.C. Miquel and P. Leblanc for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ZEA-AJM AH DV. Performed the experiments: ZEA-AJSJM AH CL OA DV. Analyzed the data: ZEA-AJSJM AH CL OA DV. Wrote the paper: DV.

References

- Collinge J, Clarke AR (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318: 930–936.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13363–13383.
- Weissmann C (2004) The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2: 861–871.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309–1311.
- Prusiner SB (1992) Chemistry and biology of prions. *Biochemistry* 31: 12277–12288.
- Arellano Anaya ZE, Savitschenko J, Massonneau V, Lacroix C, Andreoletti O, et al. (2011) Recovery of small infectious PrPres aggregates from prion-infected cultured cells. *J Biol Chem* 286: 8141–8148.
- D'Castro L, Wenborn A, Gros N, Joiner S, Cronier S, et al. (2010) Isolation of proteinase K-sensitive prions using pronase E and phosphotungstic acid. *PLoS One* 5: e15679.
- Pastrana MA, Sajjani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, et al. (2006) Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* 45: 15710–15717.
- Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, Horonchik L, Yedidia Y, et al. (2002) Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* 41: 12868–12875.
- Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J, et al. (2010) The Physical Relationship between Infectivity and Prion Protein Aggregates Is Strain-Dependent. *PLoS Pathog* 6: e1000859.
- Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, et al. (2008) Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* 416: 297–305.
- Pirisiu L, Di Bari M, Marcon S, Vaccari G, D'Agostino C, et al. (2010) A new method for the characterization of strain-specific conformational stability of protease-sensitive and protease-resistant PrP. *PLoS One* 5: e12723.

13. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, et al. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4: 1157–1165.
14. Thackray AM, Hopkins L, Bujdosó R (2007) Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem J* 401: 475–483.
15. McLean AR, Bostock CJ (2000) Scrapie infections initiated at varying doses: an analysis of 117 titration experiments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1043–1050.
16. Klotz PC, Stoltz L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C (2003) A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11666–11671.
17. Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C (2010) Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science* 327: 869–872.
18. Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, et al. (2007) Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20908–20913.
19. Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J (2011) Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* 470: 540–542.
20. Genovesi S, Licita L, Sequi P, Andrighetto I, Sorgato MC, et al. (2007) Direct detection of soil-bound prions. *PLoS One* 2: e1069.
21. Edgeworth JA, Jackson GS, Clarke AR, Weissmann C, Collinge J (2009) Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3479–3483.
22. Sowemimo-Coker SO, Demczyk CA, Andrade F, Baker CA (2010) Evaluation of removal of prion infectivity from red blood cells with prion reduction filters using a new rapid and highly sensitive cell culture-based infectivity assay. *Transfusion* 50: 980–988.
23. Edgeworth JA, Gros N, Alden J, Joiner S, Wadsworth JD, et al. (2010) Spontaneous generation of mammalian prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14402–14406.
24. Sun R, Liu Y, Zhang H, Manuclidis L (2008) Quantitative recovery of scrapie agent with minimal protein from highly infectious cultures. *Viral Immunol* 21: 293–302.
25. Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G, et al. (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 100: 603–615.
26. Vilette D (2008) Cell models of prion infection. *Vet Res* 39: 10.
27. Courageot MP, Daude N, Nonno R, Paquet S, Di Bari MA, et al. (2008) A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* 89: 341–347.
28. Lawson VA, Vella IJ, Stewart JD, Sharples RA, Klemm H, et al. (2008) Mouse-adapted sporadic human Creutzfeldt-Jakob disease prions propagate in cell culture. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2793–2801.
29. Vella IJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, et al. (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211: 582–590.
30. Neale MH, Mountjoy SJ, Edwards JC, Vilette D, Laude H, et al. (2010) Infection of cell lines with experimental and natural ovine scrapie agents. *J Virol* 84: 2444–2452.
31. Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madeline MF, Vilotte JL, 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.
32. Bian J, Napier D, Khaychuk V, Angers R, Graham C, et al. (2010) Cell-based quantification of chronic wasting disease prions. *J Virol* 84: 8322–8326.
33. Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, et al. (2001) Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol* 75: 5977–5984.
34. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, et al. (2005) A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16031–16036.
35. Mostov K, Su T, ter Beest M (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 5: 287–293.
36. Paquet S, Sabuncu E, Delaunay JL, Laude H, Vilette D (2004) Prion infection of epithelial Rov cells is a polarized event. *J Virol* 78: 7148–7152.
37. Paquet S, Langevin C, Chapuis J, Jackson GS, Laude H, et al. (2007) Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *J Gen Virol* 88: 706–713.
38. Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, et al. (2001) Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med* 7: 679–684.
39. Lemmer K, Mielke M, Kratzel C, Joncic M, Oezel M, et al. (2008) Decontamination of surgical instruments from prions. II. In vivo findings with a model system for testing the removal of scrapie infectivity from steel surfaces. *J Gen Virol* 89: 348–358.
40. Zobeley E, Flechsig E, Cozzio A, Enari M, Weissmann C (1999) Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med* 5: 240–243.
41. Edgeworth JA, Sicilia A, Lincan J, Brandner S, Jackson GS, et al. (2011) A standardised comparison of commercially available prion decontamination reagents using the standard steel binding assay. *J Gen Virol* 92: 718–726.
42. Jackson GS, McKintosh E, Flechsig E, Prodromidou K, Hirsch P, et al. (2005) An enzyme-detergent method for effective prion decontamination of surgical steel. *J Gen Virol* 86: 869–878.
43. Lawson VA, Stewart JD, Masters CL (2007) Enzymatic detergent treatment protocol that reduces protease-resistant prion protein load and infectivity from surgical-steel monofilaments contaminated with a human-derived prion strain. *J Gen Virol* 88: 2905–2914.
44. Fichet G, Comoy E, Duval C, Antloga K, Dehen C, et al. (2004) Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 364: 521–526.
45. Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A, Tavares P, Beck J, et al. (2011) Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 377: 487–493.
46. Baron GS, Magalhaes AC, Prado MA, Caughey B (2006) Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. *J Virol* 80: 2106–2117.
47. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121: 195–206.
48. Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J (2010) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327: 1132–1135.
49. Karapetyan YE, Saa P, Mahal SP, Sferazza GF, Sherman A, et al. (2009) Prion strain discrimination based on rapid in vivo amplification and analysis by the cell panel assay. *PLoS One* 4: e5730.
50. You B, Aubin JT, Le-Hir G, Arzel A, Laude H, et al. (2010) In vitro infectivity assay for prion titration for application to the evaluation of the prion removal capacity of biological products manufacturing processes. *J Virol Methods* 164: 1–6.
51. Archer F, Bachelin C, Andreoletti O, Besnard N, Perrot G, et al. (2004) Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol* 78: 482–490.
52. Ghaemmaghami S, Phuan PW, Perkins B, Ullman J, May BC, et al. (2007) Cell division modulates prion accumulation in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17971–17976.
53. Saunders SE, Bartelt-Hunt SL, Bartz JC (2008) Prions in the environment: occurrence, fate and mitigation. *Prion* 2: 162–169.
54. Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, et al. (2006) Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog* 2: e32.
55. Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, et al. (2005) Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* 280: 11247–11258.
56. Mahal SP, Demczyk CA, Smith EW, Jr., Klotz PC, Weissmann C (2008) Assaying prions in cell culture: the standard scrapie cell assay (SSCA) and the scrapie cell assay in end point format (SCEPA). *Methods Mol Biol* 459: 49–68.
57. Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, et al. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* 15: 1255–1264.

Obtention de cellules RK13 exprimant la PrP^c du campagnol (voRK13)

La procédure est similaire à celle utilisée dans la publication 1 pour obtenir des clones cellulaires exprimant de façon stable la PrP^c murine. Brièvement, après transfection par un vecteur codant pour la PrP^c de campagnol sous contrôle d'un promoteur inducible par la dox, plusieurs clones cellulaires ont été sélectionnés et caractérisés. Un de ces clones (cgF) a été sélectionné pour être utilisé dans les expériences qui vont être décrites. La figure N° 15 montre l'induction de l'expression de la protéine PrP^c de campagnol dans ce clone de cellules voRK13, soit par immunoblot, soit par immunofluorescence.

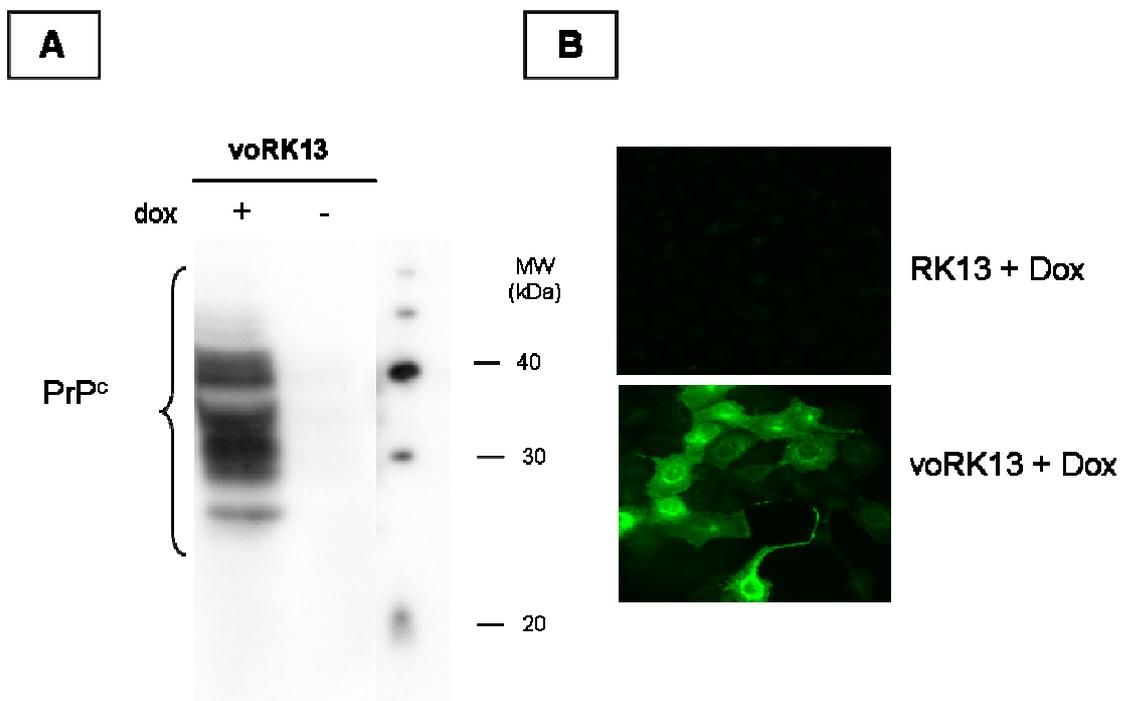


Fig. N° 15. Expression de la PrP^c de campagnol dans les cellules voRK13. Des cellules RK13 ont été transfectées avec le gène qui code pour la protéine PrP^c de campagnol sous contrôle d'un promoteur dox-dépendant. **A.** En présence de doxycycline (+dox), les cellules voRK13 expriment la protéine PrP^c. Des contrôles négatifs (cellules voRK13 cultivées en absence de doxycycline, -dox) sont montrés. L'immunodétection de la PrP^c par western blot a été faite en utilisant l'anticorps SAF32 dilué au 1 :5 000. **B.** Les cellules voRK13 ont été visualisées au microscope à fluorescence. Les cellules RK13 non transfectées n'expriment pas la PrP^c de façon détectable (contrôle négatif). L'immunofluorescence a été faite avec l'anticorps SAF32 (dilué au 1 :1 000) et un anticorps anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor 488 (au 1 :2 000).

Quantification de la souche de prions de campagnol et des souches murines 22L et Fukuoka-1 par titration cellulaire

Les cellules voRK13 ont été exposées à des dilutions en série de la souche infectieuse de campagnol (dilutions de 10^{-3} à 10^{-5} de l'homogénat cérébral infectieux à 10%). En parallèle, nous avons inoculé des cellules moRK13 avec deux autres souches de prions murins, 22L et Fukuoka-1. Quatre semaines plus tard, la Pr^{Pres} produite dans chacune de ces cultures a été analysée. Les résultats obtenus (Figure N°16) montrent que la Pr^{Pres} s'accumule dans les cultures inoculées avec la souche de campagnol et avec les souches 22L et Fukuoka-1. Comme observé préalablement avec la souche ovine et la souche RML (publication 1), la quantité de Pr^{Pres} produite par les cellules est dépendante de la charge infectieuse initialement utilisée pour infecter ces cultures. La quantité de Pr^{Pres} qui s'accumule dans des cultures infectées par différents échantillons pourra donc être utilisée pour estimer le pouvoir infectieux de ces échantillons.

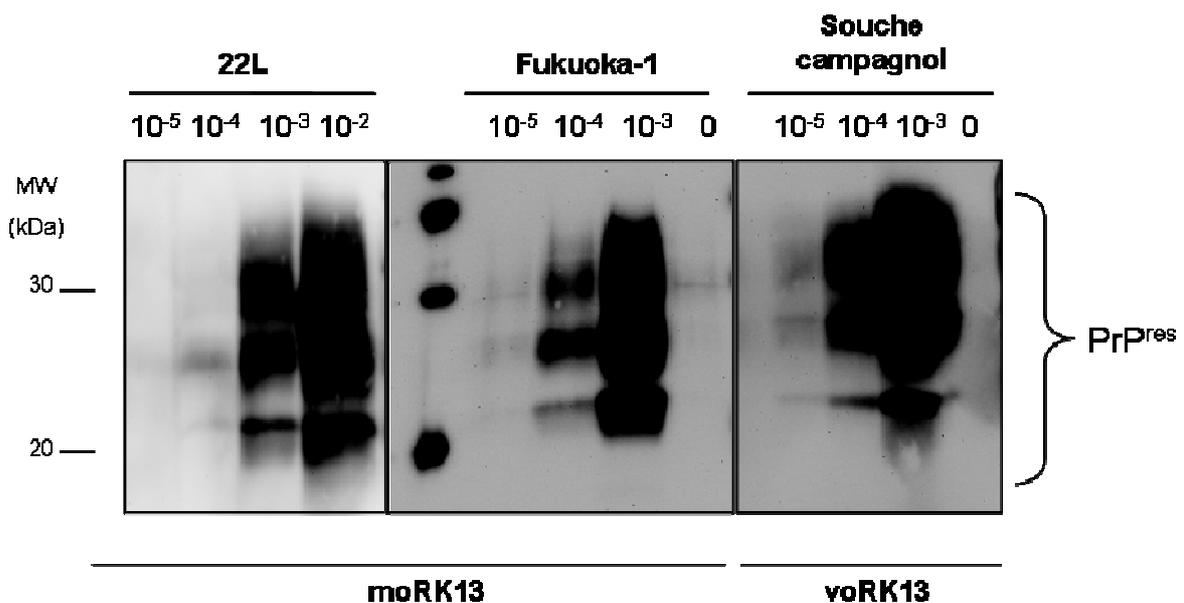


Fig. N° 16. Quantification des souches 22L, Fukuoka-1 et de campagnol par test cellulaire. Les cellules moRK13 et voRK13 ont été exposées à différentes quantités d'homogénats infectieux (dilutions en série au 1:10 d'un homogénat cérébral à 10%). Quatre semaines plus tard, ces cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires digérés par la PK et centrifugés. La Pr^{Pres} des culots a été analysée par immunoblot à l'aide de l'anticorps Sha31 (1 :10 000).

Conclusions

Au cours de ce travail nous avons généré différents clones de cellules RK13 exprimant chacun la PrP^c d'une espèce hétérologue (ovine, murine, campagnol). Nous avons ensuite développé un test cellulaire permettant, en un mois et sans avoir recourt à l'inoculation à l'animal, la détection et la titration d'une souche de prions ovins (PG127), de trois souches murines (22L, Fukuoka-1 et RML) et d'une souche de prions de campagnol.

Ce test cellulaire basé sur l'utilisation des cellules RK13 présente de nombreux avantages. Il est extrêmement robuste et très facile à mettre en œuvre. En effet, les cellules RK13 sont des cellules faciles à cultiver dont la sensibilité à l'infection est bien plus stable au cours des passages que les sous clones de cellules N2a qu'il faut très régulièrement sous cloner à nouveau sous peine de perte importante de leur sensibilité. En outre, il n'est pas nécessaire de propager les cultures cellulaires RK13 après leur inoculation, contrairement aux lignées cellulaires utilisées actuellement qui doivent être passées plusieurs fois par semaine durant plusieurs semaines avant de procéder à la détection. D'un point de vue opérationnel, ce point est extrêmement important car le travail de culture cellulaire en est drastiquement simplifié et le coût diminué. Pour deux souches (la souche ovine PG127 et la souche murine RML), la sensibilité du test cellulaire a été comparée à celle de l'animal. Les données indiquent que dans sa version longue (deux mois), ce test cellulaire présente une sensibilité comparable à celle de l'animal. La mise au point et le développement de cet outil vont nous permettre maintenant d'aborder l'étude de la sécrétion de ces agents infectieux par les cellules infectées.

RESULTATS-2

Etude de l'externalisation des prions dans le milieu extracellulaire

Stratégie expérimentale

Pour obtenir des cultures de cellules RK13 infectées par les différentes souches de prions (ovRK13/PG127, moRK13/22L, moRK13/Fukuoka-1, voRK13/campagnol) les cellules non infectées ont été exposées à de l'homogénat infectieux puis ont été propagées pendant au moins un mois à raison d'un passage par semaine ce qui permet d'obtenir une quantité suffisante de cellules stablement et chroniquement infectées. A ce stade, et une semaine après l'ensemencement, le milieu conditionné de chaque culture (200 ml, correspondant à 8 T-150 cm²) est collecté et soumis à deux centrifugations à basses vitesses pour éliminer les débris et les cellules mortes. Ce milieu conditionné (MC) est alors ultracentrifugé (100 000 xg, 1h). Le culot est resuspendu dans un grand volume de PBS et ultracentrifugé à nouveau à 100 000 xg pour générer la fraction microvésiculaire (P100K) qui est resuspendue dans un petit volume de PBS. Parallèlement, les cellules de la culture sont collectées, centrifugées et le culot cellulaire est homogénéisé dans un tampon physiologique. A ce stade, on procède à la quantification du pouvoir infectieux de la fraction cellulaire, du milieu conditionné et de la fraction microvésiculaire (voir ci-après). La fraction microvésiculaire est ensuite ultracentrifugée à l'équilibre dans un gradient de sucrose (100 000 xg, 18h) afin d'isoler les fractions contenant les exosomes. Le pouvoir infectieux de chacune des fractions du gradient est alors déterminé, ainsi que son contenu en Pr^{Pres}. Cette démarche expérimentale est schématiquement résumée dans la figure N°17.

Toutes les quantifications infectieuses sont réalisées en utilisant les tests cellulaires décrits précédemment (publication 1). Dans chaque cas, plusieurs dilutions des fractions à tester (fractions cellulaires, milieu conditionné, fractions microvésiculaires, exosomes purifiés par gradient) sont utilisées pour infecter les cellules réceptrices (ovRK13, moRK13 ou voRK13 en fonction de la souche de prions analysée). En parallèle, certaines des fractions sont inoculées à des cultures n'exprimant pas la Pr^{Pc} (cultivées en absence de dox) qui ne peuvent donc pas s'infecter. Ce contrôle important permet de s'assurer que la Pr^{Pres} détectée reflète réellement l'infection des cellules et ne correspond pas à la Pr^{Pres} présente dans les fractions infectieuses. Un mois plus tard, ces cultures sont solubilisées, la Pr^{Pres} est isolée et analysée par immunoblot. La comparaison des quantités de Pr^{Pres} dans toutes ces cultures permet d'estimer le pouvoir infectieux des différentes fractions.

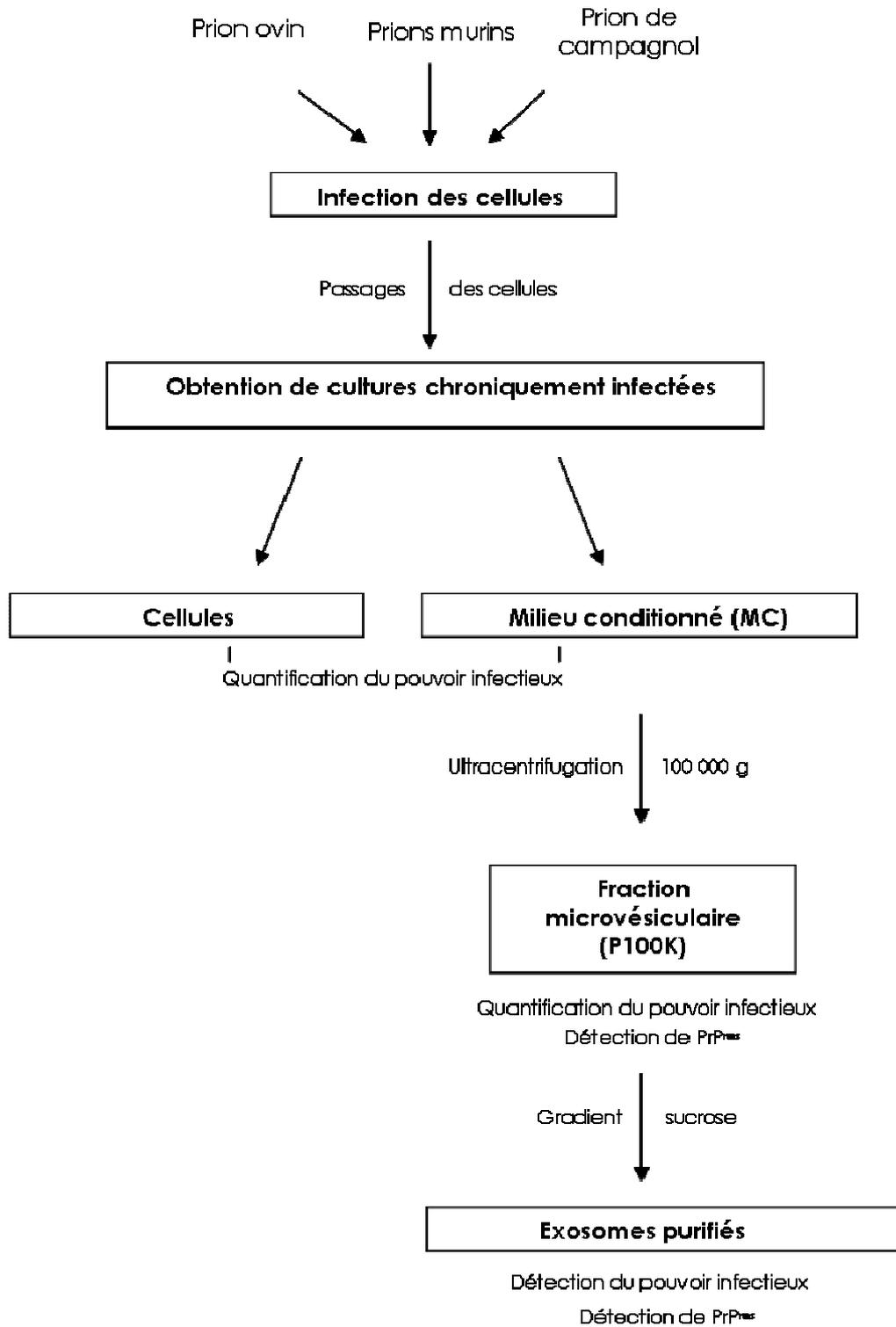


Fig. N° 17. Schéma général de travail

Quantification de la sécrétion des prions ovins PG127

Les résultats décrits ici proviennent d'expériences menées sur trois cultures ovRK13, infectées et propagées de façon indépendante. Le milieu de culture conditionné (MC) par les cellules ovRK13 infectées par la souche ovine PG127 a été recueilli. Pour déterminer son éventuel pouvoir infectieux, différentes quantités (100 µl, 250 µl et 500 µl) de ce MC ont été incubées avec des cellules ovRK13 saines. Un mois plus tard, les cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires ont été traités à la protéinase K (PK) et centrifugés. Les culots ont été analysés par immunoblot pour détecter l'éventuelle présence de Pr^{Pres} (PrP^{sc} insoluble et PK-résistante). La présence de Pr^{Pres} dans les cultures exposées au MC indique clairement que le milieu de culture est infectieux (Figure N°18).

Les cellules infectées utilisées pour obtenir le MC ont été homogénéisées, et différentes quantités (quantité de cellules correspondant à 5 µl, 50 µl et 500 µl de MC, sachant que les cellules d'une T-150 cm² correspondent à 25 ml de MC) ont été inoculées aux cellules ovRK13 afin d'en déterminer le pouvoir infectieux. L'analyse comparée de la Pr^{Pres} des cultures infectées par la fraction cellulaire et le MC de trois expériences (les résultats de chaque expérience individuelle sont montrés dans la figure N°29) indique qu'environ 4% ± 1,3% (moyenne ± sem) des prions PG127 sont sécrétés dans le milieu de culture (Figure N° 18 ; les cellules correspondant à 5 µl de MC sont aussi infectieuses que 100 µl de MC). Pour déterminer si le pouvoir infectieux du MC était associé à la fraction microvésiculaire, le milieu conditionné a été ultracentrifugé à 100 000 xg pendant 1h et le surnageant a été utilisé pour infecter les cellules réceptrices. Les résultats obtenus indiquent que le MC est beaucoup moins infectieux après ultracentrifugation (perte estimée à environ 80%), ce qui suggère que l'essentiel des prions extracellulaires auraient sedimenté à 100 000 xg (Figure N°18).

