

Université  
de Toulouse

# THÈSE

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

Immunologie et Maladies Infectieuses

---

**Présentée et soutenue par :**

Hervé CASSARD

**le :** lundi 26 novembre 2012

**Titre :**

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DIVERSITE BIOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE  
DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

---

**Ecole doctorale :**

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

**Unité de recherche :**

UMR 1225 INRA/ENVT Interactions Hôtes-Agents Pathogènes

**Directeur(s) de Thèse :**

Dr. Olivier ANDREOLETTI

Dr. Caroline LACROUX

**Rapporteurs :**

Pr. Sylvain LEHMANN

Dr. Sophie MOUILLET-RICHARD

**Membre(s) du jury :**

Pr. François COUDERC - Président

Dr. Vincent BERINGUE - Examinateur

Dr. Frédéric LANTIER - Examinateur

Dr. Juan Maria TORRES - Examinateur

Dr. Olivier ANDREOLETTI - Directeur







# **REMERCIEMENTS**

**A M. le Professeur François COUDERC,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse

**A Mme le Docteur Sophie MOUILLET-RICHARD**

**M. le Professeur Sylvain LEHMANN**

Qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail

**A M. le Docteur Vincent BERINGUE**

**M. le Docteur Frédéric LANTIER**

**M. le Docteur Juan Maria TORRES**

Qui ont accepté d'examiner ce travail

**A M. le Docteur Olivier ANDREOLETTI**

**A Mme le Docteur Caroline LACROUX**

Qui ont respectivement dirigé et co-encadré ce travail. Pour leur patience et leur aide.

Sincères et amicaux remerciements.



Pour paraphraser Magritte, je dirais que « ceci n'est pas une thèse ». C'est une véritable tranche de vie. Je tiens donc à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, ont rendu cette période plus agréable ou m'ont aidé à traverser les moments difficiles.

### **Aux membres de l'équipe « EST » de l'UMR INRA/ENVT IHAP**

A Olivier et Caro, qui m'ont fait découvrir le monde du prion (ou qui m'ont mis le pied à l'étrier si tu préfères Caro !). J'espère que nous pourrions encore manger quelques kilos de côtes de bœuf et boire quelques litres de vins de Bourgogne ensemble avant de nous mettre à nous gratter et à trembler !

A François Schelcher, qui m'a donné le virus de la médecine bovine et qui m'a tant appris.

A Séverine et Pierrette, les magiciennes du western et du Pet-blot, pour leur aide ô combien précieuse !

A Didier, Alvina, Zaïra, Jimmy.

**Aux « prionologues » de France, d'Espagne, de Norvège ou d'Outre-Manche**, qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

### **Au personnel de l'animalerie A3**

A Jean-Marc, Marion, Stéphanie, Martine. Merci pour votre gentillesse et votre travail.

Aux souris, qui doivent nous maudire...

### **Aux membres du service de Pathologie des Ruminants et apparentés**

Aux enseignants, avec qui j'ai plaisir à travailler : les deux Gilles, Renaud, Didier, Marie-Noëlle.

Aux générations successives d'assistants, qui ont apporté une touche de fraîcheur (et de finesse) au service : Bubble la raclure, Adrien, Espinasse, Alex F., Le Pat, La Pune, Fred, Alex B. , Dumé, La Bourde, Seb la blatte, Flonflon, Math, Jean-Seb, Foufoune, Pauline et Rhymbow, Nono, Etienne, Thomas, Elise, Mumu, Cyrielle, Kev et Marie...j'en passe et des meilleurs (ou des pires !).

A Françoise et à l'inénarrable Laurent.

A tous les autres membres du personnel.

### **A ma famille**

A mon père, à mes sœurs et leurs petites familles, à ma grand-mère. Je vous aime !

### **A mes amis**

A Stéphane et Julie, Vincent et Sandrine, Didier, Rémi. Je suis ravi que le nombre des années (vingt ans déjà !) n'ait pas altéré notre amitié.