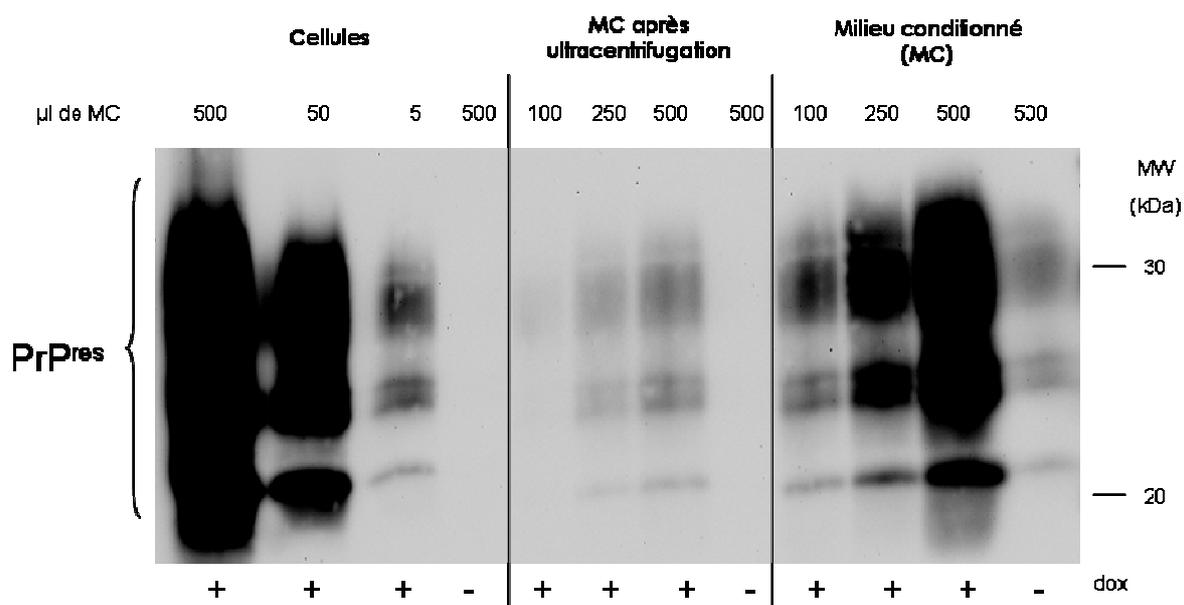


Fig. N° 18. Le milieu de culture provenant des cellules ovRK13/PG127 est infectieux. Différentes quantités de milieu conditionné (MC) avant ou après ultracentrifugation et différentes quantités de cellules ovRK13 infectées ont été inoculées à des cellules ovRK13 saines. Certains échantillons ont été inoculés à des cellules ovRK13 n'exprimant pas la PrP^c ovine (-dox). Quatre semaines plus tard, cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires digérés par la PK et centrifugés. La PrP^{res} des culots a été analysée par immunoblot à l'aide de l'anticorps Sha31 (1 :10 000).

Pour confirmer cette hypothèse, le pouvoir infectieux du P100K a été déterminé en infectant des cellules ovRK13 saines par le MC (1,5 ml) et par le P100K correspondant à 1,5 ml de MC. Les cultures ainsi inoculées accumulent des quantités similaires de Pr^{Pres} (Figure N°19), confirmant ainsi que la fraction microvésiculaire contient l'essentiel des prions présents dans le milieu conditionné.

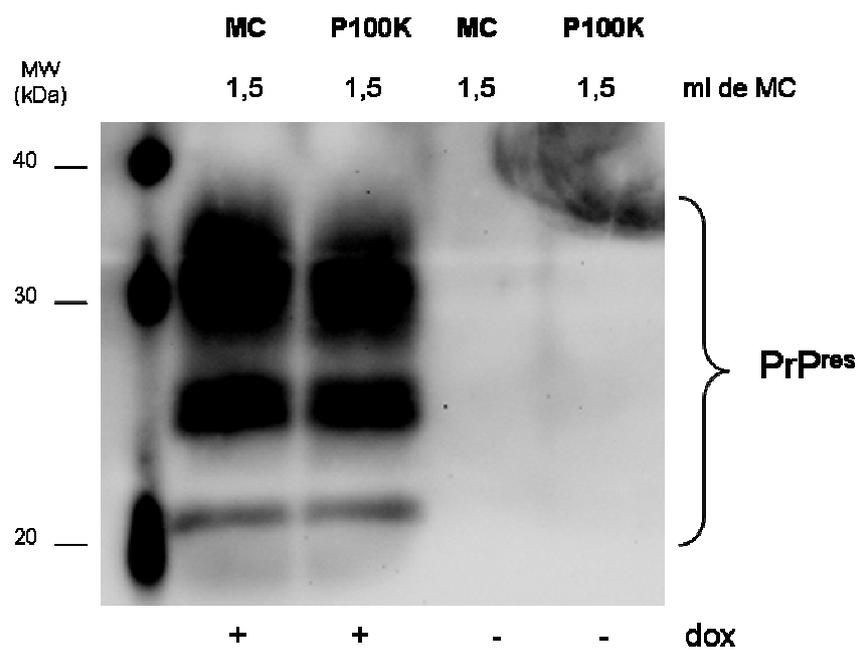


Fig. N° 19. L'agent infectieux PG127 est associé à des microvésicules membranaires. Les cellules ovRK13 ont été exposées à 1,5 ml de milieu conditionné (MC) et à la fraction microvésiculaire (culot P100K) correspondant à 1,5 ml de ce même milieu.

Détection du pouvoir infectieux et de la PrP^{res} associés aux exosomes du MC ovRK13/PG127

Ce matériel a ensuite été fractionné en fonction de sa densité par ultracentrifugation à l'équilibre dans un gradient de sucrose. Toutes les fractions ont été recueillies, y compris le culot du gradient, et le pouvoir infectieux de chaque fraction a été testé. Nos résultats (Figure N°20) montrent tout d'abord que le culot du gradient n'induit pas la formation de PrP^{res} dans les cellules ovRK13 réceptrices, ce qui indique que l'infectiosité est majoritairement associée à des structures membranaires flottant dans les différentes fractions du gradient. Par ailleurs, les fractions les plus infectieuses sont celles dont la densité correspond à celle des exosomes (185) (228) (239) (entre 1,16 et 1,20 g/ml). Il faut cependant noter que des fractions plus légères et plus lourdes peuvent également être infectieuses. Bien entendu, la fraction « exosome » (d=1,16 g/ml) provenant d'une culture de cellules ovRK13 non infectées n'est pas infectieuse.

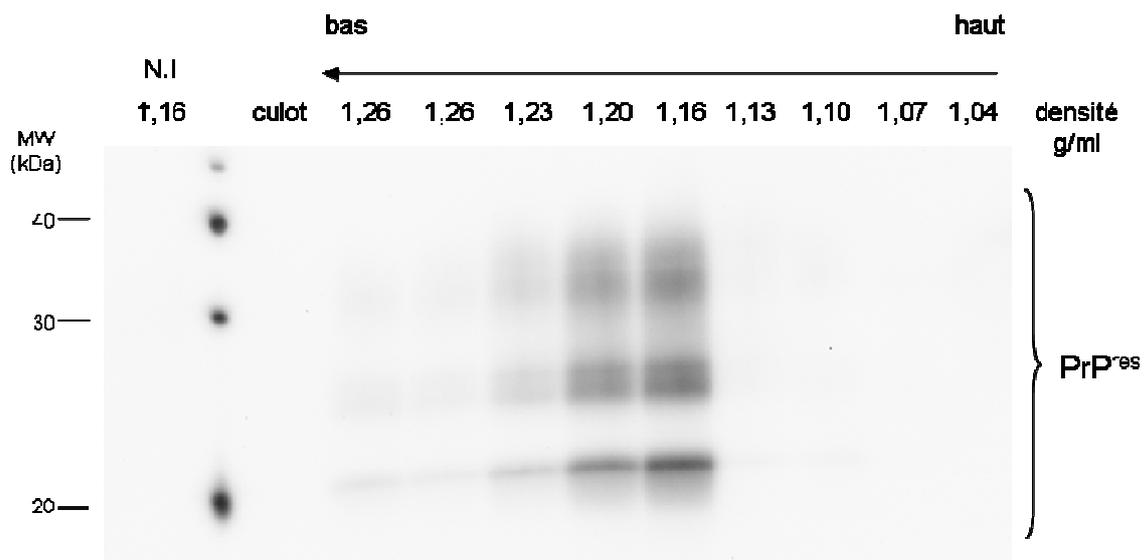


Fig. N° 20. L'agent infectieux PG127 est présent principalement dans les fractions contenant les exosomes. La fraction microvésiculaire correspondant à 70 ml de MC a été déposée dans un gradient de sucrose et centrifugée à l'équilibre. Neuf fractions (ainsi que le culot) ont été collectées et la densité déterminée au réfractomètre. La totalité de chaque fraction a été précipitée au méthanol et utilisée pour infecter des cellules ovRK13. Quatre semaines plus tard, les cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires digérés par la PK et centrifugés. La PrP^{res} des culots a été analysée par immunoblot à l'aide de l'anticorps Sha31 (1 :10 000). La fraction de densité 1,16 mg/ml provenant d'une culture ovRK13 non infectée a été inoculée en parallèle (N.I.).

Nous avons enfin déterminé si les fractions infectieuses (microvésiculaire et les fractions purifiées par gradient) contenaient des quantités détectables de PrP^{res}. Ces fractions ont été solubilisées, digérées par la PK puis centrifugées pour analyser par immunoblot la présence de PrP^{sc} agrégée et PK-résistante. La PrP^{res} est détectée dans la fraction P100K provenant d'une culture infectée (Figure N°21), mais pas dans celle provenant d'une culture saine (non montré). L'analyse des fractions purifiées par gradient montre que la PrP^{res} y est détectable et que les fractions les plus infectieuses sont celles qui contiennent le plus de PrP^{res} (Figure N°22).

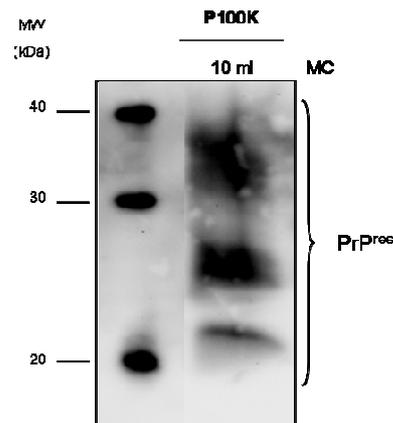


Fig. N° 21. La PrP^{res} est détectable dans la fraction microvésiculaire infectieuse. Le culot P100K correspondant à 10 ml de MC a été digéré par la PK et analysé par immunoblot (anticorps Sha31 au 1 :10 000) pour y détecter la PrP^{res}.

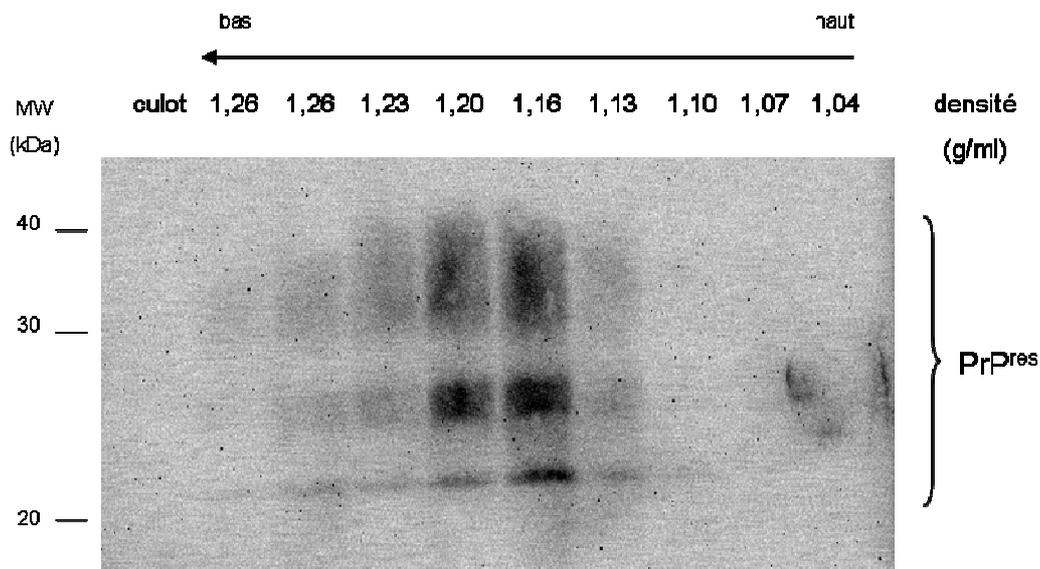


Fig. N° 22. La PrP^{res} est détectable dans les fractions contenant les exosomes infectieux. Chaque fraction du gradient de sucrose (correspondant à 7 ml de MC) a été digérée par la PK et analysée par immunoblot (anticorps Sha31 au 1 :10 000) pour y détecter la PrP^{res}.

Quantification de la sécrétion des prions murins 22L

Les résultats décrits ici proviennent d'expériences menées sur deux cultures moRK13, infectées et propagées de façon indépendante (les résultats de chaque expérience individuelle sont montrés dans la figure N°29). Les cellules moRK13 infectées par la souche murine 22L ont été propagées pour obtenir des cultures chroniquement infectées dont on a collecté le milieu conditionné. Ce MC a été ultracentrifugé pour obtenir un culot correspondant à la fraction microvésiculaire P100K. Le pouvoir infectieux des différentes fractions (cellules, milieux conditionnés, culots P100K) a été déterminé après infection de cellules moRK13 saines. La présence de Pr^{Pres} dans les cultures inoculées (Figure N°23) montre que le milieu de culture des cellules moRK13 infectées par la souche murine 22L est infectieux. L'analyse comparée des quantités de Pr^{Pres} dans les cultures infectées par le MC et la fraction cellulaire indique qu'environ 0.15% seulement de l'infectiosité associée aux cellules est libérée dans le milieu extracellulaire (les cellules correspondant à 0,45 µl de MC sont aussi infectieuses que 300 µl de MC). Comme dans le cas de PG127, l'essentiel du pouvoir infectieux du CM est associé à la fraction microvésiculaire (P100K).

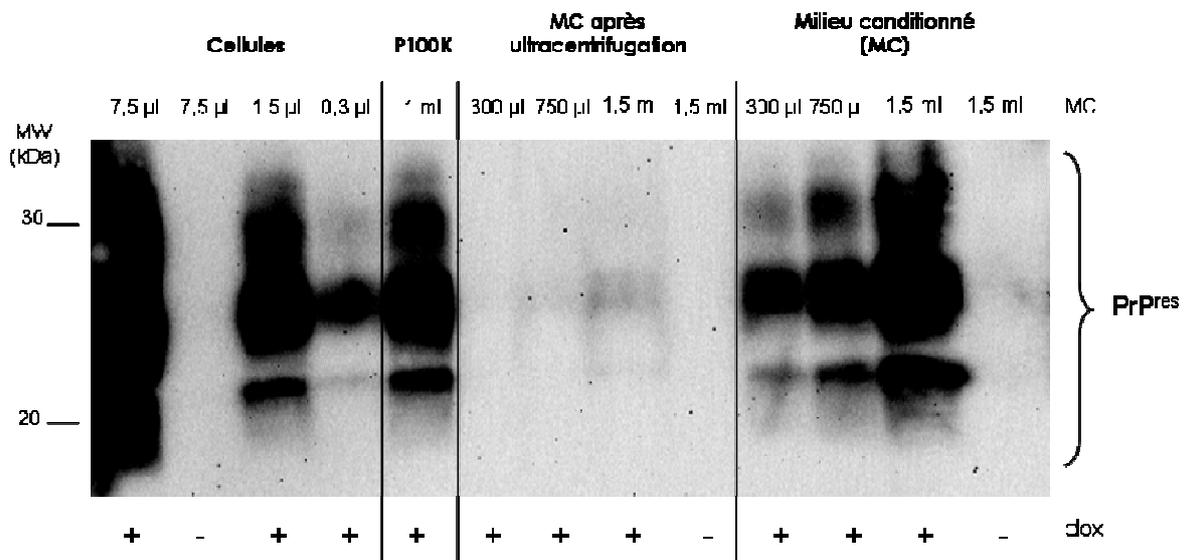


Fig. N° 23. Le milieu de culture provenant des cellules moRK13/22L est infectieux et l'agent infectieux est associé à la fraction microvésiculaire. Différentes quantités de milieu conditionné (MC, de 300 µl à 1,5 ml) avant ou après ultracentrifugation, différentes quantités de cellules moRK13 infectées et la fraction microvésiculaire correspondant à 1 ml de MC ont été inoculées à des cellules moRK13 saines. Certains échantillons ont été inoculés à des cellules moRK13 n'exprimant pas la Pr^{Pc} murine (-dox). Quatre semaines plus tard, les cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires digérés par la PK et centrifugés. La Pr^{Pres} des culots a été analysée par immunoblot à l'aide de l'anticorps Sha31 (1 :10 000).

Détection du pouvoir infectieux et de la PrP^{res} associés aux exosomes du MC moRK13/22L

Le matériel recueilli dans le culot P100K a été fractionné en fonction de sa densité par ultracentrifugation dans un gradient de sucrose et le pouvoir infectieux de chaque fraction a été testé en infectant des cellules réceptrices moRK13. Comme observé pour la souche ovine PG127, le culot du gradient n'est pas infectieux, indiquant que l'infectiosité est associée à des structures membranaires flottant dans les différentes fractions du gradient. Nous montrons également (Figure N°24) que les fractions les plus infectieuses sont celles dont la densité correspond à celle des exosomes (entre 1,13 et 1,19 g/ml).

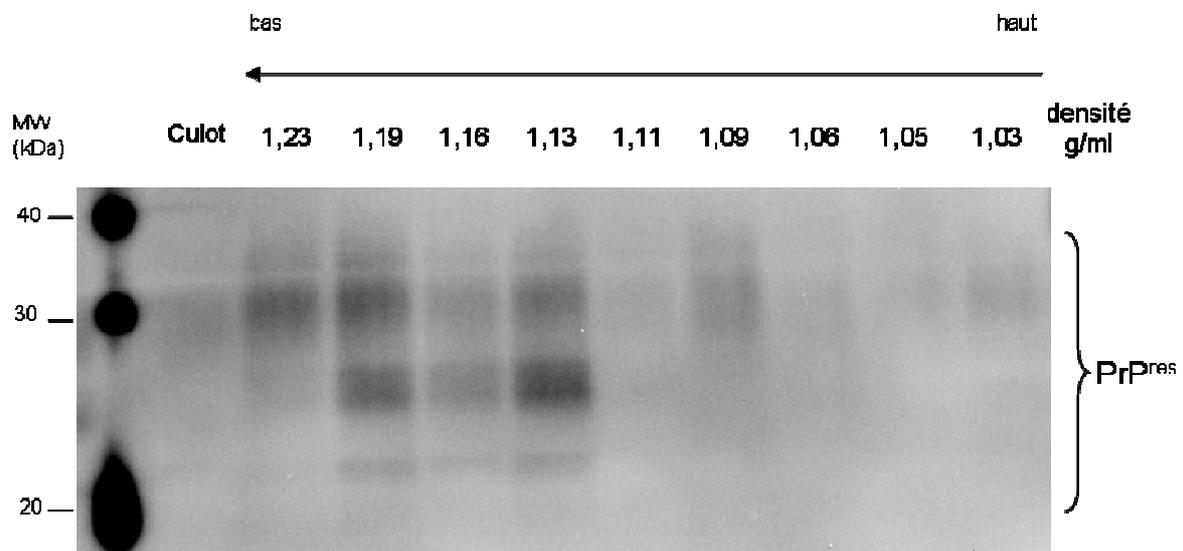


Fig. N° 24. L'agent infectieux 22L est présent principalement dans les fractions contenant les exosomes. La fraction microvésiculaire correspondant à 33 ml de MC a été déposée dans un gradient de sucrose et centrifugée à l'équilibre. Neuf fractions (ainsi que le culot) ont été collectées et la densité déterminée au réfractomètre. La totalité de chaque fraction a été précipitée au méthanol et utilisée pour infecter des cellules moRK13. Quatre semaines plus tard, les cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires digérés par la PK et centrifugés. La PrP^{res} des culots a été analysée par immunoblot à l'aide de l'anticorps Sha31 (1 :10 000).

L'analyse biochimique de la fraction microvésiculaire révèle que la PrP^{res} y est détectable (Figure N°25). Cette PrP^{res} est aussi détectée dans les fractions de gradient contenant les exosomes infectieux (Figure N°26).

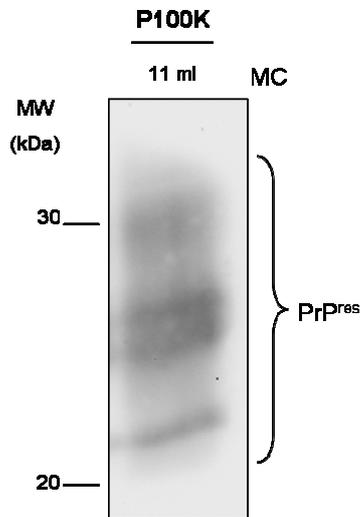


Fig. N° 25. La PrP^{res} est détectable dans la fraction microvésiculaire infectieuse. Le culot P100K correspondant à 11 ml de MC a été digéré par la PK et analysé par immunoblot (anticorps Sha31 au 1 :10 000) pour y détecter la PrP^{res}.

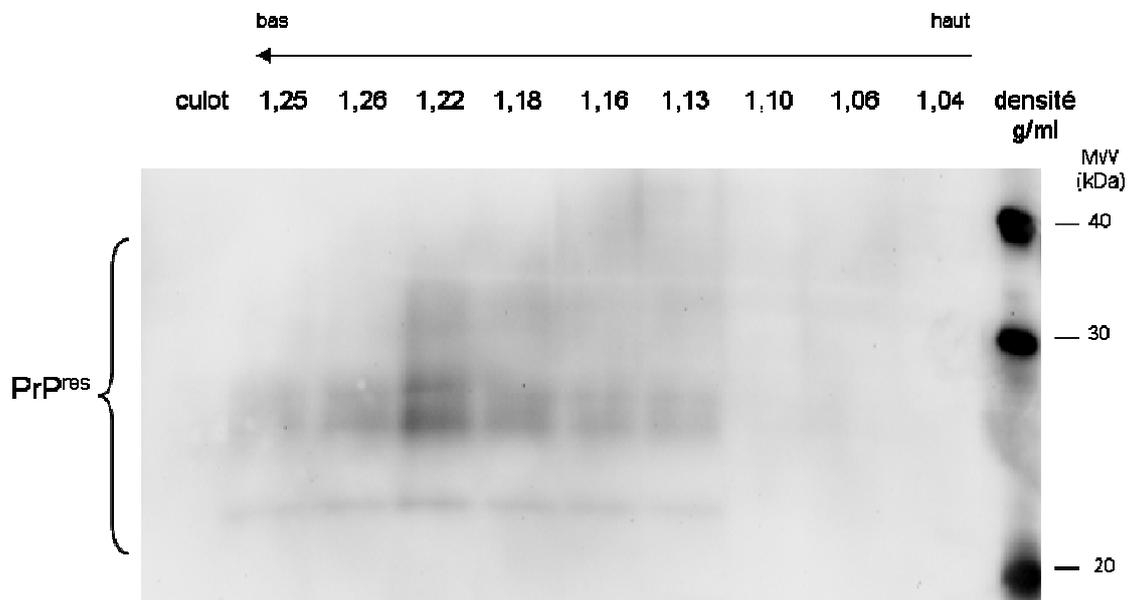


Fig. N° 26. La PrP^{res} est détectable dans les fractions contenant les exosomes infectieux. Chaque fraction du gradient de sucrose (correspondant à 3,3 ml de MC) a été digérée par la PK et analysée par immunoblot (anticorps Sha31 au 1 :10 000) pour y détecter la PrP^{res}.

Quantification de la sécrétion des prions murins Fukuoka-1 et des prions de campagnol

Les résultats décrits ici proviennent d'expériences menées sur deux cultures moRK13 et deux cultures voRK13, toutes infectées et propagées de façon indépendante. Les milieux conditionnés par des cultures moRK13 infectées par la souche Fukuoka-1 et par des cultures voRK13 infectées par la souche de campagnol ont été collectés et ultracentrifugés afin d'en isoler la fraction microvésiculaire. Leur pouvoir infectieux a été déterminé en infectant des cellules RK13 réceptrices (moRK13 et voRK13, respectivement). Dans les deux cas, il s'avère que ces fractions sont infectieuses car elles sont capables d'induire la formation de Pr^{Pres} dans les cellules cibles (Figure N°27). L'analyse comparée des quantités de Pr^{Pres} induites par les fractions cellulaires et les P100K indique qu'en moyenne 0.12% des prions Fukuoka-1 sont sécrétés par les cellules infectées dans le milieu extracellulaire (les cellules correspondant à 11 µl de MC sont aussi infectieuses que 8,7 ml de MC). Cette proportion est en moyenne de 0.06% pour les prions de campagnol. Les résultats de chaque expérience individuelle sont montrés dans la figure N°29.

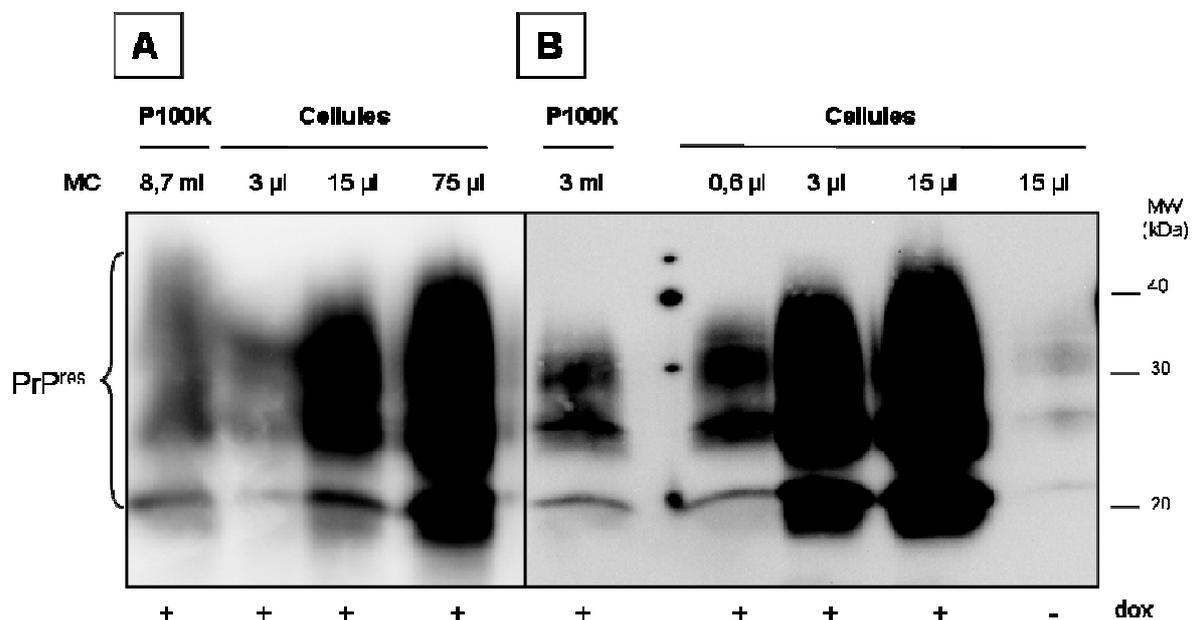


Fig. N° 27. La fraction microvésiculaire provenant du milieu de culture de cellules moRK13/Fukuoka-1 et voRK13/campagnol est infectieuse. Les fractions microvésiculaires (P100K) correspondant aux quantités indiquées de MC, ainsi que différentes quantités de cellules infectées moRK13/Fukuoka-1 (A) et voRK13/campagnol (B) ont été inoculées à des cellules saines moRK13 et voRK13, respectivement. Certains échantillons ont été inoculés à des cellules n'exprimant pas la PrP^C (-dox). Quatre semaines plus tard, les cultures ont été solubilisées, les lysats cellulaires digérés par la PK et centrifugés. La Pr^{Pres} des culots a été analysée par immunoblot à l'aide de l'anticorps Sha31 (1 :10 000).

Les fractions infectieuses P100K ont été analysées par immunoblotting. Dans les deux cas, on peut y détecter de la PrP^{res} (Figure N°28).

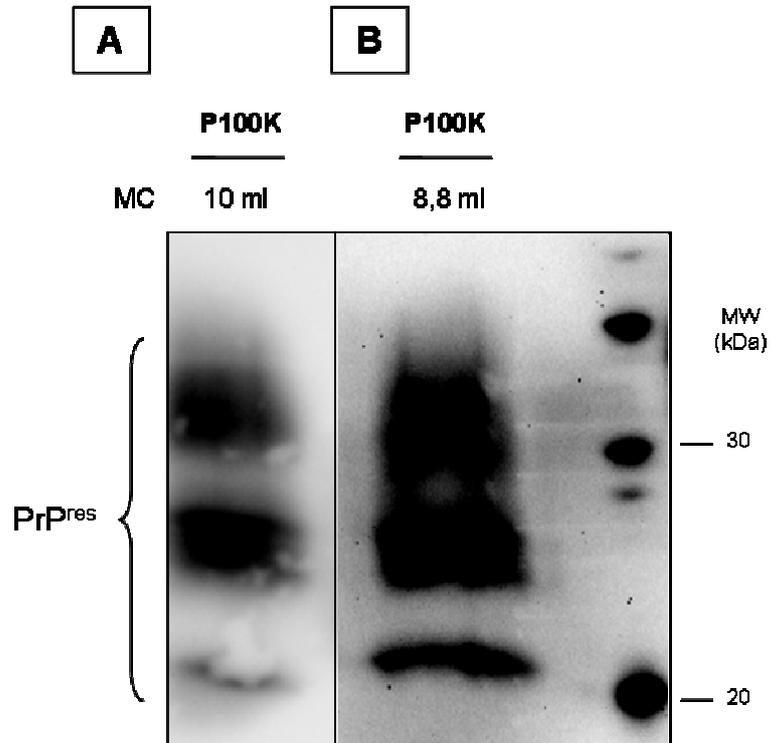


Fig. N° 28. La PrP^{res} est détectable dans les fractions microvésiculaires infectieuses provenant des cultures moRK13/Fukuoka-1 et voRK13/campagnol. Les culots P100K correspondant aux quantités indiquées de MC ont été digérés par la PK et analysés par immunoblot (anticorps Sha31 au 1:10 000) pour y détecter la PrP^{res}. (A) voRK13/campagnol ; (B) moRK13/Fukuoka-1.

L'infection par les prions ne semble pas stimuler la sécrétion des exosomes

Nous avons montré que la proportion de prions sécrétés par une culture ovRK13 infectée par la souche PG127 est bien supérieure (environ 25 fois) à celle de cultures moRK13 ou voRK13 infectées par les souches 22L et Fukuoka-1 ou de campagnol, respectivement. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure N°29.

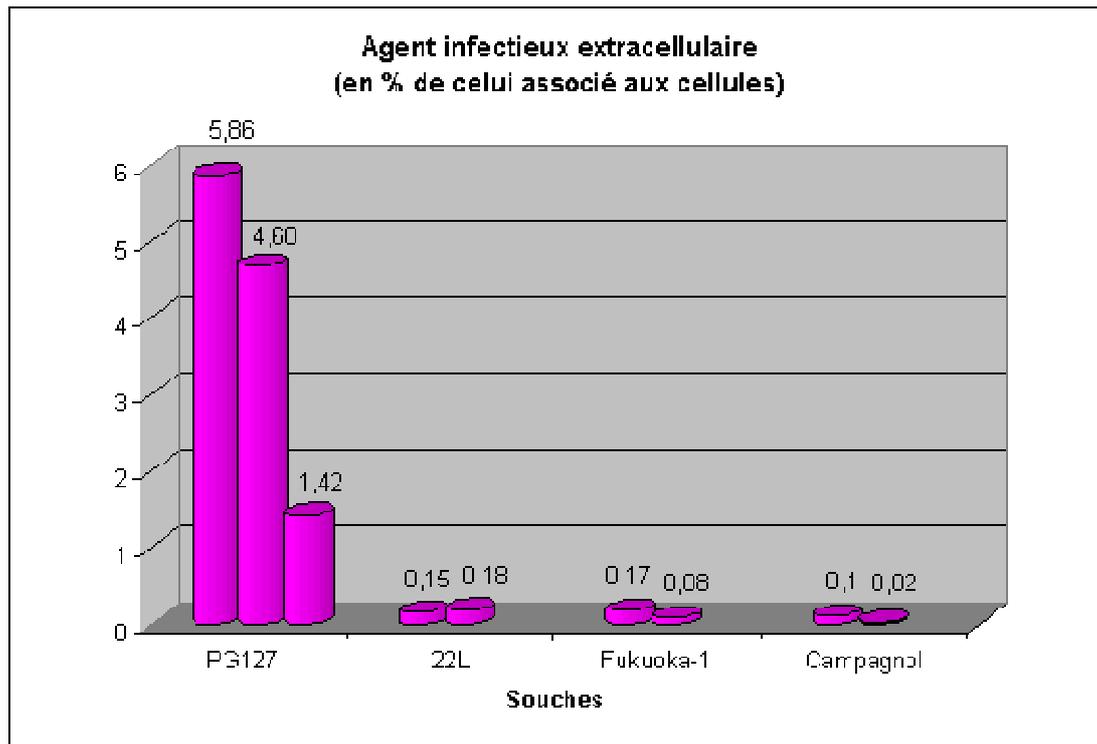


Fig. N° 29. Proportion d'agent infectieux libéré dans le milieu de culture.

Afin de déterminer s'il y avait une augmentation de la quantité d'exosomes sécrétés en réponse à l'infection, nous avons isolé les fractions microvésiculaires provenant du milieu de cultures infectées ou non. La présence de deux protéines exosomales (81) (la flotiline-1 et EF1a) a ensuite été recherchée, par immunoblot, dans ces P100K. Dans ces expériences, nous avons utilisé du milieu de culture préalablement déplété (par ultracentrifugation) des exosomes sériques. Les fractions microvésiculaires correspondant à 20 ml de milieu conditionné ont été analysées.

La figure N°30 montre la détection de la flotiline-1 dans des P100K provenant de cultures ovRK13 infectées ou non par la souche PG127, avec en contrôle négatif du milieu de culture seul. La présence de la flotiline-1 et d'EF1a dans les P100K de cultures ovRK13, moRK13 et voRK13 infectées ou non est analysée dans la figure N°31.

Deux conclusions peuvent être tirées de ces expériences. Tout d'abord, l'infection par les trois souches de prions analysées (ovine PG127, murine 22L, campagnol) ne semble pas avoir d'impact sur la quantité d'exosomes sécrétés par les cellules. Par ailleurs, ces expériences montrent que le clone cellulaire ovRK13 utilisé, qu'il soit infecté ou non, ne sécrète pas plus d'exosomes que les clones cellulaires moRK13 ou voRK13. En d'autres termes, ces trois clones cellulaires RK13 semblent sécréter constitutivement des quantités comparables d'exosomes et leur infection ne modifie pas de façon appréciable la libération de ces microvésicules.

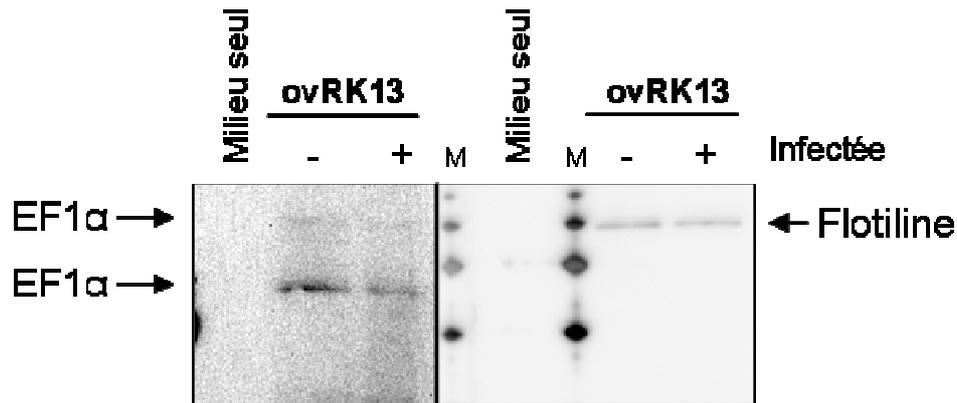


Fig. N° 30. Analyse d'un marqueur exosomal (flotiline-1) dans la fraction microvésiculaire de cultures ovRK13 infectées ou non par la souche PG127. Les culots P100K correspondant à 20 ml de MC de cultures ovRK13 infectées (+) ou non (-) par la souche PG127 ont été analysés par immunoblot pour y détecter la flotiline-1. Le P100K provenant de la même quantité de milieu de culture seul (sans cellules) a été analysé en parallèle.

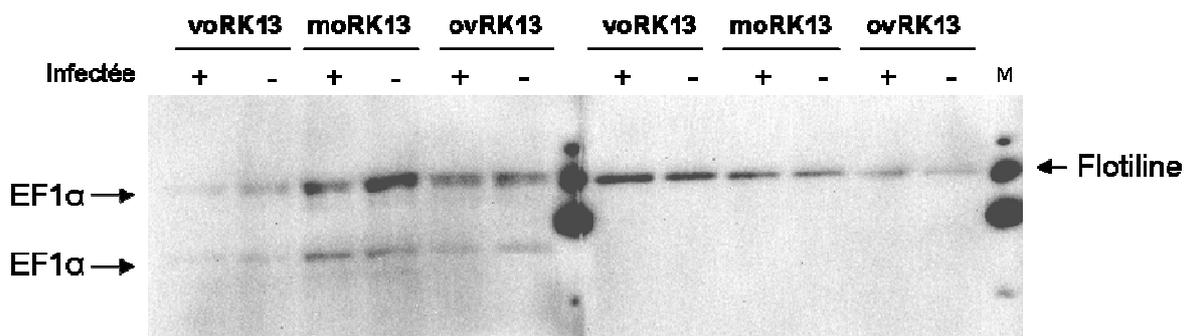


Fig. N° 31. Analyse de 2 marqueurs exosomaux (flotiline-1 et EF1α) dans les fractions microvésiculaires de différentes cultures infectées ou non. Les culots P100K correspondant à 20 ml de MC de cultures ovRK13, moRK13 et voRK13 infectées (+) ou non (-) par les souches PG127, 22L et de campagnol, respectivement, ont été analysés par immunoblot pour y détecter la flotiline-1 (droite) et EF1α (gauche).

Enfin, nous avons analysé, par immunoblot, la quantité de PrP^{res} présente dans quelques unes des différentes cultures infectées que nous avons utilisées dans ce travail. Les résultats indiquent que ces quantités varient relativement peu d'une culture à l'autre (Figure N°32). En tout état de cause, les cultures ovRK13 infectées par la souche PG127 ne sont pas plus riches en PrP^{res} que des cultures moRK13 infectées par 22L. En d'autres termes et dans nos conditions, la quantité de PrP^{res} intracellulaire ne semble pas un élément déterminant quant à l'efficacité de la sécrétion des prions.

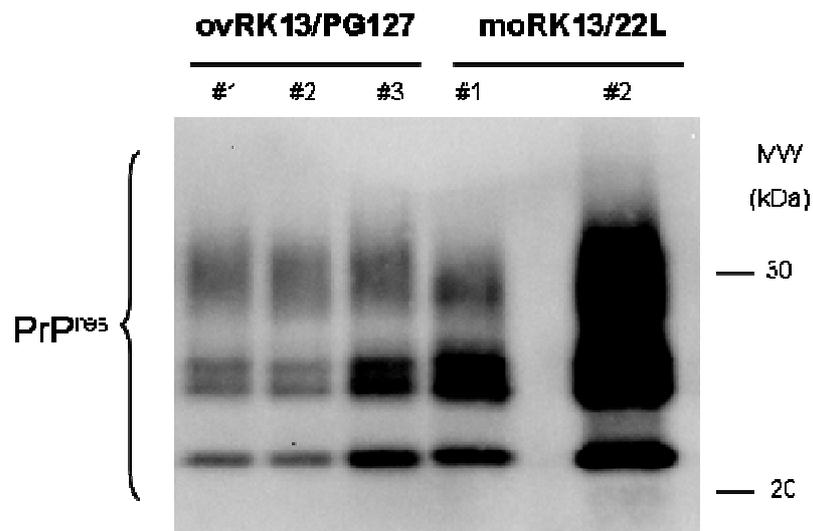


Fig. N° 32. Visualisation de la quantité de PrP^{res} contenue dans les cellules des cinq cultures infectées utilisées pour l'obtention des milieux conditionnés. Les cellules provenant des trois cultures chroniquement infectées ovRK13/PG127 et de deux cultures moRK13/22L ont été solubilisées et 250 µg de protéine ont été digérées à la PK pour la détection de PrP^{res}.

PrP^{res} soluble dans la fraction microvésiculaire P100K

Comme cela a été expliqué précédemment, la PrP anormale est classiquement isolée après solubilisation des échantillons (cellules, fractions P100K etc) et traitement par la PK. Les échantillons sont ensuite centrifugés pour collecter les culots qui contiennent la PrP anormale résistante à la dégradation protéolytique et très agrégée. Lors de l'analyse de la PrP^{res} de la fraction microvésiculaire provenant de cultures ovRK13 infectées par la souche PG127 (Figure N°21), nous avons procédé à l'analyse des surnageants obtenus après centrifugation et à notre grande surprise nous y avons détecté de la PrP^{res}. Dans une expérience représentative (Figure N°33), la fraction P100K provenant du MC de cultures ovRK13 infectées par PG127 a été solubilisée, digérée à la PK puis centrifugée. Le matériel présent dans le surnageant a été précipité au méthanol et analysé par immunoblot. Si la majorité de la PrP^{res} est présente dans le culot, une quantité aisément détectable de PrP^{res} est clairement détectée dans le surnageant. Ces résultats suggèrent donc que l'agrégation de la PrP^{res} dans les microvésicules infectieuses n'est pas homogène. Il est possible (voir Conclusions) que ce résultat reflète la présence dans ces vésicules d'une population de PrP^{res} peu agrégée.

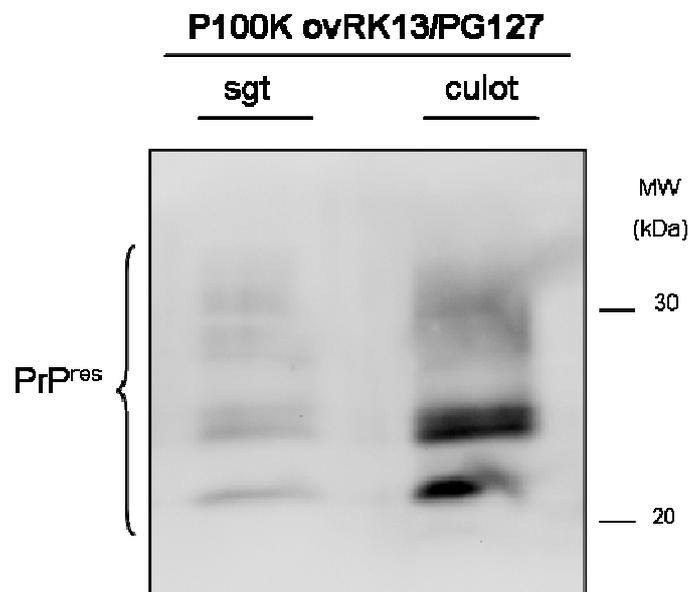


Fig. N° 33. Détection de PrP^{res} dans la fraction soluble du P100K. La fraction microvésiculaire obtenue à partir du milieu conditionné de la culture ovRK13/PG127 a été solubilisée puis digérée par la PK. L'échantillon a ensuite été centrifugé pour analyser la PrP^{res} dans le culot et le surnageant (sgt).

Conclusions

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules infectées à sécréter des prions infectieux dans le milieu extracellulaire.

En utilisant des cultures infectées par un panel relativement large de différentes souches de prions, nous avons montré que la sécrétion des prions dans le milieu de culture est un phénomène général. Le fractionnement des milieux conditionnés a révélé que la très grande majorité de ces prions est associée à des microvésicules membranaires. Cependant, et de façon reproductible, une petite proportion (estimée à 20%) de l'agent infectieux est encore présente dans le milieu de culture après sédimentation des microvésicules. Ceci suggère que certaines formes de prions, minoritaires, pourraient ne pas être associées à des vésicules membranaires. Les microvésicules membranaires représentent une population de vésicules membranaires de densité, de taille et d'origine subcellulaire diverses (58). Notre travail montre que, pour les deux souches étudiées le plus en détail (la souche ovine PG127 et la souche murine 22L), l'agent infectieux est majoritairement associé à des microvésicules d'origine endosomale appelées exosomes.

L'efficacité avec laquelle un prion est sécrété semble varier de façon très importante en fonction de la souche infectieuse. En effet, les prions extracellulaires représentent environ 4% des prions associés aux cellules dans le cas de la souche PG127. Cette proportion est au moins 25 fois plus faible dans le cas des souches 22L, Fukuoka-1 et de campagnol. A ce stade de notre étude, nous ignorons la nature des mécanismes qui sous-tendent cette observation. Nos résultats indiquent que l'infection ne semble pas augmenter la sécrétion des exosomes et que ces différentes cultures, qu'elles soient infectées ou non, sécrètent des quantités comparables d'exosomes. **Notre hypothèse de travail est que la PrP anormale de la souche PG127 présente des propriétés biochimiques/structurales particulières favorisant son association avec les exosomes sécrétés constitutivement par les cellules RK13.** L'analyse biochimique que nous avons commencé à conduire a révélé que la PrP^{res} PG127 dans les microvésicules sécrétées présente effectivement des propriétés d'agrégation tout à fait particulières. Une partie de la PrP^{res} semble peu agrégée et cette observation nous a conduit à initier un important travail de caractérisation de ce que nous pensons être de petits agrégats de PrP^{res} (publication 2).

RESULTATS-3

Identification de petits agrégats de PrP^{res} dans les cultures de cellules chroniquement infectées

INTRODUCTION

En analysant la PrP^{res} des microvésicules sécrétées nous avons montré qu'une partie de la PrP anormale résistante à la protéolyse par la PK n'était pas sédimentable. Ces microvésicules semblent donc contenir des espèces hétérogènes de PrP^{res}, certaines étant sédimentables et d'autres non. Il s'est très vite avéré que cette diversité de comportement biochimique était également observée en analysant la PrP anormale isolée des cultures cellulaires infectées. Cette observation tout à fait originale nous a conduits à initier un important travail de caractérisation de ce qui pourrait être de petits agrégats de PrP^{res} (publication 2).

Recovery of Small Infectious PrP^{res} Aggregates from Prion-infected Cultured Cells*

Received for publication, July 16, 2010, and in revised form, December 29, 2010. Published, JBC Papers in Press, January 6, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.165233

Zaira E. Arellano Anaya^{1,2}, Jimmy Savistchenko¹, Véronique Massonneau, Caroline Lacroux, Olivier Andréoletti, and Didier Vilette³

From the Institut National Recherche Agronomique, Unité Mixte Recherche 1225, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes, Université Toulouse, Institut National Polytechnique, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, F31076 Toulouse, France

Prion diseases are characterized by deposits of abnormal conformers of the PrP protein. Although large aggregates of proteinase K-resistant PrP (PrP^{res}) are infectious, the precise relationships between aggregation state and infectivity remain to be established. In this study, we have fractionated detergent lysates from prion-infected cultured cells by differential ultracentrifugation and ultrafiltration and have characterized a previously unnoticed PrP species. This abnormal form is resistant to proteinase K digestion but, in contrast to typical aggregated PrP^{res}, remains in the soluble fraction at intermediate centrifugal forces and is not retained by filters of 300-kDa cutoff. Cell-based assay and inoculation to animals demonstrate that these entities are infectious. The finding that cell-derived small infectious PrP^{res} aggregates can be recovered in the absence of strong *in vitro* denaturing treatments now gives a biological basis for investigating the role of small PrP aggregates in the pathogenicity and/or the multiplication cycle of prions.

Prion diseases are caused by the misfolding of the endogenously expressed PrP protein, and the most widely accepted model of prion multiplication is that abnormally folded PrP recruits and converts the host PrP into new abnormal forms (1–3). Historically, abnormal PrP was operationally defined as insoluble and resistant to protease digestion (4) and was subsequently termed PrP^{res}.⁴ Although normal PrP protein is soluble in detergents and sensitive to proteinase K (PK) digestion, part of PrP in infected tissues is PK-resistant and recovered in the pellets of centrifuged samples. These large PrP^{res} aggregates are infectious (5), but it is unclear whether infectivity is entirely congruent with these species (6, 7) or whether they are the more efficient species to promote infection. Efficient transmission in the absence of detectable typical PrP^{res} has been observed in some models of prion diseases (8, 9), and in other situations, infectivity and the bulk of large PrP^{res} aggregates have distinct sedimentation profiles in density gradients (10). In addition, large aggregates of PrP^{res} are not the only abnormal forms in

diseased tissues, as exemplified by the characterization of PK-sensitive abnormal forms of PrP (11–15). Collectively, these and other findings (16) indicated that abnormal PrP is a set of diverse populations, displaying various biochemical properties and different morphological deposits in the brain, and their biological properties have yet to be established.

Here, we investigated the diversity of infectious abnormal PrP species in a cell line and in neuronal primary cultures infected with a sheep scrapie agent. Although we obtained no evidence for the presence of PK-sensitive infectivity, we identified a previously unnoticed abnormal PrP species. Solubility and ultrafiltration assays indicate that these PK-resistant PrP entities are small aggregates. These species are infectious and may explain the perplexing presence of infectivity in brain samples devoid of detectable large aggregates of PrP^{res}.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells and Transgenic Mice—Rov cells (the Rov9 clone) were maintained at 37 °C in 5% CO₂ in Opti-MEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 10 μg/ml streptomycin (17). To induce the expression of ovine PrP, 1 μg/ml doxycycline (Sigma-Aldrich) was added to the culture medium.