A Baldak, Pat et Sophie, Titi et Domi, Tony, Phiphine, Max, Fabien, Zbeb, ma famille véto. Nos rencontres sont bien trop rares, il faut y remédier !

A Maud. Les moments passés ensemble me manquent. Reviens vite !

A Yannick and co. Aux fêtes à venir...

A Caroline (boucle d'or). Merci pour ton soutien et ton écoute.

A Claire. La belle rencontre de cette fin de thèse. Ce sera bientôt ton tour !

A Marina la Kosovarde. Promis, dès que j'ai fini, je viens te voir !

A tous ceux que j'ai pu oublier...



**A ma mère...**



# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1 LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES .....</b>	<b>3</b>
1.1 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles de l'Homme .....	3
1.1.1 La Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique.....	4
1.1.2 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles familiales .....	5
1.1.2.1 Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale .....	5
1.1.2.2 Insomnie fatale familiale .....	5
1.1.2.3 Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker .....	6
1.1.3 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles infectieuses ou iatrogènes.....	6
1.1.3.1 Kuru .....	6
1.1.3.2 Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob .....	6
1.1.3.3 Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène.....	7
1.2 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles des animaux .....	8
1.2.1 Tremblante .....	9
1.2.2 Encéphalopathie spongiforme bovine .....	9
1.2.3 Encéphalopathie spongiforme féline .....	10
1.2.4 Maladie du dépérissement chronique des cervidés .....	10
1.2.5 Encéphalopathie transmissible du vison .....	11
1.3 Caractéristiques communes aux Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles...	11
1.3.1 Caractéristiques cliniques.....	11
1.3.2 Caractéristiques lésionnelles .....	12
1.3.2.1 Lésions macroscopiques .....	12

1.3.2.2	Lésions microscopiques.....	12
1.3.3	Transmissibilité .....	13
1.4	Etiologie.....	14
1.4.1	Un agent de petite taille.....	14
1.4.2	Un agent non immunogène .....	14
1.4.3	Un agent transmissible non conventionnel.....	15
1.4.3.1	Résistance aux procédés physiques de décontamination.....	15
1.4.3.2	Résistance aux procédés chimiques de décontamination .....	16
1.4.4	Un agent protéique ? .....	17
1.4.4.1	Les Scrapie-Associated Fibrils .....	17
1.4.4.2	Le gène <i>PRNP</i> .....	18
1.4.4.3	La PrP <sup>c</sup> .....	21
1.4.4.4	La PrP <sup>Sc</sup> .....	32
1.4.4.5	La théorie de la « protéine seule » ( <i>protein only</i> ).....	35
<b>2</b>	<b>DIVERSITE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES .....</b>	<b>42</b>
2.1	Notion de souche de prion .....	42
2.2	Principaux critères de souche <i>in vivo</i> .....	43
2.2.1	Durée d'incubation.....	43
2.2.2	Profil lésionnel et profil de distribution de la PrP <sup>Sc</sup> .....	45
2.2.3	Lymphotropisme .....	46
2.2.4	Tableau clinique .....	47
2.3	Application du typage biologique des souches de prion .....	47
2.3.1	Etude de la biodiversité des agents des EST animales.....	47
2.3.2	Démonstration du caractère zoonotique de l'ESB .....	49
2.4	Typage biochimique des souches .....	51

2.4.1	Thermorésistance .....	51
2.4.2	Profil électrophorétique.....	52
2.4.2.1	Glycoprofil.....	52
2.4.2.2	Masse moléculaire de la bande non glycosylée.....	53
2.4.3	Résistance à la digestion par les protéases .....	55
2.4.4	Conformation/Résistance à la dénaturation.....	56
2.5	Applications du typage biochimique de souche .....	58
2.5.1	Classification des cas de MCJ sporadique .....	58
2.5.2	Découverte d'ESB atypiques .....	61
2.5.3	Découverte de cas de tremblante atypique .....	62
2.6	Limites des typages biologique et biochimique des souches de prion .....	63