Primary neuronal cultures were established from transgenic mice expressing the ovine PrP (*tg338*) or the human PrP on a mouse PrP^{0/0} background, as described (18). Cerebellar granule neurons (CGNs) were extracted from 5- to 7-day-old mice by enzymatic and mechanical dissociation and were plated at a density of 2,500 cells/mm² in plastic culture wells coated with 10 μg/ml poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) at 37 °C and 5% CO₂. Cells were cultured in DMEM-GlutaMAX (Invitrogen) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 25 mM KCl, penicillin and streptomycin, N2 and B27 supplements (Invitrogen). The medium was complemented weekly with 1 mg/ml glucose and 10 μM antimetabolites uridine and fluorodeoxyuridine (Sigma-Aldrich). For immunofluorescence analysis, CGNs were plated on poly-D-lysine-coated glass coverslips and analyzed 13–20 days later. Cultures were prefixed by adding 1 volume of paraformaldehyde (4% w/v in PBS) to the culture medium. Ten minutes later, the cells were subjected to a second round of fixation by adding 4% paraformaldehyde for 10 min. The cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and stained for microtubule-associated protein 2 with mAb HM-2 (Sigma-Aldrich) and for β-tubulin III with affinity-purified polyclonal antibodies (Sigma-Aldrich). Bound antibodies were visualized with Alexa Fluor-conjugated secondary anti-

* This work was supported in part by Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-08-MIEN-010 (France) and the Department for Environment, Food and Rural Affairs (United Kingdom).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Recipient of a fellowship from Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33 5 61 19 39 97; Fax: 33 5 61 19 38 34; E-mail: d.vilette@envt.fr.

⁴ The abbreviations used are: PrP^{res}, proteinase-resistant PrP protein; CGN, cerebellar granule neuron; PK, proteinase K.

Small Infectious PrP^{res} Aggregates

bodies (Molecular Probe), and coverslips were mounted on slides using ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) containing DAPI.

Ovine transgenic mice (*tg338* line) are transgenic for the ovine PrP on a mouse PrP^{0/0} background (19). The mouse line transgenic for the human PrP will be described elsewhere.

Prion Agent and Infection of Cultured Cells—The sheep isolate (PG127) (20) propagated once in sheep was used to infect *tg338* mice. At the terminal stage, brains were homogenized at 10% (w/v) in 5% sterile glucose using a high speed homogenizer (TeSeE Precess 48 system), and infectious inoculum was heated at 70 °C for 20 min. Persistently infected Rov cultures were obtained by exposing uninfected cells to 0.5% infectious brain homogenate for a few days. The resulting cultures were grown for 1–2 months and used to prepare cell lysates. Mock-infected Rov cultures were grown and processed in parallel. CGNs (at day 3 after plating) were infected by diluting the 10% infectious homogenate 1,000-fold in cell culture medium.

PK Digestion of Cell Lysates and Brain Extracts—Cell cultures were rinsed with cold PBS and solubilized for 10 min at 4 °C in Triton-DOC lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate). The lysates were clarified by low speed centrifugation (425 × *g*, 1 min), and cellular proteins in the postnuclear supernatants were quantified by bicinchoninic acid (Pierce). Digestion with PK (recombinant grade; Roche Applied Science) was performed for 2 h at 37 °C with a mass ratio of 4 μg of PK/mg of cellular proteins, and the reaction was stopped by the addition of Pefabloc (Sigma-Aldrich) to 4 mM. Small volumes of 10% brain homogenates were solubilized in Triton-DOC lysis buffer and processed as cell lysates for detection of PrP^{res}. PK-digested samples were centrifuged for 1 h at 10,000–20,000 × *g*, and pellets were analyzed by Western blotting.

Search for PK-sensitive Infectivity in Cell Lysates—Lysates (the equivalent of 250 μg of proteins) from infected Rov cultures were incubated for 2 h at 37 °C with 1 μg of PK, and digestion was stopped with Pefabloc. Mock-treated lysates were incubated with Pefabloc and no PK. Proteins were precipitated with 4 volumes of methanol, resuspended in PBS, and used to inoculate Rov cells.

Isolation of Soluble and Insoluble Fractions—Preparative isolation of the soluble and insoluble fractions was carried out with three different infected Rov cultures with similar results. Typically, 35 ml of PK-digested cell lysates (1 mg/ml) were centrifuged at 100,000 × *g* (*g_{av}*) for 1 h at 4 °C in polyallomer tubes in a SW32 rotor (Beckman). The supernatant was removed, and 4 volumes of methanol were added to precipitate proteins. The insoluble pellet was dried at room temperature, transferred with 400 μl of PBS into a microtube, and stored at –20 °C. The methanol-precipitated supernatant fraction was centrifuged for 30 min at 10,000 × *g* in 50-ml tubes, and pelleted material was air-dried and resuspended in 400 μl of PBS and transferred into a microtube. Pellets from both fractions were sonicated for a total of 6 min at power 9 with a Cup-Horn apparatus to help dissolution and stored at –20 °C until used for immunoblotting, guanidine denaturation assays, cell-based assay, and bioassay in mice. In some experiments, the supernatant obtained after a 1-h centrifugation at 100,000 × *g* was transferred to a

new clean tube and subjected to a second centrifugation at 100,000 × *g*.

In some experiments, analytical PK-digested samples were centrifuged in 1.5-ml microtubes either in a TLA-110 rotor (Beckman) or in a microcentrifuge. Rotors with different sedimentation pathlengths have distinct efficiencies to pellet a given particle, and these can be compared using their *k* factors. At 100,000 × *g*, *k* factors of SW32 and TLA-110 rotors are 262 and 50, respectively, indicating that the TLA-110 is about 5-fold more efficient than SW32 to pellet a given particle. Therefore, centrifugation at 20,000 × *g* or 100,000 × *g* with TLA-110 corresponds to 100,000 × *g* or 500,000 × *g*, respectively, with the SW32 rotor. Pellets and methanol-precipitated supernatants were resuspended in small volumes of PBS without sonication and analyzed by immunoblotting and in the cell-based assay.

Guanidine Denaturation Assays—Insoluble and soluble fractions in PBS were mixed with a noninfected cell lysate to achieve a final protein concentration of 870 μg/ml. Aliquots (30 μl) were mixed with the same volume of H₂O or GdnHCl to achieve GdnHCl final concentrations of 1, 1.5, and 2 M and were incubated for 1 h at room temperature. After methanol precipitation, the samples were digested with 0.1 μg of PK for 2 h at 37 °C and analyzed by immunoblotting.

Immunoblotting—Samples were separated by 12% SDS-PAGE before transfer to PVDF membranes (Bio-Rad). The Western blots were stained for PrP with Sha31 mAb (21). Filters were developed using an ECL Plus reagent kit (Amersham Biosciences-GE Healthcare) and visualized with a Bio-Rad Versa-Doc imaging system. The signals were quantified with Quantity One software (Bio-Rad).

Ultrafiltration of Cell Lysates—The total and the soluble fractions of PK-digested infected Rov cell lysates were ultrafiltered as follows. We used filters with cutoffs of 0.2 μm, 1,000 kDa, 300 kDa (Vivaspin 500; Sartorius), and 100-kDa (Microcon; Millipore). Before use, the filters were rinsed with the lysis buffer to remove the preservatives. For each filter, 350 μg of PK-digested lysates (1 mg/ml) were loaded. The ultrafiltration was performed at 5,000 rpm, at room temperature for 15 min in a microcentrifuge. The volumes of the collected filtrates were the same as the loaded volumes. The retentates were recovered by the addition of 350 μl of the lysis buffer. The filtrates and retentates were either methanol-precipitated or subjected to centrifugation (10,000 × *g*, 1 h) to generate soluble and insoluble fractions.

Immunoprecipitation of PrP^{res}—Purified βS36 antibody (22) and BSA were coupled to Dynabeads M-270 (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Lysate from infected Rov cells (1 mg/ml) was PK-digested and centrifuged for 1 h at 100,000 × *g* in the SW32 rotor. Supernatant (1.1 ml) was incubated with 5.5 mg of βS36- or BSA-coupled Dynabeads for 2 h, at room temperature. A fraction of the supernatant (100 μl) and the equivalent amount of magnetic beads were analyzed by Western blotting. The remainder (1 ml) was methanol-precipitated, resuspended with sonication in 300 μl of PBS, and used in the cell-based assay.

Cell-based Assay and Bioassay of the Soluble and Insoluble Fractions—Uninfected Rov cells were seeded in 6-well plates in the presence of doxycycline. When confluent, the cultures were

exposed to 3 ml of culture medium containing 2, 8, or 32 μ l of the insoluble or soluble preparative fractions. In parallel, 32 μ l of each fraction was used to inoculate Rov cells in the absence of doxycycline. For cell-based assay of immunodepleted supernatants, from 30 to 300 μ l were tested. Infection was allowed to proceed for 3–4 weeks at the end of which the cultures were solubilized. In each assay, 3 ml of culture medium containing serial 10-fold dilutions of the PG127 10% infectious brain homogenate was inoculated in parallel to Rov cells. Cell lysates (500 μ g of proteins) were PK-digested and centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 h, and pellets were analyzed for insoluble PrP^{res} by Western blotting.

Insoluble and soluble preparative fractions (4 μ l each, corresponding to 350 μ g of cellular proteins digested with PK) were diluted to 200 μ l with 10% brain homogenate from a healthy sheep, and 20 μ l was inoculated intracerebrally into six *tg338* mice. Mice were then clinically monitored until the occurrence of scrapie clinical signs, at which time they were euthanized.

RESULTS

Detection of Infectious PrP^{res} in the 100,000 $\times g$ Supernatants of PK-digested Cell Lysates—The sheep prion agent used here was selected because it multiplies stably, efficiently, and apparently faithfully in previously described Rov and MovS cell lines (23) and in cultured primary neurons (18). In addition, infectivity levels can be quantified either through bioassay in *tg338* transgenic mice expressing the ovine PrP protein (20) or through a cell-based assay.

Previous studies reported the presence of abnormal, yet PK-sensitive, forms of PrP in infected tissues and cultured cells from various species (11–15). However, it is not known whether these particular abnormal PrPs are infectious. To clarify this issue in our model, chronically infected Rov cultures were solubilized in nondenaturing detergents. Cell lysates were subjected to PK digestion (2 h at 37 $^{\circ}$ C, with 4 μ g of PK/mg of cellular proteins) or left untreated, and the samples were precipitated with methanol. Infectivity in the resuspended materials was quantified through a Rov cell-based assay. In this assay, Rov cultures inoculated with increasing infectivity accumulate dose-dependent amounts of PrP^{res} (Fig. 1A). Uninfected Rov cells were exposed to mock- and PK-digested infected Rov extracts, and the inoculated cultures were analyzed 3 weeks later for the presence of PrP^{res}. We found that Rov cells inoculated with mock- or PK-digested samples had accumulated similar amounts of PrP^{res}, indicating that infectivity in the two inocula was similar (PrP^{res} amounts in cultures inoculated with mock-treated lysates was $19.5\% \pm 22\%$ (mean \pm S.E., $n = 6$) above those in cultures inoculated with PK-treated lysates; see a representative Western blot analysis in Fig. 1B). We thus concluded that the vast majority of infectivity propagated in Rov cells is resistant to PK digestion and that PK-sensitive infectivity, if any, is marginal.

Fig. 1C illustrates the PrP^{res} species recovered in nondenaturing detergent lysates of chronically infected Rov cells. Immunoblot analysis of methanol-precipitated, PK-digested samples reveals the presence of PrP^{res} in lysates from infected cultures (lane 5). We reasoned that small PrP^{res} aggregates, if present, might remain in the supernatant after centrifugation of

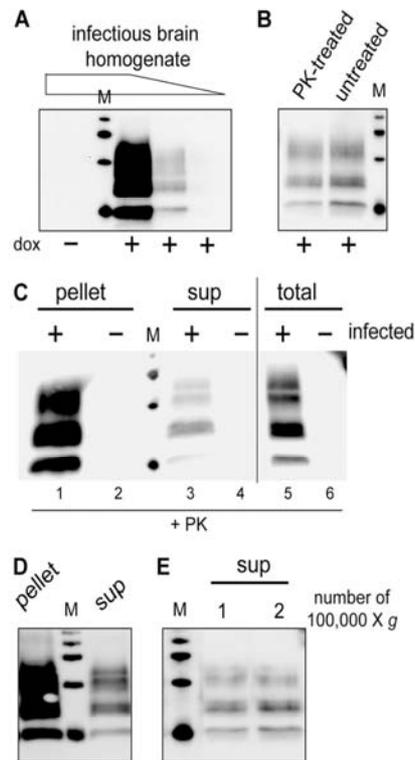


FIGURE 1. PrP^{res} species is present in the soluble 100,000 $\times g$ fraction of infected Rov cells. A, Rov cell-based assay is shown. Uninfected Rov cells were inoculated with three 10-fold dilutions of an infectious brain homogenate. Three weeks later, the inoculated cultures were detergent-extracted and digested with PK, and PrP^{res} was analyzed by immunoblotting. Please note that no PrP^{res} was detected when inoculated Rov cultures did not express ovine PrP (*dox*–) and that the amounts of accumulated PrP^{res} are dependent on the amount of infectivity used to inoculate the cells. M are standard molecular mass marker proteins (20, 30, 40, and 50 kDa). B, cell-based assay indicates that infectivity propagated in Rov cells is resistant to PK digestion. Infectious Rov cell extracts either PK-treated or left untreated were used to inoculate uninfected Rov cells. Three weeks later, accumulated PrP^{res} in the inoculated cultures was analyzed by immunoblotting. C, lysates (250 μ g of proteins) from mock-infected (–) or infected (+) Rov cultures were digested with PK and either methanol-precipitated (lanes 5 and 6) or centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 h to obtain pellet and supernatant (*sup*) fractions (lanes 1–4). All the samples were analyzed for the presence of PrP^{res} by immunoblotting. D, PK-digested lysates from infected Rov cells were centrifuged for 1 h at $100,000 \times g$ (SW32 rotor). Equivalent amounts of the pellet or the supernatant (*sup*) fractions were analyzed for PrP^{res}. E, PrP^{res} in the supernatant fractions after one and two successive centrifugations at $100,000 \times g$ was analyzed. 71% of PrP^{res} remained in the supernatant after a second round of ultracentrifugation ($n = 2$).

PK-digested lysates. PK-digested lysates were subjected to a standard centrifugation step (e.g. $10,000$ – $20,000 \times g$ for 1 h in a microcentrifuge). Western blot analysis of pellets revealed the presence of PrP^{res} (lane 1), consistent with the known insolubility of large PrP^{res} aggregates. Strikingly, a PrP^{res} signal was consistently observed when material from methanol-precipitated supernatant was analyzed (lane 3). No PrP^{res} was observed in either fraction when uninfected cultures were analyzed (lanes 2, 4, and 6).

To characterize the PrP^{res} species in the supernatant and pellet fractions, large volumes of infected cell lysates were digested with PK and ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h in a SW32 rotor to generate soluble (supernatant) and insoluble (pellet) fractions. Soluble material was recovered by methanol

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on March 9, 2011

Small Infectious PrP^{res} Aggregates

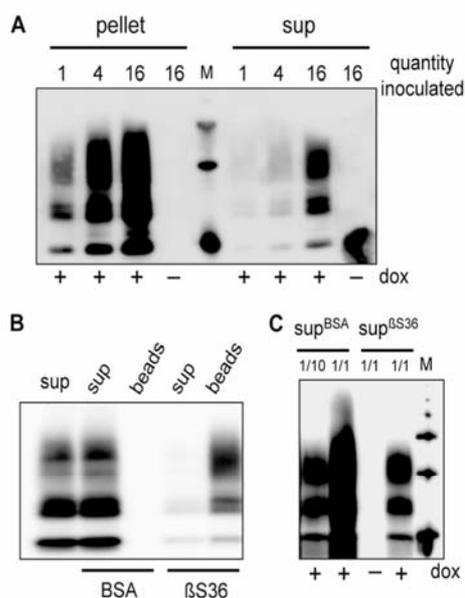


FIGURE 2. PrP^{res} from the soluble fraction is infectious in the Rov cell-based assay. *A*, pellet and supernatant (*sup*) fractions were recovered after $100,000 \times g$ centrifugation of PK-digested lysates from infected Rov cells. Equivalent portions (from 1 to 16, 1 corresponds to $175 \mu\text{g}$ of proteins in the original lysate) of each fraction were used to infect target Rov cultures. Three weeks later the cultures were solubilized and analyzed for the presence of PrP^{res}. No PrP^{res} was detected when inoculated Rov cultures did not express ovine PrP (*dox*⁻). *B*, PrP^{res} was depleted from the supernatant fraction. PrP^{res} remaining in the supernatant fraction (*sup*) after immunoprecipitation with $\beta 536$ mAb- or BSA-coupled magnetic beads was analyzed. Immunoprecipitated PrP^{res} was also analyzed in parallel (*beads*). The anti-PrP mAb used to reveal the blot was coupled with peroxidase. *C*, Rov cells were infected with immunodepleted supernatants. Various amounts (from 1/10 to 1/1) of either $\beta 536$ -depleted supernatants (*sup* ^{$\beta 536$}) or control BSA-depleted supernatants (*sup* ^{BSA}) were used to infect target Rov cells. Four weeks later, the cultures were solubilized and analyzed for the presence of PrP^{res}. No PrP^{res} was detected when inoculated Rov cultures did not express ovine PrP (*dox*⁻).

precipitation and resuspended in PBS by sonication along with the original insoluble pellet. Immunoblot analysis of the supernatant and pellet fractions showed that PrP^{res} was still present in $100,000 \times g$ supernatants (Fig. 1*D*). Importantly, this PrP^{res} species quantitatively remained in the soluble fraction when the supernatant was submitted to a second $100,000 \times g$ centrifugation step (Fig. 1*E*). Quantification through Western blot analysis of various amounts of the two fractions indicated that PrP^{res} in the supernatant represents $12\% \pm 8\%$ of total PrP^{res} (mean \pm S.D., four determinations from three different infected cultures). To test for the presence of infectivity in the soluble fraction, we first used the Rov cell-based assay. Uninfected Rov cells were exposed to increasing equivalent amounts of the soluble and insoluble fractions and analyzed 3 weeks later for the presence of PrP^{res}. Although no PrP^{res} was observed in control cells not expressing ovine PrP, the dose-dependent presence of PrP^{res} in Rov cells challenged with the $100,000 \times g$ supernatant demonstrated that the supernatant was infectious (Fig. 2*A*). After quantification of PrP^{res} levels in the cultures exposed to the different amounts of the soluble and insoluble fractions, we estimated that $18.5\% \pm 5\%$ of infectivity was soluble (mean \pm S.D., four determinations from three experiments). To investigate the physical support for infectivity, we sought to deplete PrP^{res} from the infectious supernatants by immunoprecipita-

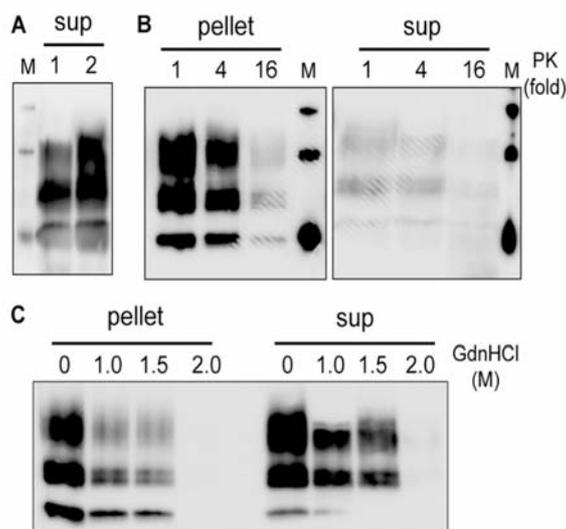


FIGURE 3. PrP^{res} from supernatant is not generated through PK digestion of insoluble PrP^{res}, and both species have similar resistance to PK digestion and GdnHCl denaturation. *A*, supernatant fractions were recovered after a 1-h centrifugation at $10,000 \times g$ before (*lane 1*) or after (*lane 2*) PK digestion of cell lysates. Supernatant from the undigested lysate was PK-treated, and both samples were analyzed for PrP^{res} by Western blotting. *B*, cell lysates were digested with increasing amounts of PK (1 stands for $1 \mu\text{g}$ of PK/ $250 \mu\text{g}$ of cellular proteins) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 h. Pellets and supernatants (*sup*) were tested for PrP^{res} by Western blotting. *C*, pellet and supernatant (*sup*) fractions were incubated in the presence of the indicated concentrations of GdnHCl for 1 h. The samples were then digested with PK and analyzed for PrP^{res} by Western blotting.

tion with $\beta 536$, a monoclonal antibody that specifically immunoprecipitates PrP^{res} aggregates (22). $\beta 536$ - but not BSA-coupled magnetic beads removed most (85%, $n = 2$) of the PrP^{res} in the $100,000 \times g$ supernatants (Fig. 2*B*). Strikingly, $\sim 90\%$ ($n = 2$) of infectivity was also removed from the immunodepleted supernatants, as assessed by Rov cell-based assay (Fig. 2*C*). Soluble and insoluble fractions were also inoculated into *tg338* transgenic mice highly susceptible to the ovine prion strain used in this study (19). All of the inoculated mice died with typical neurological symptoms and accumulated abnormal PrP in their brains (data not shown). Mice inoculated with the pellet and supernatant fractions died 74 days \pm 4 days ($n = 5$) and 73 days \pm 4 days ($n = 4$) after inoculation, respectively. Mice inoculated with fractions from uninfected cultures remained clinically healthy and were killed at 110 days. These similar incubation periods correspond to infectious titers within the same order of magnitude and confirm that the $100,000 \times g$ supernatants are infectious. Altogether, our data show that PK-resistant PrP recovered in a detergent-soluble fraction is infectious.

PrP^{res} Is Recovered in the Detergent-soluble Fraction of Infected Neurons and Prior to PK Digestion—We then asked whether PrP^{res} in the soluble fraction could be a by-product generated during PK digestion of insoluble PrP^{res}. To explore this possibility, analytical volumes (<1 ml) of lysates were centrifuged before PK digestion. The soluble fractions were then PK-digested and analyzed by Western blotting. Fig. 3*A* shows that the PrP^{res} species can also be detected in the supernatants of non-PK-digested cell lysates, indicating that PK digestion is not required to generate this PrP^{res} species. To examine whether PrP^{res} species in the soluble and insoluble fractions

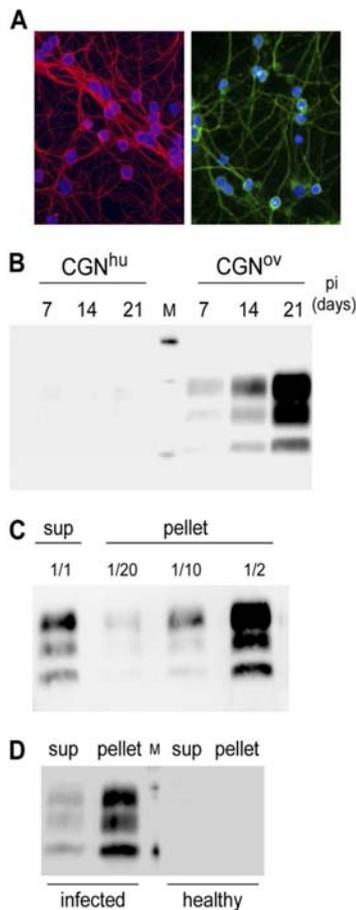


FIGURE 4. PrP^{res} is present in detergent-soluble fractions from infected cultures of CGNs and from infected brain tissue. *A*, fluorescence analysis of *tg338*-derived cerebellar granule neurons (CGN^{OV}) stained for microtubule-associated protein 2 (green, right) and β -tubulin III (red, left) after 13 and 20 days *in vitro*, respectively. Nuclei are in blue. *B*, kinetics of PrP^{res} accumulation in infected CGN^{OV} cultures. Proteins (75 μ g) from cell lysates obtained at 7, 14, and 21 days postinfection (pi) were PK-digested and centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 h. The pellets were analyzed to detect PrP^{res}. *C*, detection of PrP^{res} in the soluble fraction of PK-digested CGN^{OV} lysates. Proteins (75 μ g) from infected CGN^{OV} cultures (21 days postinfection) were PK-digested and centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 h. PrP^{res} in the supernatant (sup) and in various portions of the pellet were analyzed by Western blotting. *D*, brain tissues from terminally sick or healthy *tg338* mice. Tissues were solubilized, and 50 μ g of brain proteins were PK-digested and centrifuged at $10,000 \times g$ for 1 h. PrP^{res} in the pellet and the supernatant (sup) fractions was analyzed.

differ in their PK resistance, cell lysates from infected cells were digested with increasing amounts of PK before isolation of the soluble and insoluble fractions. Immunoblot analysis (Fig. 3B) revealed that PrP^{res} in the supernatant is as PK-resistant as insoluble PrP^{res}. To study the structural stability of PrP^{res} in the soluble and insoluble fractions, we performed guanidine denaturation assays. Both fractions were incubated with increasing amounts of GdnHCl and then digested with PK. Immunoblot analysis indicated that PrP^{res} species in the soluble and insoluble fractions have similar stabilities to denaturation by GdnHCl (Fig. 3C).

The ovine prion agent used here can also be propagated in *tg338*-derived neuronal primary cultures (18). Cultured CGNs from either *tg338* (CGN^{OV}) (Fig. 4A) or transgenic mice express-

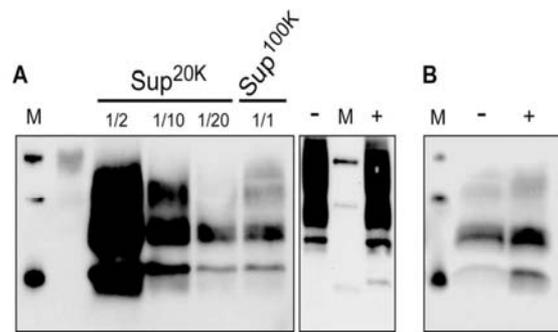


FIGURE 5. PrP^{res} from supernatants is not fully soluble. *A*, left, PK-digested lysates from infected Rov cells were centrifuged in a TLA-110 rotor at $20,000$ or $100,000 \times g$ for 1 h. Various portions of the corresponding supernatants (Sup^{20K} or Sup^{100K}, respectively) were analyzed for PrP^{res} by Western blotting. Right, undigested lysates from uninfected Rov cells were analyzed for normal PrP before (–) or after (+) $100,000 \times g$ centrifugation. Please note that these ultracentrifugation conditions correspond to $100,000 \times g$ or $500,000 \times g$ with the SW32 rotor used previously (see “Experimental Procedures”). *B*, soluble fraction of a PK-digested cell lysate was ultracentrifuged for 1 h at $200,000 \times g$ in a TLA-110 rotor either directly (–) or through a 10% (w/v) sucrose cushion (+). The pellets were analyzed for PrP^{res} by Western blotting.

ing a heterologous PrP (human PrP, CGN^{hu}, used as nonpermissive, negative controls) were infected 3 days after plating. The cells were solubilized and analyzed 7, 14, or 21 days after infection. A marked, time-dependent accumulation of PrP^{res} was observed in CGN^{OV}, demonstrating active prion multiplication in the primary neuronal cultures derived from *tg338* mice (Fig. 4B). Analysis of supernatant and pellet fractions from PK-digested CGN^{OV} lysates revealed that $12.5\% \pm 4\%$ of the total PrP^{res} was in the soluble fraction (mean \pm S.D. of five determinations from two different infected CGN^{OV} cultures) (Fig. 4C). Lastly, brain homogenates from *tg338* mice, either healthy or at the terminal stage, were solubilized in the Triton-DOC lysis buffer, subjected to PK digestion, and centrifuged. Analysis of the supernatant and pellet fractions showed that PrP^{res} was also present in the soluble fraction of infected brain tissue (Fig. 4D).

Infectious PrP^{res} in the Detergent-soluble Fraction Are Small Aggregates—As a first step to investigate the reasons for apparent solubility of PrP^{res} (small size or low density), we tested whether PrP^{res} in the soluble fraction would be pelleted if centrifuged at a higher speed. To apply higher centrifugation forces, we used a TLA-110 rotor (Beckmann). Because its *k* factor is about 5-fold less than that of SW32, TLA-110 is about 5-fold more efficient to pellet a given particle (see “Experimental Procedures”), e.g. $20,000 \times g$ supernatants in the TLA-110 are equivalent to $100,000 \times g$ supernatants in SW32. Although normal PrP from uninfected cells remained in the supernatants (Fig. 5A, right panel), data in Fig. 5A, left panel, show that the vast majority ($\sim 95\%$, $n = 2$) of the PrP^{res} in the soluble fraction is pelleted when *g* force was increased to $100,000 \times g$ in the TLA-110 rotor (equivalent to $500,000 \times g$ with SW32). We also performed ultracentrifugation of the soluble fraction through a 10% sucrose cushion. As expected for small aggregates, PrP^{res} did not float in the sucrose and were found in the pellet (Fig. 5B). Cell-based assays showed that infectivity in the $100,000 \times g$ supernatants (Sup^{100K}) was 10-fold lower to that in Sup^{20K} (data not shown). Collectively, these data indicate that infec-

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on March 9, 2011

Small Infectious PrP^{res} Aggregates

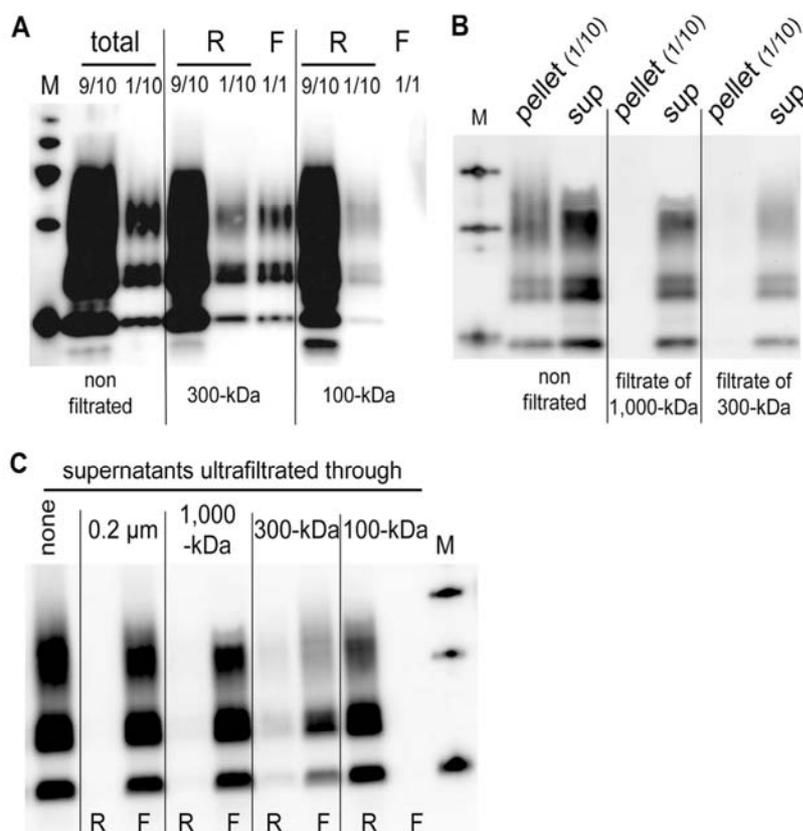


FIGURE 6. PrP^{res} from soluble fractions passes through 300-kDa filters. *A*, analysis of PK-digested lysates before (*total*) or after ultrafiltration through 300-kDa or 100-kDa filters. Retentates (*R*; 1/10 and 9/10 were loaded) and the whole filtrates (*F*) were analyzed for PrP^{res} by immunoblotting. *B*, filtrate fractions obtained after ultrafiltration through 1,000-kDa and 300-kDa filters of PK-digested lysates. Fractions were centrifuged to separate the insoluble (*pellet*) and soluble (*sup*) materials. Insoluble (1/10) and the whole soluble fractions from the filtrates were analyzed for PrP^{res}. *C*, supernatants of centrifuged PK-digested lysates ultrafiltered through the indicated filters. PrP^{res} in the retentates (*R*) and the filtrates (*F*) are shown.

tious PrP^{res} species in the SW32 100,000 × *g* supernatants are not fully soluble.

We then subjected PK-digested cell lysates to ultrafiltration, a convenient alternative to sucrose gradient for separating large PrP^{res} aggregates from other filterable molecules (24, 25). PrP^{res} species in the retained (retentates) and nonretained (filtrates) fractions were analyzed by immunoblotting. Data in Fig. 6*A* show that although most of PrP^{res} was retained, approximately 10% of total PrP^{res} passed through 300-kDa but not through 100-kDa filters. Before ultrafiltration, insoluble PrP^{res} is the major (~90%, Fig. 1) PK-resistant species. This was dramatically different in the filtrates from 1,000-kDa and 300-kDa membranes (Fig. 6*B*), indicating that PrP^{res} in the soluble fraction passed much more readily through these filters than did insoluble PrP^{res}. To confirm that the former quantitatively crosses filters of low molecular mass cutoff, PrP^{res} from the soluble fraction was isolated by centrifugation and then submitted to ultrafiltration through a range of different filters. As expected, PrP^{res} was not retained by 1,000- and 300-kDa filters as it was exclusively detected in the corresponding filtrates (Fig. 6*C*). In contrast, 100-kDa pore size fully retained PrP^{res}. The above data indicate that the infectious PrP^{res} recovered in the detergent-soluble fraction are small aggregates.

DISCUSSION

After longstanding controversies, there is now a wide agreement that prion infectivity is associated with abnormally folded PrP. Historically, abnormal PrP has been operationally defined as PK-resistant and insoluble (26), and a wealth of studies indicates that fractions containing large insoluble PrP^{res} aggregates are infectious. However, it does not imply that infectivity is exclusively associated with large aggregates of PrP^{res} or that they are the more efficient species to promote infection. A number of studies reported successful disaggregation of at least part of prion infectivity by chemical and/or physical treatments. Early experiments showed that sonication of large PrP^{res} aggregates (known as prion rods) in detergent and phospholipids can solubilize PrP^{res} and infectivity (27). Denaturation by chaotropic salts and subsequent renaturation also led to infectivity recovery in low density fractions after sucrose gradients (28), and disruption of prion rods by sonication in detergents liberated infectivity in 100,000 × *g* supernatants (25). More recently, small PrP aggregates, isolated after physical disruption of detergent-extracted aggregates of PrP^{res}, were shown to be more infectious than large ones (29), presumably by providing an increased number of multiplication-competent seeds. Although this study added strong support for small PrP aggre-

gates as more active species to initiate infection, firm evidence for the presence of small PrP^{res} aggregates in infected tissues or cells was lacking. Thus, the biological significance of the aforementioned experimental treatments remained an open question. An important outcome of our study is to show that small infectious PrP^{res} aggregates can be recovered from infected cells after a standard nondenaturing solubilization step in the absence of further treatments. Importantly, these small infectious PrP^{res} aggregates were also observed in the absence of PK digestion, indicating that they were not derived from PK proteolysis of the large aggregates. They were conveniently separated from large PrP^{res} aggregates by a solubility assay and/or by ultrafiltration through low molecular weight cutoff filters. Two lines of evidence indicate that the PrP^{res} species in the detergent-soluble 100,000 × *g* supernatants are small PrP aggregates. First, and in contrast to normal PrP, these small PrP^{res} species are eventually pelleted after ultracentrifugation at higher centrifugal forces. Second, they are immunoprecipitated by β S36, a mAb directed against aggregated PrP from infected tissue and not recognizing normal PrP (22). However, further purification will be required to determine their molecular composition.

The population of small PrP^{res} aggregates, which represents roughly 10% of the total PrP^{res} in infected Rov cells, is also observed in infected primary cultures of neurons and in brain tissue of infected mice, suggesting that it is produced by a wide variety of infected cells. An important issue is whether these small PrP^{res} aggregates are more infectious than the large ones, as shown for small aggregates generated *in vitro* (29). Studies are now ongoing to address precisely this question. Another interesting point will be to determine whether the formation of small and large PrP^{res} aggregates is due to different metabolic pathways. Alternatively, small aggregates could be metabolic intermediates in the formation of larger deposits. They could also be a cell-mediated catabolic product of large aggregates, contributing to an efficient transmission of infection during cell divisions (2). So far, and in contrast to yeast in which hsp104-dependent fragmentation is required for prion maintenance during successive cell divisions (30), no such activity has been identified for mammalian prions.

The discovery of small infectious PrP^{res} aggregates further documents the diversity of abnormal PrP extracted from infected cells and tissues. Other small PrP aggregates have been detected and isolated in infected cells and tissues (11–15). In contrast to the small infectious PrP^{res} aggregates described here, the previously described small PrP aggregates are sensitive to PK digestion, and no evidence indicates that they can transmit disease (31, 32). Small infectious PrP^{res} aggregates, such as those described here, might give a molecular basis for the perplexing presence of infectivity in soluble preparations of infected hamster brain (33). Also, in a very recent study (10), density gradients were used to fractionate detergent-solubilized brain homogenate from *tg338* mice infected with the ovine prion agent (PG127) used here. Strikingly, fractions of low density, well separated from the bulk of large PrP^{res} aggregates in heavier fractions, contained high levels of infectivity. The molecular basis of infectivity in the light fractions, not

addressed in Tixador's study, may involve the small PrP^{res} aggregates characterized in our work.

Several neurodegenerative disorders, including Parkinson, Alzheimer, Huntington, and prion diseases, are characterized by the misfolding and the aggregation of specific proteins (34). Although early hypotheses considered the large insoluble aggregates as the only toxic entities, an important emerging view is that small soluble prefibrillar assemblies may be more efficient biological entities to promote cell death (35, 36). The toxic entities responsible for prion-mediated neuronal cell death and the underlying mechanisms are not yet clear (37, 38). The identification of naturally produced small PrP^{res} aggregates in cultured neurons that will eventually undergo infection-dependent apoptosis (18, 39) may be useful to determine the potential neurotoxicity of these entities.

Acknowledgments—We thank J. Grassi (CEA, Saclay, France) for β S36 and Sha31 mAbs, H. Laude and J. L. Vilotte (INRA, Jouy-en-Josas, France) for *tg338* mice, J. M. Torres (CISA-INIA, Madrid, Spain) for transgenic mice expressing the human PrP, M. C. Miquel and A. Bertholet for sharing expertise on primary neuronal cultures, L. Goulème for immunofluorescence analysis of CGN cultures, R. Melki (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) for helpful initial discussions on ultrafiltration, and V. Beringue and V. Setola for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Prusiner, S. B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13363–13383
2. Weissmann, C. (2004) *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 861–871
3. Collinge, J., and Clarke, A. R. (2007) *Science* **318**, 930–936
4. Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. (1982) *Science* **218**, 1309–1311
5. Prusiner, S. B. (1992) *Biochemistry* **31**, 12277–12288
6. Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. (2008) *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 11–40
7. Soto, C., and Castilla, J. (2004) *Nat. Med.* **10**, S63–S67
8. Barron, R. M., Campbell, S. L., King, D., Bellon, A., Chapman, K. E., Williams, R. A., and Manson, J. C. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 35878–35886
9. Lasmézas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J., and Dormont, D. (1997) *Science* **275**, 402–405
10. Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H., and Beringue, V. (2010) *PLoS Pathog.* **6**, e1000859
11. Pastrana, M. A., Sajani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C., and Requena, J. R. (2006) *Biochemistry* **45**, 15710–15717
12. Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1998) *Nat. Med.* **4**, 1157–1165
13. Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., Miller, B. L., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3501–3506
14. Thackray, A. M., Hopkins, L., and Bujdoso, R. (2007) *Biochem. J.* **401**, 475–483
15. Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., and Taraboulos, A. (2002) *Biochemistry* **41**, 12868–12875
16. Caughey, B., Baron, G. S., Chesebro, B., and Jeffrey, M. (2009) *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 177–204
17. Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madeline, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S., and Laude, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4055–4059
18. Cronier, S., Laude, H., and Peyrin, J. M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12271–12276

Small Infectious PrP^{res} Aggregates

19. Le Dur, A., Béringue, V., Andréoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L., and Laude, H. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16031–16036
20. Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., and Laude, H. (2001) *J. Virol.* **75**, 5977–5984
21. Féraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Créminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., and Grassi, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 11247–11258
22. Morel, N., Simon, S., Frobert, Y., Volland, H., Mourton-Gilles, C., Negro, A., Sorgato, M. C., Créminon, C., and Grassi, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30143–30149
23. Vilette, D. (2008) *Vet. Res.* **39**, 10
24. Hecker, R., Taraboulos, A., Scott, M., Pan, K. M., Yang, S. L., Torchia, M., Jendroska, K., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1992) *Genes Dev.* **6**, 1213–1228
25. Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M. A., and Prusiner, S. B. (1996) *J. Virol.* **70**, 1714–1722
26. Prusiner, S. B. (1982) *Science* **216**, 136–144
27. Gabizon, R., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 4017–4021
28. Manousis, T., Verghese-Nikolakaki, S., Keyes, P., Sachsamoglou, M., Dawson, M., Papadopoulos, O., and Sklaviadis, T. K. (2000) *J. Gen. Virol.* **81**, 1615–1620
29. Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. (2005) *Nature* **437**, 257–261
30. Romanova, N. V., and Chernoff, Y. O. (2009) *Protein Pept. Lett.* **16**, 598–605
31. Cronier, S., Gros, N., Tattum, M. H., Jackson, G. S., Clarke, A. R., Collinge, J., and Wadsworth, J. D. (2008) *Biochem. J.* **416**, 297–305
32. Deleault, A. M., Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R., and Supattapone, S. (2008) *J. Gen. Virol.* **89**, 2642–2650
33. Berardi, V. A., Cardone, F., Valanzano, A., Lu, M., and Pocchiari, M. (2006) *Transfusion* **46**, 652–658
34. Selkoe, D. J. (2003) *Nature* **426**, 900–904
35. Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003) *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267–298
36. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112
37. Harrison, C. F., Barnham, K. J., and Hill, A. F. (2007) *J. Neurochem.* **103**, 1709–1720
38. Soto, C. (2008) *Dev. Cell* **15**, 339–341
39. Carimalo, J., Cronier, S., Petit, G., Peyrin, J. M., Boukhtouche, F., Arbez, N., Lemaigre-Dubreuil, Y., Brugg, B., and Miquel, M. C. (2005) *Eur. J. Neurosci.* **21**, 2311–2319

Conclusions

L'analyse de la PrP^{res} dans les microvésicules sécrétées par les cellules ovRK13 infectées par la souche ovine PG127 nous a permis de mettre en évidence des formes de PrP^{res} qui semblaient moins agrégées que la PrP^{res} classique, très insoluble. Dans ce travail, nous avons caractérisé plus avant les propriétés de ces formes anormales.

Nous observons, après solubilisation des cultures ovRK13 infectées par la souche PG127, une certaine diversité quant aux propriétés biochimiques de la PrP anormale. La majorité de la PrP anormale résistante à la PK est facilement sédimentable par centrifugation. Elle correspond à la PrP^{res} fortement agrégée, classiquement décrite. Nous montrons qu'environ 10% de la PrP^{res} reste dans la fraction soluble après ultracentrifugation à 100 000 xg. Ces entités ne sont cependant pas totalement solubles car, à la différence de la protéine PrP^c normale, elles sédimentent à des vitesses supérieures (> 500 000g). Contrairement à la PrP^{res} très agrégée, ces entités ne sont pas retenues par des filtres de 300 kDa de cut-off. Nous pensons qu'elles correspondent à des petits agrégats de PrP^{res}. Leur détection dans des cultures primaires de neurones infectés et dans des homogénats de tissu cérébral montre qu'ils ne sont pas spécifiques au modèle cellulaire RK13. Les expériences d'inoculation à l'animal et aux cultures cellulaires (tests cellulaires) démontrent que ces petits agrégats sont infectieux. Nous ne savons cependant pas encore s'ils sont plus infectieux que les formes de PrP^{res} très agrégées.

Il ne semble pas que ces petits agrégats aient pour origine l'action de la PK sur la PrP^{res} très agrégée. En effet, les surnageants de lysats cellulaires centrifugés avant action de la PK contiennent ces formes peu sédimentables. Ces petits agrégats ne présentent pas une résistance moindre à la digestion par la PK. De la même façon, leur résistance à la dénaturation par un composé chaotrope (guanidine) est similaire à celle de la PrP^{res} très agrégée. Nous ne savons pour l'instant pas comment ces espèces sont générées. Ces entités pourraient être des intermédiaires qui évoluent ensuite vers des états d'agrégation plus importants. A l'inverse, les chemins de biosynthèse conduisant aux formes très ou peu agrégées pourraient être différents.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la sécrétion des prions dans le milieu extracellulaire et aux propriétés biochimiques des formes anormales de la protéine PrP. Les deux principales conclusions de ce travail sont les suivantes. Tout d'abord, le cycle infectieux des prions inclut une étape de sécrétion de ces agents dans l'espace extracellulaire et ce, en association avec des microvésicules membranaires d'origine cellulaire (exosomes). Ce phénomène a été observé pour les quatre souches infectieuses que nous avons étudiées. On peut donc émettre l'hypothèse qu'il s'agit là d'un phénomène général, peut-être nécessaire à la multiplication stable des prions en culture cellulaire. Nos données indiquent en outre que toutes les souches ne sont pas externalisées avec la même efficacité. En effet, la souche ovine PG127 est plus efficacement sécrétée que les autres souches étudiées.

Par ailleurs, et c'est le 2nd point que nous souhaitons souligner, l'analyse biochimique de la PrP^{res} dans les microvésicules secrétées a permis d'y détecter des formes de PrP^{res} peu agrégées. Cette observation inattendue est à l'origine d'une analyse détaillée des propriétés biochimiques de la PrP^{res}. La description et la caractérisation de ce que nous pensons être de petits agrégats de PrP^{res} illustre la diversité des formes de PrP anormale produites lors de la multiplication des prions et nous permet d'émettre certaines hypothèses quant à leur rôle dans la physiopathologie de ces maladies.

Développement d'un test de titration en culture cellulaire

Depuis plus d'une quarantaine d'années la détection et la titration des prions requièrent l'inoculation expérimentale à des animaux, le plus souvent des rongeurs de laboratoire. Ces techniques ont été déterminantes pour nombre d'études, comme par exemple la purification de l'agent infectieux et l'étude de sa distribution dans l'organisme. Cependant, leur lourdeur et leur coût sont des freins majeurs pour de nombreux projets de recherche, même pour les laboratoires qui disposent d'animaleries dédiées. L'identification de lignées cellulaires permissives aux prions, l'optimisation des techniques d'infection et de détection biochimique de la PrP anormale ont permis d'envisager des méthodes de titration en culture cellulaire. Au début des années 2000, le laboratoire de C. Weissmann, pionnier en ce domaine, isola, à partir de la lignée cellulaire N2a, des sous-clones extrêmement permissifs à certaines souches de prions murins. L'utilisation de ces clones cellulaires donna lieu au développement d'un test cellulaire (Scrapie Cell Assay, SCA) permettant de titrer des échantillons infectieux en quelques semaines (contre au moins 6 mois en souris) avec une

sensibilité similaire, voire meilleure, à celle de la titration chez l'animal (117). Preuve était faite que la titration en culture était une alternative crédible à l'utilisation des animaux et de nombreuses études ont par la suite utilisé ce nouvel outil (75, 76, 86, 129, 141, 195, 215). Cependant, les cellules N2a se sont avérées permissives qu'à des souches murines de prions, limitant de fait la titration en culture à des souches expérimentales de prions.

Il y a quelques années, notre laboratoire a découvert qu'une lignée cellulaire épithéliale (RK13) était permissive à un panel de souches infectieuses relativement large (63, 244). Lorsque ces cellules expriment après transfection la protéine PrP^c adéquate, elles sont capables de propager efficacement et stablement des prions d'origine murine, de campagnol, ovine ou de cervidés (243) (160) (28). En prenant comme modèles une souche ovine (PG127) et une souche murine (RML), nous avons montré que ces cellules sont non seulement permissives mais en outre suffisamment sensibles pour développer un test de titration cellulaire performant. Ce test se déroule sur 3 à 4 semaines et est très reproductible. Cette méthode est extrêmement simple à mettre en œuvre dans la mesure où il n'est pas nécessaire de sous-cultiver les cultures inoculées avant leur analyse. Enfin, dans sa version longue (2 mois), la titration en culture des souches PG127 et RML est aussi sensible que la titration chez l'animal (en souris *tg338* et *tg20*, respectivement). Des expériences actuellement en cours au laboratoire pour optimiser les conditions d'inoculation des cellules suggèrent que la sensibilité de la titration en culture peut encore être améliorée. Nous pensons que les avantages de cet outil cellulaire (en particulier le spectre assez large de souches auxquelles il peut être appliqué et sa facilité d'utilisation) devraient contribuer à ce que la titration en culture devienne une réelle alternative à l'utilisation des animaux. En tout état de cause, son utilisation a été déterminante pour notre étude quantitative de la sécrétion des prions dans le milieu extracellulaire.

Les prions utilisent les exosomes pour leur sécrétion dans le milieu extracellulaire

Les prions ne sont pas des agents infectieux qui restent exclusivement associés aux cellules dans lesquels ils se multiplient. Le groupe de G. Raposo (Institut Curie), en collaboration avec notre laboratoire, a démontré il y a quelques années que la protéine PrP^c transite dans les MVBs, structures endosomales dont la lumière contient des microvésicules (ILVs). Ces organelles intracellulaires peuvent évoluer en lysosomes permettant ainsi la dégradation du matériel protéique par les hydrolases acides. Les MVBs peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique, libérant ainsi leur contenu dans l'espace extracellulaire.