### **3 FRANCHISSEMENT DES BARRIERES DE TRANSMISSION ET CONSEQUENCES SUR LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PRIONS .....64**

3.1	Un problème conceptuel aux implications sanitaires majeures.....	64
3.2	Evolution des propriétés des prions lors de transmission interspécifique.....	65
3.2.1	Absence totale de transmission / Infection asymptomatique chronique .....	65
3.2.2	Conservation/Altération des propriétés de souche .....	66
3.2.3	Emergence d'un nouvel agent .....	67
3.3	Déterminants des barrières de transmission .....	69
3.3.1	Séquence de la PrP .....	69
3.3.2	Nature de l'agent .....	69
3.4	Mécanismes moléculaires impliqués .....	70
3.5	Modélisation du franchissement des barrières de transmission.....	71
3.5.1	Bio-essais sur hôtes conventionnels.....	72
3.5.2	Modèles animaux transgéniques .....	73
3.5.3	Vers une modélisation <i>in vitro</i> ? .....	74

3.5.4	Bilan .....	76
<b>OBJECTIFS</b> .....		<b>77</b>
<b>RESULTATS</b> .....		<b>81</b>
<b>1 DIVERSITE DES PRIONS RESPONSABLES DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB ET HETEROGENEITE DES SIGNATURES BIOCHIMIQUES DE LA PRP<sup>RES</sup></b> .....		<b>83</b>
1.1	Problématique de la diversité des agents de la maladie de MCJ sporadique .....	83
1.2	Les formes iatrogènes de MCJ : une opportunité pour l'étude de la diversité des agents de la MCJ sporadique ? .....	84
<b>2 FRANCHISSEMENT DES BARRIERES DE TRANSMISSION INTERSPECIFIQUES PAR LES PRIONS RESPONSABLES DE TREMBLANTE ET CONSEQUENCES SUR LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES</b> .....		<b>97</b>
<b>DISCUSSION</b> .....		<b>145</b>
<b>1 PRP<sup>SC</sup> ET DIVERSITE DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES: UN MIROIR AUX ALOUETTES ?</b> .....		<b>147</b>
<b>2 QUELLE DIVERSITE BIOLOGIQUE POUR LES AGENTS RESPONSABLES DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB SPORADIQUE?</b> .....		<b>148</b>
<b>3 BARRIERES DE TRANSMISSION ET EVOLUTION DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES : DU CONCEPT A LA REALITE SANITAIRE</b> .....		<b>150</b>
<b>4 POTENTIEL ZONOTIQUE DES PRIONS RESPONSABLES DE TREMBLANTE CLASSIQUE ET RISQUES SANITAIRES ASSOCIES</b> .....		<b>152</b>

**ANNEXE ..... 157**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 163**





# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification des EST humaines.....	3
<b>Tableau 2</b> : Critères utilisés pour établir une suspicion de MCJ sporadique <i>ante mortem</i> .....	5
<b>Tableau 3</b> : caractéristiques épidémiologiques des EST animales.....	8
<b>Tableau 4</b> : Propriétés comparées de la PrP <sup>c</sup> et de la PrP <sup>Sc</sup> .....	33
<b>Tableau 5</b> : Prions décrits chez les levures et les champignons filamenteux.....	36
<b>Tableau 6</b> : Critères utilisables pour distinguer expérimentalement des souches de prion ....	43
<b>Tableau 7</b> : Origine et diversité des souches d'EST chez les rongeurs conventionnels .....	48
<b>Tableau 8</b> : Classification des cas de MCJ sporadique proposée par Parchi .....	59
<b>Tableau 9</b> : Modèles murins transgéniques pour le gène <i>PRNP</i> .....	159