Les cellules ovRK13 sécrètent, de façon constitutive dans le milieu de culture, des exosomes à la surface desquels la PrP^c est détectée. Lorsque ces cellules sont infectées par la souche de prions PG127, les exosomes sont alors infectieux et contiennent de la PrP^{res} (81). Dans ce travail, nous avons généralisé cette observation. En utilisant des cultures cellulaires infectées par quatre souches infectieuses provenant de 3 espèces différentes (ovine, murine et de campagnol), nous avons montré que dans chacun de ces paradigmes les cellules sécrètent activement l'agent infectieux et que dans tous les cas, l'agent infectieux (et la PrP^{res}) est principalement associé aux exosomes sécrétés par les cellules. Cependant, et de façon reproductible, une fraction minoritaire mais néanmoins détectable de l'agent infectieux ne semble pas associé à des microvésicules. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées. Il est possible que des particules lipoprotéiques puissent servir de véhicule extracellulaire à la PrP anormale. En effet, certaines protéines attachées par l'ancre GPI ainsi que des protéines liées de façon covalente à des lipides peuvent être sécrétées et transférées à d'autres cellules via leur association à des particules lipoprotéiques. Ce phénomène est bien documenté chez la drosophile où la sécrétion des morphogènes Wnt and Hedgehog associés à des particules lipoprotéiques contrôle la différenciation durant le développement embryonnaire (74) (161). En raison de leur monocouche phospholipidique, ces particules ne sont pas sédimentables dans les conditions utilisées pour sédimenter les microvésicules membranaires (ultracentrifugation à 100 000 xg pendant 1h). On peut donc envisager la possibilité que l'ancre GPI permette l'association de la PrP anormale à de telles structures. En faveur de cette hypothèse, un travail a montré que la PrP anormale extraite de cerveau est effectivement capable de se fixer à des lipoprotéines plasmatiques (VLDL et LDL) (194).

Globalement, notre travail ainsi que des études précédentes menées avec d'autres types de cultures infectées (81, 241) soulignent le caractère général de l'association des prions avec les exosomes sécrétés et indiquent donc que les MVB semblent des structures intracellulaires très importantes dans l'export de la PrP anormale. Les MVBs et les exosomes semblent impliqués dans la sécrétion d'autres protéines anormalement repliées. Comme cela a été détaillé dans la partie 2 de l'introduction, de nombreuses protéines intracellulaires mal repliées peuvent être exportées à l'extérieur des cellules et initier ainsi un phénomène agrégatif dans de nouvelles cellules cibles. Si les mécanismes de sécrétion à l'origine de ces observations très récentes sont loin d'être tous élucidés, la voie endosomale et les exosomes semblent impliqués, au moins dans certains cas. En effet, le peptide A β à l'origine des plaques amyloïdes observées dans la maladie d'Alzheimer, est détecté dans les MVBs des neurones centraux de plusieurs espèces animales y compris chez l'homme (218) ainsi que dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (125). Par la suite, des études menées sur des cultures cellulaires exprimant une APP sauvage ou mutée ont montré que le clivage générant le peptide A β se produit dans la voie endosomale et qu'une partie du peptide A β

s'accumule dans les MVBs avant d'être externalisé en association avec les exosomes (183, 203, 247). Des protéines exosomales (flotiline-1, Alix) ont par ailleurs été détectées dans les plaques amyloïdes (183), suggérant qu'*in vivo*, les exosomes pourraient contribuer à la formation des plaques. Enfin, une étude très récente montre que l' α -synucléine, dont l'agrégation est impliquée dans la maladie de Parkinson, pourrait là encore est exportée dans le milieu extracellulaire via les exosomes. Le milieu de culture provenant de cellules exprimant l' α -synucléine contient des exosomes porteurs d' α -synucléine monomérique et oligomérique (79). De façon très intéressante, des tests de viabilité indiquent que les exosomes contenant l' α -synucléine sont cytotoxiques. Enfin, il est intéressant de noter que le phénomène agrégatif MVB- et exosome-dépendant n'est pas nécessairement lié à des conditions pathologiques. La fibrillation d'un fragment de la protéine Pmel17 survient dans les MVBs lors de la différenciation des mélanocytes (25).

Rôle des exosomes dans le transfert des prions de cellule à cellule

Les techniques de cocultures entre cellules infectées et cellules saines permettent l'étude expérimentale des mécanismes de transfert intercellulaire et les données disponibles dans la littérature suggèrent qu'ils pourraient être multiples. Le contact entre des cellules infectées (y compris si elles ont été préalablement tuées) et des cellules cibles provoque leur infection (113, 167). Par ailleurs, des fils métalliques infectieux (76) ou un support plastique infectieux (publication 1) peuvent, par simple contact, infecter des cellules cibles. Ces résultats suggèrent que le contact entre la PrP anormale, qu'elle soit localisée à la membrane plasmique d'une cellule infectée ou sur un support physique infectieux, et la PrP^c à la surface d'une cellule saine peut induire la conversion et l'infection de la cellule receveuse.

D'autres travaux privilégient la formation de structures spécialisées pour permettre le passage des prions entre les cellules. Les nanotubes, décrits récemment, permettent d'établir des jonctions transitoires entre cellules, structures à l'intérieur desquelles peuvent transiter non seulement diverses molécules mais aussi des vésicules ou des organelles (189). Des cocultures entre cellules dendritiques infectées et neurones en culture primaire indiquent que la PrP anormale pourrait transiter par ces structures et infecter les neurones cibles (91, 124). Enfin, de nombreux autres travaux montrent que des cellules infectées secrètent des prions dans le milieu de culture (243). Dans tous les cas où cela a été étudié, il s'avère que les prions sont au moins en partie associés aux microvésicules exosomales (81, 241) qui sont alors infectieux vis à vis de l'animal ou de cultures cellulaires. La contribution relative de ces différents mécanismes (contacts cellulaires versus prions acellulaires) dans la dissémination de

ces agents au sein d'une culture reste difficile à apprécier pour l'instant. En effet, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion des exosomes et leur capture par les cellules cibles et ceux nécessaires au ciblage de la PrP dans les exosomes est un champ de recherche dynamique mais très récent (29). On peut cependant espérer que ces recherches déboucheront sur des outils permettant de moduler le ciblage de la PrP dans les exosomes ou d'inhiber spécifiquement la sécrétion et/ou la capture des exosomes afin de mieux définir leur rôle dans la dissémination intercellulaire des prions.

Les exosomes jouent-ils un rôle dans la physiopathologie de la maladie ?

Les exosomes sont présents dans des fluides biologiques dont certains (sang, lait, urine) deviennent infectieux au cours de la maladie. Dans le cadre d'un contrat ANR coordonné par le laboratoire et incluant les équipes de G. Raposo (Institut Curie), P. Leblanc (ENS Lyon) et S. Lehmann (IGH Montpellier), notre équipe a initié une étude pour déterminer si les exosomes isolés d'animaux infectés sont infectieux. Pour l'instant, notre étude s'est essentiellement focalisée sur le plasma. Le modèle animal utilisé est le mouton car la physiopathologie de la tremblante classique chez le mouton est très proche de celle de l'homme infecté par l'agent du vCJD (108). La taille de l'animal permet en outre de travailler sur des volumes sanguins similaires à ceux utilisés en médecine humaine. Le plasma a été préparé à partir de moutons en phase terminale d'infection par la souche PG127 et certains échantillons ont été directement transfusés à des moutons sains afin de déterminer leur potentiel infectieux. Les fractions microvésiculaires contenant les exosomes plasmatiques ont aussi été isolées. Leur potentiel infectieux est déterminé par test cellulaire (cellules ovRK13) et par inoculation à des souris permissives à cette souche (tg338). Cette étude permettra d'apporter des informations sur la présence de prions dans le plasma et de déterminer le cas échéant si les microvésicules plasmatiques sont infectieuses. Outre son intérêt scientifique, l'éventualité que le plasma puisse contenir des prions associés à des microvésicules membranaires pourrait avoir des répercussions importantes en termes de sécurité sanitaire des produits dérivés du sang.

Quels sont les facteurs qui modulent l'efficacité d'externalisation des prions ?

Notre travail indique la proportion de prions libérés peut varier de façon importante en fonction du paradigme expérimental. En effet, la proportion des prions ovins PG127 libérés est environ 25 fois plus importante que celle des prions murins 22L (4% versus 0,15%). Deux hypothèses peuvent être avancées.

Selon la première, la souche infectieuse pourrait être responsable (PG127 induisant plus efficacement sa libération que 22L) alors que selon la 2^{nde}, cette différence pourrait avoir pour origine les clones cellulaires utilisés (le clone de ovRK13 étant alors un sécrèteur d'exosomes plus efficace que le clone de moRK13, et ce indépendamment de la nature de la souche). Cette 2^{nde} possibilité aurait pu être évitée si nous avions pu utiliser, comme cela était prévu initialement, des mélanges de clones cellulaires en lieu et place de clones individuels. Malheureusement, et malgré des essais répétés, les mélanges de clones cellulaires moRK13 et voRK13 ne propagent pas de façon stable et efficace les différentes souches murines et de campagnol : après infection de ces cultures, les quantités de Pr^{Pres} décroissent graduellement au cours des passages successifs. Cependant, les résultats dont nous disposons ne militent pas en faveur de cette possibilité. En effet, et sur la base de l'immunodétection de la flotiline- 1 et de EFla, le clone ovRK13 ne semble pas sécréter plus d'exosomes que le clone moRK13 ou que le clone voRK13, et ce, que les cultures soient infectées ou non. Dans notre modèle, la multiplication des prions ne semble pas stimuler la sécrétion des exosomes et les prions utilisent les exosomes constitutivement sécrétés par les cellules pour être exportés dans l'espace extracellulaire. Nous privilégions donc la possibilité selon laquelle la souche ovine PG127 est, d'une façon ou d'une autre, incorporée plus efficacement dans les exosomes que les autres souches étudiées.

Pour confirmer cette hypothèse nous allons tester les exosomes provenant d'un mélange d'une vingtaine de clones ovRK13 différents infectés par la souche PG127 : la proportion de prions PG127 associés aux exosomes nous permettra de confirmer (ou infirmer) l'hypothèse selon laquelle la souche est le facteur déterminant. De façon complémentaire, et en collaboration avec P. Leblanc, nous allons par ailleurs tester les exosomes provenant de cellules totalement différentes (cellules neurogliales de souris : MovS (12)) infectées par la souche ovine PG127. Si la nature de la souche infectieuse est l'élément déterminant, nous nous attendons à ce que des cellules MovS/PG127 sécrètent efficacement l'agent infectieux. G. Raposo et P. Leblanc, dans le cadre du projet ANR, tentent d'identifier les mécanismes moléculaires responsables du ciblage de la protéine PrP vers les MVBs et dans les ILVs. L'approche générale consiste à surexprimer ou inhiber l'expression de différents constituants du complexe multiprotéique ESCRT (tsg101, Hrs, Alix) ainsi qu'à utiliser certains mutants dominants négatifs. La distribution de la PrP cellulaire est ensuite analysée par immunofluorescence ou par microscopie électronique. D'un point de vue quantitatif, l'association de la protéine PrP aux exosomes sera déterminée après isolement de la fraction microvésiculaire provenant des différents milieux de cultures. Il faut cependant noter que l'analyse quantitative ne peut être menée que si l'efficacité de transfection est excellente. L'analyse qualitative du trafic de la PrP anormale dans les cellules infectées en réponse à la perturbation du complexe ESCRT sera probablement bien plus difficile à analyser dans la

mesure où il existe très peu d'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme anormale de la PrP. Par contre, nous espérons qu'il sera possible de quantifier l'impact de ces perturbations sur la sécrétion de l'agent infectieux.

L'absence de données précises sur la nature des protéines et des mécanismes responsables du ciblage de la PrP anormale vers les MVBs et les ILVs, rendent donc difficile pour l'instant d'établir pourquoi la PrP^{sc} de la souche PG127 pourrait être plus efficacement sécrétée. Nous avons cependant initié une étude des propriétés biochimiques de la PrP^{res} PG127. Si la majeure partie de la PrP^{res} est très insoluble (et correspond à la forme très agrégée classiquement décrite dans les tissus et cellules infectées), environ 10% est présente sous une forme beaucoup moins insoluble. Ces résultats indiquent que la PrP^{res} qui s'accumule dans les cellules infectées, ainsi que celle exportée au sein des exosomes, n'est pas une espèce homogène. Cette diversité est une notion récente mais pas nouvelle. Deux équipes ont isolé et caractérisé des formes de PrP anormales peu agrégées (voir 1.4.3). A la différence de celles observées dans notre travail, ces formes sont sensibles à la digestion par la PK et on ignore si elles sont infectieuses.

Que des conformères anormalement repliés présentent une certaine diversité de comportement biochimique est également observé dans des maladies impliquant d'autres protéines. Les maladies de Huntington, de Parkinson et d'Alzheimer sont des syndromes neurodégénératifs associés à la présence d'agrégats des protéines huntingtine, α -synucléine et du peptide A β , respectivement qui s'accumulent et sont détectés dans le tissu cérébral sous forme de larges structures (dépôts amyloïdes, fibrilles). Ces structures ont longtemps été considérées comme les entités responsables de la mort neuronale. Cette hypothèse pourrait ne pas être toujours exacte. Il s'avère en effet que le phénomène d'agrégation est un processus dynamique. Les structures agrégées détectables macroscopiquement sont maintenant considérées comme des entités terminales, en équilibre dynamique avec des formes moins agrégées (de type oligomères), quantitativement moins abondantes et plus difficilement détectables, mais biologiquement beaucoup plus actives. Depuis quelques années, ces formes sont considérées plus neurotoxiques que les formes fibrillaires (109, 233). Dans cette hypothèse, une perspective intéressante de notre travail consistera à comparer le pouvoir neurotoxique des formes de PrP^{res} peu ou très agrégées. La nature exacte des formes de PrP anormale infectieuses n'est pas connue. S'il n'est pas contestable que la PrP^{res} très agrégée l'est, de nombreux résultats expérimentaux indiquent qu'elle pourrait ne pas être la seule forme infectieuse. Dans certains modèles, les tissus peuvent être très infectieux en l'absence de PrP^{res} détectable (19, 126) et dans d'autres cas, les fractions les plus infectieuses sont loin d'être celles qui contiennent le plus de PrP^{res} (230). Par ailleurs, le groupe de B. Caughey a montré que la fragmentation (réalisée in vitro) des gros agrégats de

PrP^{res} génère de petites entités (estimées entre 14 à 18 molécules de PrP) bien plus infectieuses (210).

Ces résultats suggèrent que des formes oligomériques pourraient, là encore, être biologiquement plus actives que les formes très agrégées. Nous ignorons si les petits agrégats que nous avons décrits sont plus infectieux que les gros. Sur la base de nos expériences, les petits agrégats représentent environ 10% de la PrP^{res} totale et environ 10% de l'infectiosité, ce qui pourrait laisser penser qu'ils ne sont pas plus infectieux. Cependant, ces données ont été obtenues en utilisant des fractions précipitées par le méthanol, traitement dont on sait maintenant qu'il affecte l'état d'agrégation de la PrP^{res}. Des méthodes plus douces, notamment par fixation de l'infectiosité sur plastique (article 1), seront donc nécessaires pour déterminer précisément si les petits agrégats de PrP^{res} sont, ou non, des entités plus infectieuses. Enfin, s'il s'avère que les prions PG127 sont plus efficacement incorporés dans les exosomes que 22L, l'analyse des propriétés biochimiques des PrP anormales correspondantes pourrait permettre de comprendre quelles sont les caractéristiques importantes pour un ciblage efficace dans les exosomes.

Hypothèses sur la formation des petits agrégats de PrP^{res}

Ces petits agrégats infectieux ne sont pas seulement détectés dans des cultures cellulaires infectés par la souche ovine PG127. Des expériences que je n'ai pas mentionnées dans ce manuscrit indiquent qu'ils sont produits dans des cultures de cellules RK13 infectées par les souches murines 22L et Fukuoka-1 et par la souche de campagnol ainsi que dans la rate de souris infectées. Par contre elles sont peu détectables dans des neurones infectés en culture primaire et dans le cerveau, sauf si les extraits sont préalablement traités par la PK (J. Savistchenko, non publié). De façon frappante, les tissus ou cellules dans lesquels ces petits agrégats sont détectés avant la digestion par la PK sont précisément ceux où la PrP^{res} s'accumule principalement sous forme tronquée (73). L'hypothèse de travail est que la forme tronquée (PrP27-30) est un substrat privilégié pour la formation des petits agrégats. Dans les systèmes biologiques (cellules RK13 ou rate) où la majorité de la PrP anormale est clivée de façon endogène par la machinerie cellulaire, une partie des formes clivées s'associe en petits agrégats. Lorsque la PrP anormale est principalement pleine longueur (neurones en culture et cerveau), le traitement des extraits par la PK est nécessaire à la formation de la PrP27-30 et à l'obtention des formes peu agrégées. Il faut noter que ce clivage intervient dans la voie endocytaire (48) (73), expliquant ainsi la présence des formes peu agrégées dans les exosomes.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abid, K., R. Morales, and C. Soto.** 2010. Cellular factors implicated in prion replication. *FEBS Lett* **584**:2409-2414.
2. **Admyre, C., S. M. Johansson, K. R. Qazi, J. J. Filen, R. Lahesmaa, M. Norman, E. P. Neve, A. Scheynius, and S. Gabrielsson.** 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* **179**:1969-1978.
3. **Aguzzi, A.** 2003. Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves. *Adv Immunol* **81**:123-171.
4. **Aguzzi, A., F. Baumann, and J. Bremer.** 2008. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* **31**:439-477.
5. **Aguzzi, A., and A. M. Calella.** 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* **89**:1105-1152.
6. **Aguzzi, A., M. Heikenwalder, and M. Polymenidou.** 2007. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:552-561.
7. **Aguzzi, A., and L. Rajendran.** 2009. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* **64**:783-790.
8. **Aguzzi, A., C. Sigurdson, and M. Heikenwalder.** 2008. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol* **3**:11-40.
9. **Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig, and M. C. Clarke.** 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**:764-766.
10. **Andreoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J. M. Elsen, and F. Schelcher.** 2002. PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* **83**:2607-2616.
11. **Andreoletti, O., L. Orge, S. L. Benestad, V. Beringue, C. Litaise, S. Simon, A. Le Dur, H. Laude, H. Simmons, S. Lugan, F. Corbiere, P. Costes, N. Morel, F. Schelcher, and C. Lacroux.** 2011. Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog* **7**:e1001285.
12. **Archer, F., C. Bachelin, O. Andreoletti, N. Besnard, G. Perrot, C. Langevin, A. Le Dur, D. Vilette, A. Baron-Van Evercooren, J. L. Vilotte, and H. Laude.** 2004. Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol* **78**:482-490.
13. **Arnold, J. E., C. Tipler, L. Laszlo, J. Hope, M. Landon, and R. J. Mayer.** 1995. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol* **176**:403-411.
14. **Balaj, L., R. Lessard, L. Dai, Y. J. Cho, S. L. Pomeroy, X. O. Breakefield, and J. Skog.** 2011. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* **2**:180.
15. **Barcikowska, M., P. P. Liberski, J. W. Boellaard, P. Brown, D. C. Gajdusek, and H. Budka.** 1993. Microglia is a component of the prion protein amyloid plaque in the Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Acta Neuropathol* **85**:623-627.
16. **Baron, G. S., A. G. Hughson, G. J. Raymond, D. K. Offerdahl, K. A. Barton, L. D. Raymond, D. W. Dorward, and B. Caughey.** 2011. Effect of glycans and the glycoposphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: improved purifications and infrared spectra. *Biochemistry* **50**:4479-4490.
17. **Baron, T., A. G. Biacabe, J. N. Arzac, S. Benestad, and M. H. Groschup.** 2007. Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants. *Vaccine* **25**:5625-5630.
18. **Barria, M. A., A. Mukherjee, D. Gonzalez-Romero, R. Morales, and C. Soto.** 2009. De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype. *PLoS Pathog* **5**:e1000421.
19. **Barron, R. M., S. L. Campbell, D. King, A. Bellon, K. E. Chapman, R. A. Williamson, and J. C. Manson.** 2007. High titers of transmissible spongiform encephalopathy infectivity associated with extremely low levels of PrP^{Sc} in vivo. *J Biol Chem* **282**:35878-35886.
20. **Baylis, M., and W. Goldmann.** 2004. The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med* **4**:385-396.

21. **Benestad, S. L., J. N. Arsaç, W. Goldmann, and M. Noremark.** 2008. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res* **39**:19.
22. **Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M. A. Tranulis, and B. Bratberg.** 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* **153**:202-208.
23. **Benetti, F., M. D. Geschwind, and G. Legname.** 2010. De novo prions. *F1000 Biol Rep* **2**.
24. **Beringue, V., M. Demoy, C. I. Lasmezaz, B. Gouritin, C. Weingarten, J. P. Deslys, J. P. Andreux, P. Couvreur, and D. Dormont.** 2000. Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* **190**:495-502.
25. **Berson, J. F., A. C. Theos, D. C. Harper, D. Tenza, G. Raposo, and M. S. Marks.** 2003. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* **161**:521-533.
26. **Bessen, R. A., and R. F. Marsh.** 1992. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* **66**:2096-2101.
27. **Bessen, R. A., and R. F. Marsh.** 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**:7859-7868.
28. **Bian, J., D. Napier, V. Khaychuck, R. Angers, C. Graham, and G. Telling.** 2010. Cell-based quantification of chronic wasting disease prions. *J Virol* **84**:8322-8326.
29. **Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo, and C. Thery.** 2011. Exosome secretion : molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*.
30. **Borchelt, D. R., A. Taraboulos, and S. B. Prusiner.** 1992. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* **267**:16188-16199.
31. **Bounhar, Y., Y. Zhang, C. G. Goodyer, and A. LeBlanc.** 2001. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276**:39145-39149.
32. **Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, and A. Aguzzi.** 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**:339-343.
33. **Brown, K. L., K. Stewart, D. L. Ritchie, N. A. Mabbott, A. Williams, H. Fraser, W. I. Morrison, and M. E. Bruce.** 1999. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein- expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* **5**:1308-1312.
34. **Browning, S. R., G. L. Mason, T. Seward, M. Green, G. A. Eliason, C. Mathiason, M. W. Miller, E. S. Williams, E. Hoover, and G. C. Telling.** 2004. Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP. *J Virol* **78**:13345-13350.
35. **Bruce, M. E., and H. Fraser.** 1991. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**:125-138.
36. **Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCordle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C. J. Bostock.** 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments]. *Nature* **389**:498-501.
37. **Budka, H., A. Aguzzi, P. Brown, J. M. Brucher, O. Bugiani, F. Gullotta, M. Haltia, J. J. Hauw, J. W. Ironside, K. Jellinger, and et al.** 1995. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* **5**:459-466.
38. **Bueller, 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**:1339-1347.
39. **Bueller, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann.** 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature* **356**:577-582.
40. **Buschmann, A., E. Pfaff, K. Reifenberg, H. M. Muller, and M. H. Groschup.** 2000. Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP(C). *Arch Virol Suppl* **16**:75-86.
41. **Buschow, S. I., E. N. Nolte-† Hoen, G. van Niel, M. S. Pols, T. ten Broeke, M. Lauwen, F. Ossendorp, C. J. Melief, G. Raposo, R. Wubbolts, M. H. Wauben, and W. Stoorvogel.** 2009. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* **10**:1528-1542.

42. **Caby, M. P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo, and C. Bonnerot.** 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* **17**:879-887.
43. **Campana, V., D. Sarnataro, and C. Zurzolo.** 2005. The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* **15**:102-111.
44. **Capellari, S., R. Strammiello, D. Saverioni, H. Kretzschmar, and P. Parchi.** 2011. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol* **121**:21-37.
45. **Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto.** 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**:195-206.
46. **Caughey, B., and G. J. Raymond.** 1991. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**:18217-18223.
47. **Caughey, B., G. J. Raymond, and R. A. Bessen.** 1998. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* **273**:32230-32235.
48. **Caughey, B., G. J. Raymond, D. Ernst, and R. E. Race.** 1991. N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol* **65**:6597-6603.
49. **Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes, and W. S. Caughey.** 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**:7672-7680.
50. **Chaput.** 2011. In press. *Seminars in Immunopathology*.
51. **Chen, S. G., D. B. Teplow, P. Parchi, J. K. Teller, P. Gambetti, and L. Autilio-Gambetti.** 1995. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* **270**:19173-19180.
52. **Chesebro, B., M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah, and M. Oldstone.** 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**:1435-1439.
53. **Chiesa, R., and D. A. Harris.** 2001. Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis* **8**:743-763.
54. **Chretien, F., A. Dorandeu, H. Adle-Biasette, T. Ereau, L. Wingertsmann, F. Brion, and F. Gray.** 1999. [A process of programmed cell death as a mechanisms of neuronal death in prion diseases]. *Clin Exp Pathol* **47**:181-191.
55. **Clavaguera, F., T. Bolmont, R. A. Crowther, D. Abramowski, S. Frank, A. Probst, G. Fraser, A. K. Stalder, M. Beibel, M. Staufenbiel, M. Jucker, M. Goedert, and M. Tolnay.** 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* **11**:909-913.
56. **Cobb, N. J., F. D. Sonnichsen, H. McHaourab, and W. K. Surewicz.** 2007. Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18946-18951.
57. **Cobb, N. J., and W. K. Surewicz.** 2009. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* **48**:2574-2585.
58. **Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi.** 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* **19**:43-51.
59. **Cohen, F. E.** 1999. Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* **293**:313-320.
60. **Collinge, J.** 2005. Molecular neurology of prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**:906-919.
61. **Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside, and A. F. Hill.** 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]. *Nature* **383**:685-690.
62. **Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, and J. G. Jefferys.** 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**:295-297.
63. **Courageot, M. P., N. Daude, R. Nonno, S. Paquet, M. A. Di Bari, A. Le Dur, J. Chapuis, A. F. Hill, U. Agrimi, H. Laude, and D. Vilette.** 2008. A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* **89**:341-347.

64. **Crozef, C., F. Flamant, A. Bencsik, D. Aubert, J. Samarut, and T. Baron.** 2001. Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol* **75**:5328-5334.
65. **Cuillé, J., and P. L. Chelle.** 1936. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci. Paris.* **203**:1552-1554.
66. **Deleault, N. R., B. T. Harris, J. R. Rees, and S. Supattapone.** 2007. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:9741-9746.
67. **Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze.** 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* **113 Pt 19**:3365-3374.
68. **Desplats, P., H. J. Lee, E. J. Bae, C. Patrick, E. Rockenstein, L. Crews, B. Spencer, E. Masliah, and S. J. Lee.** 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:13010-13015.
69. **Detwiler, L. A., and M. Baylis.** 2003. The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech* **22**:121-143.
70. **Diarra-Mehrpour, M., S. Arrabal, A. Jalil, X. Pinson, C. Gaudin, G. Pietu, A. Pitaval, H. Ripoché, M. Eloit, D. Dormont, and S. Chouaib.** 2004. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res* **64**:719-727.
71. **Diaz-Espinoza, R., and C. Soto.** 2010. Generation of prions in vitro and the protein-only hypothesis. *Prion* **4**:53-59.
72. **Diedrich, J. F., P. E. Bendheim, Y. S. Kim, R. I. Carp, and A. T. Haase.** 1991. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:375-379.
73. **Dron, M., M. Moudjou, J. Chapuis, M. K. Salamat, J. Bernard, S. Cronier, C. Langevin, and H. Laude.** 2010. Endogenous proteolytic cleavage of disease-associated prion protein to produce C2 fragments is strongly cell- and tissue-dependent. *J Biol Chem* **285**:10252-10264.
74. **Eaton, S.** 2006. Release and trafficking of lipid-linked morphogens. *Curr Opin Genet Dev* **16**:17-22.
75. **Edgeworth, J. A., N. Gros, J. Alden, S. Joiner, J. D. Wadsworth, J. Linehan, S. Brandner, G. S. Jackson, C. Weissmann, and J. Collinge.** 2010. Spontaneous generation of mammalian prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:14402-14406.
76. **Edgeworth, J. A., G. S. Jackson, A. R. Clarke, C. Weissmann, and J. Collinge.** 2009. Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:3479-3483.
77. **Eisele, Y. S., U. Obermüller, G. Heilbronner, F. Baumann, S. A. Kaeser, H. Wolburg, L. C. Walker, M. Staufenbiel, M. Heikenwalder, and M. Jucker.** 2010. Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* **330**:980-982.
78. **Elsen, J. M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J. V. Khang, J. P. Poivey, F. Lantier, and J. L. Laplanche.** 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* **144**:431-445.
79. **Emmanouilidou, E., K. Melachroinou, T. Roumeliotis, S. D. Garbis, M. Ntzouni, L. H. Margaritis, L. Stefanis, and K. Vekrellis.** 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* **30**:6838-6851.
80. **Fevrier, B., and G. Raposo.** 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* **16**:415-421.
81. **Fevrier, B., D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, and G. Raposo.** 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9683-9688.
82. **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**:1255-1264.

83. **Foster, N., and G. G. Macpherson.** 2010. Murine cecal patch M cells transport infectious prions in vivo. *J Infect Dis* **202**:1916-1919.
84. **Gajdusek, D. C.** 1977. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* **197**:943-960.
85. **Gajdusek, D. C., and V. Zigas.** 1957. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* **257**:974-978.
86. **Genovesi, S., L. Leita, P. Sequi, I. Andrighetto, M. C. Sorgato, and A. Bertoli.** 2007. Direct detection of soil-bound prions. *PLoS One* **2**:e1069.
87. **Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel, and W. B. Matthews.** 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**:388-389.
88. **Glatzel, M., and A. Aguzzi.** 2000. Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect* **2**:613-619.
89. **Goold, R., S. Rabbanian, L. Sutton, R. Andre, P. Arora, J. Moonga, A. R. Clarke, G. Schiavo, P. Jat, J. Collinge, and S. J. Tabrizi.** 2011. Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun* **2**:281.
90. **Gordon, W. S.** 1946. Advances in veterinary research. *Vet. Rec.* **58**:518-525.
91. **Gousset, K., E. Schiff, C. Langevin, Z. Marjanovic, A. Caputo, D. T. Browman, N. Chenouard, F. de Chaumont, A. Martino, J. Enninga, J. C. Olivo-Marin, D. Mannel, and C. Zurzolo.** 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* **11**:328-336.
92. **Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen.** 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8342-8347.
93. **Griffith, J. S.** 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* **215**:1043-1044.
94. **Guiroy, D. C., I. Wakayama, P. P. Liberski, and D. C. Gajdusek.** 1994. Relationship of microglia and scrapie amyloid-immunoreactive plaques in kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta Neuropathol* **87**:526-530.
95. **Hadlow, W. J.** 1959. Scrapie and Kuru. *Lancet* **2**:289-290.
96. **Haik, S., and J. P. Brandel.** 2011. Biochemical and strain properties of CJD prions: complexity versus simplicity. *J Neurochem.*
97. **Haley, N. J., C. K. Mathiason, S. Carver, M. Zabel, G. C. Telling, and E. A. Hoover.** 2011. Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: potential mechanisms of prion shedding and transmission. *J Virol* **85**:6309-6318.
98. **Harman, J. L., and C. J. Silva.** 2009. Bovine spongiform encephalopathy. *J Am Vet Med Assoc* **234**:59-72.
99. **Harris, D. A.** 1999. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* **12**:429-444.
100. **Heikenwalder, M., C. Julius, and A. Aguzzi.** 2007. Prions and peripheral nerves: a deadly rendezvous. *J Neurosci Res* **85**:2714-2725.
101. **Heiseke, A., Y. Aguib, and H. M. Schatzl.** 2010. Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol* **12**:87-97.
102. **Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl, and A. Aguzzi.** 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* **7**:976-977.
103. **Hetz, C., K. Maundrell, and C. Soto.** 2003. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med* **9**:237-243.
104. **Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey, and P. Lantos.** 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448-450, 526.
105. **Hunter, N.** 1997. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol* **5**:331-334.
106. **Hurley, J. H.** 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**:4-11.
107. **Ichim, T. E., Z. Zhong, S. Kaushal, X. Zheng, X. Ren, X. Hao, J. A. Joyce, H. H. Hanley, N. H. Riordan, J. Koropatnick, V. Bogin, B. R. Mineev, W. P. Min, and R. H. Tullis.** 2008. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* **6**:37.

108. **Ironside, J. W., and M. W. Head.** 2004. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by blood and blood products. *Haemophilia* **10 Suppl 4**:64-69.
109. **Irvine, G. B., O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar, and D. M. Walsh.** 2008. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* **14**:451-464.
110. **Jackson, W. S., A. W. Borkowski, H. Faas, A. D. Steele, O. D. King, N. Watson, A. Jasanoff, and S. Lindquist.** 2009. Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron* **63**:438-450.
111. **Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide.** 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* **262**:9412-9420.
112. **Kanaani, J., S. B. Prusiner, J. Diacovo, S. Baekkeskov, and G. Legname.** 2005. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem* **95**:1373-1386.
113. **Kanu, N., Y. Imokawa, D. N. Drechsel, R. A. Williamson, C. R. Birkett, C. J. Bostock, and J. P. Brockes.** 2002. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* **12**:523-530.
114. **Keller, S., J. Ridinger, A. K. Rupp, J. W. Janssen, and P. Altevogt.** 2011. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* **9**:86.
115. **Klein, M. A., R. Frigg, E. Flechsig, A. J. Raeber, U. Kalinke, H. Bluethmann, F. Bootz, M. Suter, R. M. Zinkernagel, and A. Aguzzi.** 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie [see comments]. *Nature* **390**:687-690.
116. **Klein, M. A., R. Frigg, A. J. Raeber, E. Flechsig, I. Hegyi, R. M. Zinkernagel, C. Weissmann, and A. Aguzzi.** 1998. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion [see comments]. *Nat Med* **4**:1429-1433.
117. **Klohn, P. C., L. Stoltze, E. Flechsig, M. Enari, and C. Weissmann.** 2003. A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11666-11671.
118. **Knight, R. S., and R. G. Will.** 2004. Prion diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75 Suppl 1**:i36-42.
119. **Kong, Q., S. Huang, W. Zou, D. Vanegas, M. Wang, D. Wu, J. Yuan, M. Zheng, H. Bai, H. Deng, K. Chen, A. L. Jenny, K. O'Rourke, E. D. Belay, L. B. Schonberger, R. B. Petersen, M. S. Sy, S. G. Chen, and P. Gambetti.** 2005. Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci* **25**:7944-7949.
120. **Kovacs, G. G., and H. Budka.** 2009. Molecular pathology of human prion diseases. *Int J Mol Sci* **10**:976-999.
121. **Kristiansen, M., P. Deriziotis, D. E. Dimcheff, G. S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A. R. Clarke, F. W. van Leeuwen, V. Menendez-Benito, N. P. Dantuma, J. L. Portis, J. Collinge, and S. J. Tabrizi.** 2007. Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* **26**:175-188.
122. **Kroemer, G., and B. Levine.** 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:1004-1010.
123. **Laine, J., M. E. Marc, M. S. Sy, and H. Axelrad.** 2001. Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *Eur J Neurosci* **14**:47-56.
124. **Langevin, C., K. Goussset, M. Costanzo, O. Richard-Le Goff, and C. Zurzolo.** Characterization of the role of dendritic cells in prion transfer to primary neurons. *Biochem J* **431**:189-198.
125. **Langui, D., N. Girardot, K. H. El Hachimi, B. Allinquant, V. Blanchard, L. Pradier, and C. Duyckaerts.** 2004. Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am J Pathol* **165**:1465-1477.
126. **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**:402-405.
127. **Lehmann, S., and D. A. Harris.** 1996. Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J Biol Chem* **271**:1633-1637.

128. **Li, A., P. Piccardo, S. J. Barmada, B. Ghetti, and D. A. Harris.** 2007. Prion protein with an octapeptide insertion has impaired neuroprotective activity in transgenic mice. *EMBO J* **26**:2777-2785.
129. **Li, J., S. Browning, S. P. Mahal, A. M. Oelschlegel, and C. Weissmann.** 2010. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science* **327**:869-872.
130. **Li, J. Y., E. Englund, J. L. Holton, D. Soulet, P. Hagell, A. J. Lees, T. Lashley, N. P. Quinn, S. Rehncrona, A. Bjorklund, H. Widner, T. Revesz, O. Lindvall, and P. Brundin.** 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* **14**:501-503.
131. **Li, X. B., Z. R. Zhang, H. J. Schluesener, and S. Q. Xu.** 2006. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med* **10**:364-375.
132. **Liberski, P. P., D. R. Brown, B. Sikorska, B. Caughey, and P. Brown.** 2008. Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol* **46**:1-25.
133. **Liberski, P. P., P. Brown, S. Y. Xiao, and D. C. Gajdusek.** 1991. The ultrastructural diversity of scrapie-associated fibrils isolated from experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Comp Pathol* **105**:377-386.
134. **Lledo, P. M., P. Tremblay, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and R. A. Nicoll.** 1996. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2403-2407.
135. **Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden, and V. R. Martins.** 2005. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* **25**:11330-11339.
136. **Luk, K. C., C. Song, P. O'Brien, A. Stieber, J. R. Branch, K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee.** 2009. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:20051-20056.
137. **Lysek, D. A., C. Schorn, L. G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolari, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Guntert, and K. Wuthrich.** 2005. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:640-645.
138. **Mabbot, N. A., F. Mackay, F. Minns, and M. E. Bruce.** 2000. Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* **6**:719-720.
139. **Mabbot, N. A., and G. G. MacPherson.** 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4**:201-211.
140. **Maglio, L. E., M. F. Perez, V. R. Martins, R. R. Brentani, and O. A. Ramirez.** 2004. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* **131**:58-64.
141. **Mahal, S. P., C. A. Baker, C. A. Demczyk, E. W. Smith, C. Julius, and C. Weissmann.** 2007. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:20908-20913.
142. **Makarava, N., G. G. Kovacs, O. Bocharova, R. Savtchenko, I. Alexeeva, H. Budka, R. G. Rohwer, and I. V. Baskakov.** 2010. Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol* **119**:177-187.
143. **Makrinou, E., J. Collinge, and M. Antoniou.** 2002. Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mamm Genome* **13**:696-703.
144. **Mallucci, G., A. Dickinson, J. Linehan, P. C. Klohn, S. Brandner, and J. Collinge.** 2003. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**:871-874.
145. **Mallucci, G. R., S. Ratte, E. A. Asante, J. Linehan, I. Gowland, J. G. Jefferys, and J. Collinge.** 2002. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo J* **21**:202-210.
146. **Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell, and J. Hope.** 1994. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**:121-127.
147. **Manson, J. C., and N. L. Tuzi.** 2001. Transgenic models of the transmissible spongiform encephalopathies. *Exp. Rev. Mol. Med.*

148. **Marella, M., C. Gaggioli, M. Batoz, M. Deckert, S. Tartare-Deckert, and J. Chabry.** 2005. Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem* **280**:1529-1534.
149. **Marella, M., S. Lehmann, J. Grassi, and J. Chabry.** 2002. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem* **277**:25457-25464.
150. **Marsh, M., and G. van Meer.** 2008. Cell biology. No ESCRTs for exosomes. *Science* **319**:1191-1192.
151. **Mathivanan, S., and R. J. Simpson.** 2009. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* **9**:4997-5000.
152. **McFarlin, D. E., M. C. Raff, E. Simpson, and S. H. Nehlsen.** 1971. Scrapie in immunologically deficient mice. *Nature* **233**:336.
153. **McKinley, M. P., A. Taraboulos, L. Kenaga, D. Serban, A. Stieber, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and N. Gonatas.** 1991. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* **65**:622-630.
154. **Mead, S., M. Poulter, J. Uphill, J. Beck, J. Whitfield, T. E. Webb, T. Campbell, G. Adamson, P. Deriziotis, S. J. Tabrizi, H. Hummerich, C. Verzilli, M. P. Alpers, J. C. Whitaker, and J. Collinge.** 2009. Genetic risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* **8**:57-66.
155. **Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski, and K. Iqbal.** 1981. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **54**:63-74.
156. **Milhavet, O., and S. Lehmann.** 2002. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* **38**:328-339.
157. **Morales, R., K. Abid, and C. Soto.** 2007. The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta* **1772**:681-691.
158. **Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay, and O. Kellermann.** 2000. Signal transduction through prion protein. *Science* **289**:1925-1928.
159. **Mouillet-Richard, S., M. Pietri, B. Schneider, C. Vidal, V. Mutel, J. M. Launay, and O. Kellermann.** 2005. Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *J Biol Chem* **280**:4592-4601.
160. **Neale, M. H., S. J. Mountjoy, J. C. Edwards, D. Vilette, H. Laude, O. Windl, and G. C. Saunders.** 2010. Infection of cell lines with experimental and natural ovine scrapie agents. *J Virol* **84**:2444-2452.
161. **Neumann, S., M. Harterink, and H. Sprong.** 2007. Hitch-hiking between cells on lipoprotein particles. *Traffic* **8**:331-338.
162. **Nicotera, P.** 2001. A route for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**:345-348.
163. **Novakofski, J., M. S. Brewer, N. Mateus-Pinilla, J. Killefer, and R. H. McCusker.** 2005. Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J Anim Sci* **83**:1455-1476.
164. **Paitel, E., R. Fahraeus, and F. Checler.** 2003. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J Biol Chem* **278**:10061-10066.
165. **Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fleterick, F. E. Cohen, and 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.
166. **Paquet, S., N. Daude, M. P. Courageot, J. Chapuis, H. Laude, and D. Vilette.** 2007. PrP^C does not mediate internalization of PrP^{Sc} but is required at an early stage for de novo prion infection of Rov cells. *J Virol* **81**:10786-10791.
167. **Paquet, S., C. Langevin, J. Chapuis, G. S. Jackson, H. Laude, and D. Vilette.** 2007. Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *J Gen Virol* **88**:706-713.
168. **Parolini, I., C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Milioto, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi, A. Molinari, M. Colone, M. Tatti, M. Sargiacomo, and S. Fais.** 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* **284**:34211-34222.

169. **Pastrana, M. A., G. Sajnani, B. Onisko, J. Castilla, R. Morales, C. Soto, and J. R. Requena.** 2006. Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* **45**:15710-15717.
170. **Pauly, P. C., and D. A. Harris.** 1998. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**:33107-33110.
171. **Peel, S., P. Macheboeuf, N. Martinelli, and W. Weissenhorn.** 2010. Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci* **36**:199-210.
172. **Pegtel, D. M., K. Cosmopoulos, D. A. Thorley-Lawson, M. A. van Eijndhoven, E. S. Hopmans, J. L. Lindenberg, T. D. de Gruijl, T. Wurdinger, and J. M. Middeldorp.** 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:6328-6333.
173. **Perera, W. S., and N. M. Hooper.** 2001. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* **11**:519-523.
174. **Peretz, D., R. A. Williamson, G. Legname, Y. Matsunaga, J. Vergara, D. R. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and M. R. Scott.** 2002. A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* **34**:921-932.
175. **Peters, P. J., A. Mironov, Jr., D. Peretz, E. van Donselaar, E. Leclerc, S. Erpel, S. J. DeArmond, D. R. Burton, R. A. Williamson, M. Vey, and S. B. Prusiner.** 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* **162**:703-717.
176. **Piening, N., R. Nonno, M. Di Bari, S. Walter, O. Windl, U. Agrimi, H. A. Kretzschmar, and U. Bertsch.** 2006. Conversion efficiency of bank vole prion protein in vitro is determined by residues 155 and 170, but does not correlate with the high susceptibility of bank voles to sheep scrapie in vivo. *J Biol Chem* **281**:9373-9384.
177. **Pinheiro, T. J.** 2006. The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. *Chem Phys Lipids* **141**:66-71.
178. **Pisitkun, T., R. F. Shen, and M. A. Knepper.** 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13368-13373.
179. **Prado, M. A., J. Alves-Silva, A. C. Magalhaes, V. F. Prado, R. Linden, V. R. Martins, and R. R. Brentani.** 2004. PrP^c on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J Neurochem* **88**:769-781.
180. **Prusiner, S. B.** 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.
181. **Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth, and G. G. Glenner.** 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**:349-358.
182. **Raiborg, C., T. E. Rusten, and H. Stenmark.** 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**:446-455.
183. **Rajendran, L., M. Honsho, T. R. Zahn, P. Keller, K. D. Geiger, P. Verkade, and K. Simons.** 2006. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11172-11177.
184. **Rane, N. S., S. W. Kang, O. Chakrabarti, L. Feigenbaum, and R. S. Hegde.** 2008. Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Dev Cell* **15**:359-370.
185. **Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze.** 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**:1161-1172.
186. **Ren, P. H., J. E. Lauckner, I. Kachirskaja, J. E. Heuser, R. Melki, and R. R. Kopito.** 2009. Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* **11**:219-225.
187. **Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich.** 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**:180-182.
188. **Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wuthrich.** 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* **413**:282-288.

189. **Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H. H. Gerdes.** 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**:1007-1010.
190. **Saa, P., J. Castilla, and C. Soto.** 2006. Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* **313**:92-94.
191. **Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs, Jr.** 1993. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* **268**:20276-20284.
192. **Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner.** 1998. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* **4**:1157-1165.
193. **Safar, J. G., M. D. Geschwind, C. Deering, S. Didorenko, M. Sattavat, H. Sanchez, A. Serban, M. Vey, H. Baron, K. Giles, B. L. Miller, S. J. Dearmond, and S. B. Prusiner.** 2005. Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:3501-3506.
194. **Safar, J. G., H. Wille, M. D. Geschwind, C. Deering, D. Latawiec, A. Serban, D. J. King, G. Legname, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, B. L. Miller, S. J. Dearmond, and S. B. Prusiner.** 2006. Human prions and plasma lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11312-11317.
195. **Sandberg, M. K., H. Al-Doujaily, B. Sharps, A. R. Clarke, and J. Collinge.** 2011. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* **470**:540-542.
196. **Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyn'ska, and M. Schachner.** 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* **169**:341-354.
197. **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**:8821-8831.
198. **Schmitt-Ulms, G., G. Legname, M. A. Baldwin, H. L. Ball, N. Bradon, P. J. Bosque, K. L. Crossin, G. M. Edelman, S. J. DeArmond, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner.** 2001. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* **314**:1209-1225.
199. **Schulz-Schaeffer, W. J., R. Fatzer, M. Vandeveld, and H. A. Kretzschmar.** 2000. Detection of PrP(Sc) in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol Suppl* **16**:173-180.
200. **Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, and et al.** 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**:847-857.
201. **Seidel, B., A. Thomzig, A. Buschmann, M. H. Groschup, R. Peters, M. Beekes, and K. Terytze.** 2007. Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS One* **2**:e435.
202. **Shaked, G. M., Y. Shaked, Z. Kariv-Inbal, M. Halimi, I. Avraham, and R. Gabizon.** 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.
203. **Sharples, R. A., L. J. Vella, R. M. Nisbet, R. Naylor, K. Perez, K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. F. Hill.** 2008. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J* **22**:1469-1478.
204. **Shmerling, D., I. Hegyi, M. Fischer, T. Blattler, S. Brandner, J. Gotz, T. Rulicke, E. Flechsig, A. Cozzio, C. von Mering, C. Hangartner, A. Aguzzi, and C. Weissmann.** 1998. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**:203-214.
205. **Shyng, S. L., J. E. Heuser, and D. A. Harris.** 1994. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **125**:1239-1250.
206. **Shyng, S. L., M. T. Huber, and D. A. Harris.** 1993. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **268**:15922-15928.

207. **Sigurdson, C. J.** 2008. A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet Res* **39**:41.
208. **Sigurdsson, B.** 1954. Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br. Vet. J.* **110**:341-354.
209. **Sikorska, B., P. P. Liberski, P. Giraud, N. Kopp, and P. Brown.** 2004. Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:2563-2573.
210. **Silveira, J. R., G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes, and B. Caughey.** 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**:257-261.
211. **Siso, S., L. Gonzalez, and M. Jeffrey.** 2010. Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2010**:747892.
212. **Smirnovas, V., G. S. Baron, D. K. Offerdahl, G. J. Raymond, B. Caughey, and W. K. Surewicz.** 2011. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol* **18**:504-506.
213. **Smith, P. G., S. N. Cousens, J. N. d' Huillard Aignaux, H. J. Ward, and R. G. Will.** 2004. The epidemiology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **284**:161-191.
214. **Soto, C., and N. Satani.** 2010. The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med.*
215. **Sowemimo-Coker, S. O., C. A. Demczyk, F. Andrade, and C. A. Baker.** 2010. Evaluation of removal of prion infectivity from red blood cells with prion reduction filters using a new rapid and highly sensitive cell culture-based infectivity assay. *Transfusion* **50**:980-988.
216. **Spassov, S., M. Beekes, and D. Naumann.** 2006. Structural differences between TSEs strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1760**:1138-1149.
217. **Sunyach, C., A. Jen, J. Deng, K. T. Fitzgerald, Y. Frobert, J. Grassi, M. W. McCaffrey, and R. Morris.** 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* **22**:3591-3601.
218. **Takahashi, R. H., T. A. Milner, F. Li, E. E. Nam, M. A. Edgar, H. Yamaguchi, M. F. Beal, H. Xu, P. Greengard, and G. K. Gouras.** 2002. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* **161**:1869-1879.
219. **Takemura, K., M. Kahdre, D. Joseph, A. Yousef, and S. Sreevatsan.** 2004. An overview of transmissible spongiform encephalopathies. *Anim Health Res Rev* **5**:103-124.
220. **Taraboulos, A., D. Serban, and S. B. Prusiner.** 1990. Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol* **110**:2117-2132.
221. **Taylor, D. R., and N. M. Hooper.** 2006. The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol* **23**:89-99.
222. **Telling, G. C., P. Parchi, S. J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugaresi, P. Gambetti, and S. B. Prusiner.** 1996. Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity. *Science* **274**:2079-2082.
223. **Telling, G. C., M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, K. C. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner.** 1994. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9936-9940.
224. **Terry, L. A., L. Howells, K. Bishop, C. A. Baker, S. Everest, L. Thorne, B. C. Maddison, and K. C. Gough.** 2011. Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet Res* **42**:65.
225. **Thackray, A. M., L. Hopkins, and R. Bujdoso.** 2007. Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem J* **401**:475-483.
226. **Theos, A. C., S. T. Truschel, D. Tenza, I. Hurbain, D. C. Harper, J. F. Berson, P. C. Thomas, G. Raposo, and M. S. Marks.** 2006. A luminal domain-dependent pathway for sorting

- to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell* **10**:343-354.
227. **They, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton.** 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**:Unit 3 22.
228. **They, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena.** 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* **147**:599-610.
229. **Thomzig, A., S. Spasov, M. Friedrich, D. Naumann, and M. Beekes.** 2004. Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J Biol Chem* **279**:33847-33854.
230. **Tixador, P., L. Herzog, F. Reine, E. Jaumain, J. Chapuis, A. Le Dur, H. Laude, and V. Beringue.** 2010. The Physical Relationship between Infectivity and Prion Protein Aggregates Is Strain-Dependent. *PLoS Pathog* **6**:e1000859.
231. **Toni, M., E. Spisni, C. Griffoni, S. Santi, M. Riccio, P. Lenaz, and V. Tomasi.** 2006. Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes Fyn/Erk 1/2 signal transduction. *J Biomed Biotechnol* **2006**:69469.
232. **Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger, and M. Simons.** 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**:1244-1247.
233. **Truant, R., R. S. Atwal, C. Desmond, L. Munsie, and T. Tran.** 2008. Huntington's disease: revisiting the aggregation hypothesis in polyglutamine neurodegenerative diseases. *FEBS J* **275**:4252-4262.
234. **Tuo, W., K. I. O'Rourke, D. Zhuang, W. P. Cheevers, T. R. Spraker, and D. P. Knowles.** 2002. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6310-6315.
235. **Turner, M. L., and C. A. Ludlam.** 2009. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol* **144**:14-23.
236. **Tzaban, S., G. Friedlander, O. Schonberger, L. Horonchik, Y. Yedidia, G. Shaked, R. Gabizon, and A. Taraboulos.** 2002. Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* **41**:12868-12875.
237. **Uro-Coste, E., H. Cassard, S. Simon, S. Lugan, J. M. Bilheude, A. Perret-Liaudet, J. W. Ironside, S. Haik, C. Basset-Leobon, C. Lacroux, K. Peoch, N. Streichenberger, J. Langeveld, M. W. Head, J. Grassi, J. J. Hauw, F. Schelcher, M. B. Delisle, and O. Andreoletti.** 2008. Beyond PrP^{res} type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog* **4**:e1000029.
238. **Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall.** 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**:654-659.
239. **van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman.** 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* **121**:337-349.
240. **Vella, L. J., D. L. Greenwood, R. Cappai, J. P. Scheerlinck, and A. F. Hill.** 2008. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol* **124**:385-393.
241. **Vella, L. J., R. A. Sharples, V. A. Lawson, C. L. Masters, R. Cappai, and A. F. Hill.** 2007. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* **211**:582-590.
242. **Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S. J. DeArmond, E. J. Smart, R. G. Anderson, A. Taraboulos, and S. B. Prusiner.** 1996. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14945-14949.
243. **Vilette, D.** 2008. Cell models of prion infection. *Vet Res* **39**:10.

244. **Vilette, D., O. Andreoletti, F. Archer, M. F. Madelaine, J. L. Vilotte, S. Lehmann, and H. Laude.** 2001. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4055-4059.
245. **Vilotte, J. L., and H. Laude.** 2002. Transgenesis applied to transmissible spongiform encephalopathies. *Transgenic Res* **11**:547-564.
246. **Vilotte, J. L., S. Soulier, R. Essalmani, M. G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J. C. Da Silva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M. F. Madelaine, S. Rakatobe, A. Le Dur, D. Vilette, and H. Laude.** 2001. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol* **75**:5977-5984.
247. **Vingtdeux, V., M. Hamdane, A. Loyens, P. Gele, H. Drobeck, S. Begard, M. C. Galas, A. Delacourte, J. C. Beauvillain, L. Buee, and N. Sergeant.** 2007. Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem* **282**:18197-18205.
248. **Wadsworth, J. D., E. A. Asante, and J. Collinge.** 2010. Review: contribution of transgenic models to understanding human prion disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **36**:576-597.
249. **Wadsworth, J. D., and J. Collinge.** 2007. Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**:598-609.
250. **Wadsworth, J. D., A. F. Hill, J. A. Beck, and J. Collinge.** 2003. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* **66**:241-254.
251. **Wadsworth, J. D., S. Joiner, J. M. Linehan, E. A. Asante, S. Brandner, and J. Collinge.** 2008. Review. The origin of the prion agent of kuru: molecular and biological strain typing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**:3747-3753.
252. **Wang, F., X. Wang, C. G. Yuan, and J. Ma.** 2010. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**:1132-1135.
253. **Weissmann, C.** 2009. Thoughts on mammalian prion strains. *Folia Neuropathol* **47**:104-113.
254. **Westergard, L., H. M. Christensen, and D. A. Harris.** 2007. The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**:629-644.
255. **White, A. R., S. J. Collins, F. Maher, M. F. Jobling, L. R. Stewart, J. M. Thyer, K. Beyreuther, C. L. Masters, and R. Cappai.** 1999. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity [In Process Citation]. *Am J Pathol* **155**:1723-1730.
256. **Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, and P. G. Smith.** 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**:921-925.
257. **Windl, O., M. Dempster, J. P. Estibeiro, R. Lathe, R. de Silva, T. Esmonde, R. Will, A. Springbett, T. A. Campbell, K. C. Sidle, M. S. Palmer, and J. Collinge.** 1996. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet* **98**:259-264.
258. **Wong, B. S., T. Liu, R. Li, T. Pan, R. B. Petersen, M. A. Smith, P. Gambetti, G. Perry, J. C. Manson, D. R. Brown, and M. S. Sy.** 2001. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* **76**:565-572.
259. **Zigas, V., and D. C. Gajdusek.** 1957. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust* **44**:745-754.

ANNEXE

Mammalian prions

Tracking the infectious entities

Jimmy Savistchenko, Zaira E. Arellano-Anaya, Olivier Andréoletti and Didier Vilette*

UMR INRA ENVT 1225; Interactions Hôte Agent Pathogène; Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse; Toulouse, France

This manuscript has been published online, prior to printing. Once the issue is complete and page numbers have been assigned, the citation will change accordingly.

Protein misfolding is central to the pathogenesis of several neurodegenerative disorders. Among these disorders, prion diseases are unique because they are transmissible. The conversion of the host-encoded GPI-anchored PrP protein into a structurally altered form is crucially associated with the infectious and neurotoxic properties of the resulting abnormal PrP. Many lines of evidence indicate that distinct aggregated forms with different size and protease resistance are produced during prion multiplication. The recent isolation of various subsets of abnormal PrP, along with the improved biochemical tools and infectivity detection assays have shed light on the diversity of abnormal PrP protein and may give insights into the features of the more infectious subsets of abnormal PrP.

Unusual Agents for a Unique Disease

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) or prion diseases, are transmissible fatal neurodegenerative disorders affecting human and a wide range of mammals.^{1,2} Although the outbreak of bovine spongiform encephalopathy (BSE) had devastating effects on British cattle flocks, the prototypic animal TSE is scrapie, a naturally occurring disease affecting sheep and goats. Scrapie is a worldwide endemic disease that has been described for over 250 years. However, the implemented small ruminant surveillance programs led to the recent detection of a previously unnoticed prion agent in sheep. The resulting disease, named atypical

scrapie, is now recognized as a worldwide sheep disease, with marked prevalence in the EU. Chronic Wasting Disease (CWD) is a TSE affecting farmed and free-ranging cervids, mainly recognized in North America. In human, prion diseases are traditionally classified into Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), its variant form (vCJD) resulting from human infection by BSE prions, Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) and fatal familial insomnia (FFI). Prion diseases are very unusual as they can arise without any apparent cause (e.g., sporadic CJD) or they can be due to genetic disorders linked to mutations in the endogenous PrP protein. The diseases can also be acquired by infection, through ingestion of contaminated products or through iatrogenic procedures, and are in most cases experimentally transmissible.

The nature of the causative infectious agent has been strongly debated for decades.^{3,4} Initially thought to be a slow virus because of the very long incubation time before clinical onset, its unconventional resistance to various inactivation procedures led Griffith to hypothesize that it might be a self-replicating protein.⁵ This somehow heretical proposal was subsequently worked out by Prusiner and co-workers who provided a wealth of compelling experimental evidence that prion infectivity is tightly associated with the misfolding of the GPI-anchored, host-encoded PrP protein.⁶ Moreover, the possible involvement of a conventional infectious agent is now ruled out because the whole process of prion multiplication has been achieved acellularly in test tubes subjected to successive incubation and sonication steps (namely

Key words: prions, aggregates, infectivity, EST, PrP protein

Revised: 04/12/11

Accepted: 05/10/11

DOI:

*Correspondence to: Didier Vilette;
Email: d.vilette@envt.fr

protein misfolding cyclic amplification or PMCA).⁷ Thus, the fact that abnormally folded infectious PrP (PrP^{Sc}) recruits and converts host PrP into new PrP^{Sc} is now widely accepted, even if (1) the structure of abnormal PrP is poorly defined, e.g., the molecular arrangement(s) responsible for the infectious properties of the abnormal PrP protein are unknown and (2) the exact molecular composition of the infectious particle is still obscure.

Diversity of Abnormal PrP

Historically, abnormal PrP was recovered after solubilization of infected tissues or cells in non-denaturing detergents followed by digestion with proteases.⁸ In these conditions, most proteins (including normal PrP) are degraded by proteinase K (PK) treatment while a PK-resistant PrP species is recovered in the pellet after centrifugation of the infected samples. These large insoluble pelleted aggregates, termed PrP^{res}, are clearly infectious,⁹ i.e., are able to transmit disease or infection upon experimental inoculation of animals or of susceptible cultured cells. However, whether prion infectivity is entirely congruent with these large PrP^{res} aggregates is still a matter of debate.¹⁰ First, these species, appearing as fibrils (called scrapie-associated fibrils¹¹ or rods¹²) under the electron microscope, may form as a consequence of detergent extraction.¹³ Second, in some models of prion disease, significant levels of infectivity were detected in the absence of detectable typical PrP^{res},^{14,15} while in others, infectivity and large PrP^{res} aggregates have strikingly distinct sedimentation profiles in density gradients.¹⁶ Third, as first suggested by Safar and co-workers,¹⁷ it is now increasingly clear that infected cells and tissues also accumulate abnormal PrP forms that lack prototypical insolubility and/or resistance to proteolysis. Fourth, different patterns of abnormal PrP deposits may be observed upon immunohistochemical analysis of non-solubilized infected brains. Proteinase K-resistant PrP deposits typically observed as a diffuse punctate staining can coexist with focal, plaque-like PrP immunoreactivity.¹⁸ Altogether, these findings support the view that what is collectively referred to as abnormal PrP is in fact a population

of diverse entities. Notably, recent evidence suggests that cloned prion strains become heterogeneous upon multiplication in cultured cells,¹⁹ raising the possibility that these variants (or quasispecies) may be related to abnormal PrP diversity. In any case, deciphering the respective roles of these different PrP^{Sc} entities in prion pathogenesis is a renewed challenge.

To explore the diversity of infectious PrP^{Sc}, we chose to analyze persistently infected cultured cells, a much simpler model than brain that has been proven to stably produce high titers of prions without degenerative changes.²⁰ Amongst different paradigms, we selected a sheep prion agent (PG127) for its ability to stably multiply in the ovRK13 (also known as Rov) cell line²¹ as well as in cultured primary neurons.²² In addition, this prion agent can be rapidly quantified through our recently-developed cell-based assay.²³ Upon solubilization and PK digestion of infected cells, we recovered large PrP^{res} aggregates in the pellets of 100,000x g ultracentrifuged samples.²⁴ As expected, this material was infectious. Strikingly, we observed a previously unnoticed PrP^{res} species that remained in the corresponding supernatants. These supernatants were no longer infectious after selective immunoprecipitation of PrP^{res}. Ultrafiltration experiments indicated that these PrP^{res} species (and their associated infectivity) readily pass through 300-kDa filters, in contrast to typical large PrP^{res} aggregates. However, these small PrP^{res} aggregates were eventually pelleted at higher ultracentrifugation forces. Finally, preliminary observations with moRK13 cells²⁵ infected with different murine prion strains suggest that recovery of small PrP^{res} aggregates is not limited to one strain of prion. Although further purification will be required to assess their molecular composition, these findings indicate that small, infectious PrP^{res} aggregates can be recovered from infected living cells after a standard solubilization step.²⁴ While these data further document the diversity of abnormal PrP, what do they tell us about the features of infectious PrP^{Sc}? The possibility that PrP^{res} aggregates do not necessarily need to be large to be infectious is not new. Several studies already showed that *in vitro* treatments (including sonication

and denaturation/renaturation) to break up large PrP^{res} aggregates did not abolish prion infectivity.²⁶⁻²⁸ Furthermore, physical disruption of large detergent-extracted PrP^{res} aggregates led to smaller aggregates that proved to be more infectious than the larger ones.²⁹ This later study raised the interesting possibility that small aggregates may be more efficient to initiate infection, presumably by providing more competent seeds. However, whether this possibility is applicable to real life or is limited to harsh *in vitro* conditions is an open question. This is a particularly relevant issue as abnormal PrP fragmentation in mammalian cells and how this is achieved remain open questions. This could occur through mechanical stress (*in vitro*, agitation results in fibril fragmentation³⁰) and/or through enzyme-mediated processes. In yeast cells, the Hsp104-chaperone-mediated fibril scission is required for prion maintenance.³¹ Since yeast prions can also stably multiply in mammalian cells lacking Hsp104 orthologs,³² other chaperone(s) might be involved. However, the cellular activities involved in abnormal PrP fragmentation remain to be identified. Alternatively, small PrP^{res} aggregates may be metabolic intermediates in the formation of the larger ones. We have previously shown that prions are actively secreted into the extracellular space of cultured infected cells, in association with microvesicles known as exosomes.³³ Infectious exosomes are released upon fusion of endosomal multivesicular bodies (MVB) with the plasma membrane³⁴ and may serve as a vehicle for prion dissemination.³⁵ We have preliminary indications that infectious exosomes carry small PrP^{res} aggregates and are currently testing the possibility that these species are generated along the endocytic pathway. In any case, the recovery of cell-derived small infectious PrP^{res} aggregates in the absence of harsh *in vitro* denaturing treatment provides a strong biological basis to study their role in prion multiplication.

Whether these small aggregates are more infectious than the large ones is an important issue that remains to be addressed. Considering that these entities represent about 10% of total PrP^{res} and of infectivity, their specific infectivity appears roughly similar to that of their

larger counterparts. However, we later found that these small species became highly aggregated as a consequence of the methanol precipitation step used before their inoculation. Therefore, other isolation conditions allowing better preservation of their conformational integrity are being developed to accurately test their infectious potential.

Biochemical detection of PrP^{res} is much less sensitive than assaying infectivity, implying that infectivity can be readily measured in samples with undetectable PrP^{res}. Nevertheless, there are few examples of high infectivity levels with barely detectable PrP^{res}.^{14,15} In addition, infectivity does not necessarily copartition with the bulk of PrP^{res}. In a recent study,¹⁶ solubilized material from brains infected with different sheep scrapie agents was density fractionated. There was no obvious correlation between the sedimentation profiles of infectivity and PrP^{res} aggregates, supporting the view that the latter are not the only infectious entities. Strikingly, for two strains, including the PG127 used in our study, the vast majority (>99%) of infectivity was found in the light fractions of the gradients. Whether small PrP^{res} aggregates, such as those detected in our study²⁴ or those generated *in vitro*,²⁹ are responsible for the high levels of infectivity in these fractions is therefore an interesting possibility.

PK-Sensitive Prions

In the recent years, PK-sensitive infectivity and PK-sensitive abnormal PrP have received an increasing amount of attention. For some,³⁶ but not all³⁷ prion strains, PK digestion results in a marked reduction of the infectious titer. The simpler explanation for the preceding observation is that most of the prion infectivity is destroyed by the protease treatment, suggesting PK-sensitive prion infectivity. However, this does not rule out alternative possibilities (e.g., truncated PrP²⁷⁻³⁰ generated by the PK treatment might have a lower specific infectivity than full-length PrP^{res}). Interestingly, defined conditions of proteolysis with an alternate protease, pronase, followed by precipitation with sodium phosphotungstic acid preserved most of the infectious titer,

indicating that pronase did not destroy the putative PK-sensitive infectivity.³⁸ The next challenging step for characterizing PK-sensitive, pronase-resistant infectivity will require its isolation from PK-resistant prions.

From a biochemical point of view, evidence for PK-sensitive abnormal PrP was originally reported by Safar and co-workers in infected hamsters¹⁷ and subsequently confirmed in other paradigms.^{39,40} These forms differ from normal PrP as they are absent from uninfected samples, and they require denaturation to be immunodetected. Yet, in contrast to typical PrP^{res}, they are destroyed upon PK proteolysis. PK-sensitive PrP^{sc}, isolated by gel filtration⁴¹ or differential ultracentrifugation,⁴² contains small PrP aggregates. Although they were able to prime the conversion of normal PrP in PMCA reactions,⁴² there are no published data showing that these PrP species are infectious. Thus, the role of PK-sensitive PrP^{sc} in the multiplication of prions remains to be clarified. However, these abnormal forms may become important markers for the diagnosis of prion disease⁴³ if indeed they are more abundant than typical PrP^{res}.

There has been a recent claim regarding the generation of protease-sensitive prions⁴⁴ in transgenic tg9949 mice overexpressing a truncated form of PrP. Presumably due to massive (16- to 32-fold) PrP overexpression, tg9949 mice spontaneously develop a neurological disease late in life, in the absence of any detectable neuropathological changes. When inoculated with amyloid fibril preparations generated *in vitro* with recombinant mouse PrP, they develop brain vacuolization and accumulation of an abnormal PK-sensitive PrP that is active in an Amyloid Seeding Assay (ASA). However, because of the spontaneous neurological disease, no specific clinical signs could be ascribed to the inoculated materials. Brain vacuolization and abnormal PrP deposition were observed after serial inoculations into further tg9949 mice, but not in wild type mice. Because prions are operationally defined as the transmissible agents responsible for a clinical disease in wild-type animals it is presently unclear whether bona fide prions are involved in the observed vacuolization process. An alternate

explanation, yet unproven, would be that the inoculated material has accelerated the onset of the spontaneous vacuolization process in these transgenic mice.

Infectious versus Neurotoxic PrP Species

The cellular and molecular mechanisms that eventually lead to neuronal damage are far from being understood⁴⁵ and the toxic forms of PrP have not been identified. Toxicity and infectivity may not necessarily be mediated by the same abnormal PrP species^{46,47} because PrP-dependent neurodegeneration may occur in the absence of infectivity⁴⁸ and high levels of infectivity may show little pathogenic effects. There are indications that topology, trafficking or signaling of normal PrP may be altered in response to prion multiplication and these could in turn affect cell viability.² On the other hand, a gain of function of PrP^{sc} is likely associated with neuronal death, either directly or indirectly. Given what is known about abnormal PrP diversity, all PrP^{sc} subsets may not be equally toxic. The most harmful may be small PrP^{sc} species (i.e., oligomers) as has been proposed for misfolded proteins involved in other neurodegenerative diseases (e.g., Alzheimer's disease).⁴⁹ Accordingly, it will be important to determine whether small PrP^{res} aggregates obtained *in vitro*²⁹ or recovered from cells or tissues²⁴ are potent neurotoxic species.

The diversity of abnormal PrP, the possible overlap between the infectious entities and those triggering neurotoxicity are fascinating and complex issues that may be important in further proteinopathies as well.

Acknowledgments

We thank Graca Raposo, Vincent Setola and Marie-Christine Vilette for their helpful suggestions on the manuscript.

References

1. Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:519-50.
2. Aguzzi A, Calella AM. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 2009; 89:1105-52.
3. Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med* 2004; 10:63-7.

4. Chesebro B. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathy diseases. *Neuron* 1999; 24:503-6.
5. Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967; 215:1043-4.
6. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13363-83.
7. Diaz-Espinoza R, Soto C. Generation of prions in vitro and the protein-only hypothesis. *Prion* 2010; 4:53-9.
8. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218:1309-11.
9. Prusiner SB. Chemistry and biology of prions. *Biochemistry* 1992; 31:12277-88.
10. Aguzzi A, Heikenwalder M, Polyimenidou M. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:552-61.
11. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1981; 54:63-74.
12. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35:349-58.
13. McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A, et al. Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* 1991; 65:1340-51.
14. Barron RM, Campbell SL, King D, Bellon A, Chapman KE, Williamson RA, et al. High titers of transmissible spongiform encephalopathy infectivity associated with extremely low levels of PrP^{Sc} in vivo. *J Biol Chem* 2007; 282:35878-86.
15. Lasmez C, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, et al. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997; 275:402-5.
16. Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J, Le Dur A, et al. The Physical Relationship between Infectivity and Prion Protein Aggregates Is Strain-Dependent. *PLoS Pathog* 2010; 6:1000859.
17. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4:1157-65.
18. Parchi P, Cescatti M, Notari S, Schulz-Schaeffer WJ, Capellari S, Giese A, et al. Agent strain variation in human prion disease: insights from a molecular and pathological review of the National Institutes of Health series of experimentally transmitted disease. *Brain* 2010; 133:3030-42.
19. Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science* 2010; 327:869-72.
20. Vilette D. Cell models of prion infection. *Vet Res* 2008; 39:10.
21. Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, et al. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4055-9.
22. Cronier S, Laude H, Peyrin JM. Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:12271-6.
23. Arellano-Anaya ZA. A Simple, Versatile and Sensitive Cell-Based Assay for Prions from Various Species. *PLoS One* 2011; In press.
24. Arellano Anaya ZE, Savitschenko J, Massonneau V, Lacroux C, Andreoletti O, Vilette D. Recovery of small infectious PrPres aggregates from prion-infected cultured cells. *J Biol Chem* 2011; 86:8141-8.
25. Courageot MP, Daude N, Nonno R, Paquet S, Di Bari MA, Le Dur A, et al. A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* 2008; 89:341-7.
26. Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:4017-21.
27. Manousis T, Verghese-Nikolaki S, Keyes P, Sachamanoglou M, Dawson M, Papadopoulos O, et al. Characterization of the murine BSE infectious agent. *J Gen Virol* 2000; 81:1615-20.
28. Riesner D, Kellings K, Post K, Wille H, Serban H, Groth D, et al. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol* 1996; 70:1714-22.
29. Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, et al. The most infectious prion protein particles. *Nature* 2005; 437:257-61.
30. Lee S, Fernandez EJ, Good TA. Role of aggregation conditions in structure, stability and toxicity of intermediates in the Abeta fibril formation pathway. *Protein Sci* 2007; 16:723-32.
31. Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* 1995; 268:880-4.
32. Krammer C, Schatzl HM, Vorberg I. Prion-like propagation of cytosolic protein aggregates: insights from cell culture models. *Prion* 2009; 3:206-12.
33. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:9683-8.
34. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:415-21.
35. Fevrier B, Vilette D, Laude H, Raposo G. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 2005; 6:10-7.
36. Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J, et al. Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* 2008; 416:297-305.
37. Deleault AM, Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S. The effects of prion protein proteolysis and disaggregation on the strain properties of hamster scrapie. *J Gen Virol* 2008; 89:2642-50.
38. D'Castro L, Wenborn A, Gros N, Joiner S, Cronier S, Collinge J, et al. Isolation of proteinase K-sensitive prions using pronase E and phosphotungstic acid. *PLoS One* 2010; 5:15679.
39. Pirisinu L, Di Bari M, Marcon S, Vaccari G, D'Agostino C, Fazzi P, et al. A new method for the characterization of strain-specific conformational stability of protease-sensitive and protease-resistant PrP. *PLoS One* 2010; 5:12723.
40. Thackray AM, Hopkins L, Bujdosó R. Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem J* 2007; 401:475-83.
41. Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, Horonchik L, Yedidia Y, Shaked G, et al. Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* 2002; 41:12868-75.
42. Pastrana MA, Sajjani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C, et al. Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* 2006; 45:15710-7.
43. Safar JG, Geschwind MD, Deering C, Didorenko S, Sattavat M, Sanchez H, et al. Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:3501-6.
44. Colby DW, Wain R, Baskakov IV, Legname G, Palmer CG, Nguyen HO, et al. Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathog* 2010; 6:1000736.
45. Soto C, Satani N. The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med* 2010.
46. Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 2007; 318:930-6.
47. Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* 2011; 470:540-2.
48. Solomon IH, Schepker JA, Harris DA. Prion neurotoxicity: insights from prion protein mutants. *Curr Issues Mol Biol* 2010; 12:51-61.
49. Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26:267-98.

AUTHOR : ARELLANO ANAYA Zaira Esperanza

TITLE: Study of the multiplication of prions in cell culture and analysis of the infectious forms of the PrP protein.

DIRECTOR OF THESE: Dr. Didier VILETTE

Date and place of defense: Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, September 21, 2011.

SUMMARY

Prions are infectious agents responsible for transmissible spongiform encephalopathies, which are fatal neurodegenerative disorders. These agents are made of a protein (PrP^{sc}) which becomes infectious upon abnormal folding of the normal PrP^c protein. In this study, we studied the extracellular release of prions from cells chronically infected with different prion strains and we also analysed the associated abnormal PrP. We first used rabbit RK13 epithelial cells to develop a titration assay in a cell format. This system allows a fast, robust and sensitive quantification of different prion strains without resorting to animal inoculation. We then show that cell cultures infected with several prion strains secrete prions and abnormal PrP in association with microvesicles of endosomal origin (exosomes). However, the effectiveness of this release may depend on the prion strain used. Biochemical analysis of the cellular and extracellular infectious prions led to the characterization of a new form of abnormal PrP. This form is resistant to proteolysis, much less insoluble than classical PrP^{res} and may be small aggregates of PrP^{res}. It may be generated in the endosomal compartment.

KEY WORDS: Prions, PrP^{res}, scrapie cell assay, exosomes, infectivity, small aggregates.

ADMINISTRATIVE DISCIPLINE: Spécialité Immunologie et Maladies infectieuses.

THESIS MADE IN: UMR 1225 INRA-ENVT Interactions Hôte-Agent Pathogène

23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 03, FRANCE.