## Figures

<b>Figure 1</b> : Structure de la PrP <sup>c</sup> murine.....	22
<b>Figure 2</b> : structure tridimensionnelle de la PrP <sup>c</sup> humaine obtenue par RMN .....	23
<b>Figure 3</b> : Cycle intracellulaire de la PrP <sup>c</sup> .....	24
<b>Figure 4</b> : Structure tridimensionnelle hypothétique de la PrP <sup>Sc</sup> .....	34
<b>Figure 5</b> : Durées d'incubation de huit souches d'EST chez des souris de génotypes <i>Prnp-a</i> , <i>Prnp-b</i> et <i>Prnp-ab</i> .....	44
<b>Figure 6</b> : Comparaison des profils lésionnels obtenus chez des souris RIII inoculées avec des isolats de v-MCJ (n=3) ou un isolat d'ESB.....	50
<b>Figure 7</b> : Profils électrophorétiques des deux types humains de PrP <sup>res</sup> en western blot.....	54
<b>Figure 8</b> : Cinétique de dégradation par la PK de la PrP <sup>res</sup> associée aux souches HY et DY .	55
<b>Figure 9</b> : Principe d'un test ELISA permettant de discriminer l'ESB de la tremblante classique .....	56
<b>Figure 10</b> : Profil électrophorétique de la PrP <sup>res</sup> dans les 9 catégories de cas de MCJ définies par Hill et <i>al.</i> .....	60

<b>Figure 11 :</b> Profil électrophorétique de la PrP <sup>res</sup> issue d'isolats d'ESB classique et atypiques .....	61
<b>Figure 12 :</b> Comparaison des profils électrophorétiques de la PrP <sup>res</sup> extraites d'isolats de tremblante classique et atypique .....	62
<b>Figure 13 :</b> Principe du modèle de sélection conformationnelle.....	70
<b>Figure 14 :</b> Explication du phénomène de mutation selon le modèle de sélection conformationnelle.....	71

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AHP</b>	Hyperpolarisation consécutive au potentiel d'action
<b>APP</b>	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
<b>ATNC</b>	Agent transmissible non conventionnel
<b>CWD</b>	<i>Chronic Wasting Disease</i>
<b>DY</b>	<i>Drowsy</i>
<b>EEG</b>	Electroencéphalogramme
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ESB</b>	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
<b>ESF</b>	Encéphalopathie Spongiforme Féline
<b>EST</b>	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
<b>FVO</b>	Farine de Viande et d'Os
<b>GdnHCl</b>	Chlorhydrate de Guanidine
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
<b>GPI</b>	Glycosyl-Phosphatidylinositol
<b>GSS</b>	Gerstmann Straüssler Scheinker
<b>HY</b>	<i>Hyper</i>
<b>IC</b>	Intracérébrale
<b>IP</b>	Intrapéritonéale
<b>IFF</b>	Insomnie Fatale Familiale
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>IRTF</b>	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<b>MCJ</b>	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NPU</b>	<i>Neuropathogenesis Unit</i>
<b>OIE</b>	Office International des Epizooties
<b>OR</b>	<i>Octarepeat</i>
<b>ORF</b>	Cadre ouvert de lecture
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

<b>PET Blot</b>	<i>Paraffin Embeded Tissue Blot</i>
<b>PK</b>	Protéinase K
<b>PLT</b>	Potentialisation à Long Terme
<b>PMCA</b>	<i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i>
<b>PrP</b>	Protease resistant Protein
<b>QuIC</b>	<i>Quacking Induced Conversion</i>
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SAF</b>	<i>Scrapie Associated Fibrils</i>
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de Sodium
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SOD</b>	Superoxide Dismutase
<b>TME</b>	<i>Transmissible Mink Encephalopathy</i>
<b>vMCJ</b>	variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>

# **INTRODUCTION**



# 1 LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives affectant naturellement l'Homme et de nombreuses autres espèces de mammifères.

## 1.1 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles de l'Homme

Il est possible de classer les EST de l'Homme sur des bases épidémiologiques et cliniques. Les circonstances d'apparition permettent ainsi de distinguer :

- les EST sporadiques dont la cause est inconnue
- les EST familiales ou génétiques, liées à des mutations ou des insertions ponctuelles au sein du gène *PRNP* (cf. 1.4.4.2) et transmises selon un mode autosomal dominant avec une pénétrance parfois incomplète
- les EST « infectieuses », acquises accidentellement, par contamination alimentaire ou iatrogène.

La maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) est la seule EST humaine représentée dans ces trois groupes (tableau 1).

**Tableau 1 :** Classification des EST humaines

Origine	Maladie	Fréquence
Sporadique	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique	85 % des cas d'EST humaines 1 cas/million d'individus/an
Familiale ou génétique	Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale	10-15 % des cas d'EST humaines 188 cas en France depuis 1992
	Insomnie fatale familiale	
	Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheincker	
Infectieuse ou iatrogène	Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène	≈ 460 cas dans le monde au 1 <sup>er</sup> août 2012, dont 128 en France
	Variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob	224 cas dans le monde au 1 <sup>er</sup> août 2012, dont 27 en France
	Kuru	Maladie décrite uniquement en Papouasie-Nouvelle Guinée

### 1.1.1 La Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique

L'expression « maladie de Creutzfeldt-Jakob » a été utilisée pour la première fois en 1922 par Walther Spielmeyer suite à l'identification par Hans Gerhard Creutzfeldt et Alfons Maria Jakob de lésions cérébrales ne pouvant être associées à aucune maladie précédemment connue chez six patients atteints de troubles neurodégénératifs <sup>258</sup>. Même si des études rétrospectives ont montré que certains de ces cas ne pouvaient pas être considérés, selon les critères diagnostiques actuels, comme de véritables cas d'EST <sup>290</sup>, cette dénomination fut néanmoins conservée.

La MCJ sporadique atteint généralement des patients âgés de plus de 50 ans (4 à 5 cas/million d'individus/an dans cette tranche d'âge) avec un pic d'incidence entre 60 et 65 ans. La mort survient le plus souvent moins de 6 mois après le début des symptômes <sup>258</sup>.

C'est une pathologie difficile à diagnostiquer du fait de la diversité des signes cliniques qui peuvent lui être associés. Hormis une démence rapidement progressive, qui est le seul symptôme quasi-constant, le tableau clinique de la MCJ sporadique peut comprendre des myoclonies, de l'ataxie, des troubles visuels, un syndrome pyramidal ou extra-pyramidal et peut évoluer vers un mutisme akinétique <sup>258, 445</sup>. Face à cet éventail de manifestations cliniques le recours à l'électroencéphalogramme (activité pseudo-périodique typique dans 70 % des cas) <sup>258, 443, 445</sup>, l'imagerie par résonance magnétique (hypersignal du noyau caudé et/ou du putamen) <sup>505</sup> ou la recherche de protéine 14-3-3 dans le liquide céphalorachidien <sup>267</sup> est indispensable pour établir une suspicion de MCJ *ante mortem* (tableau 2).



**Tableau 2** : Critères utilisés pour établir une suspicion de MCJ sporadique *ante mortem*  
(d'après [625])

I	Démence rapidement progressive
II	Myoclonies
	Anomalies visuelles ou cérébelleuses
	Syndrome pyramidal ou extrapyramidal
	Mutisme akinétique
III	EEG typique
IV	Hypersignal du noyau caudé ou du putamen à l'IRM cérébrale

MCJ sporadique probable : I + 2 symptômes de II + III ou IV  
ou  
cas possible + présence de protéine 14-3-3 dans le LCR

MCJ sporadique possible : I + 2 symptômes de II + durée d'évolution < 2 ans

## 1.1.2 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles familiales

### 1.1.2.1 Maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale

C'est la plus fréquente des EST humaines d'origine génétique.

La forme familiale de la MCJ se déclare plus précocement (25-60 ans) que la forme sporadique. Les signes cliniques diffèrent en fonction de l'anomalie génétique impliquée et la durée d'évolution varie de quelques mois à quelques années (plus de 10 ans dans certains cas)<sup>75, 215</sup>.

### 1.1.2.2 Insomnie fatale familiale

L'Insomnie Fatale Familiale (IFF) se déclare entre 40 et 50 ans (extrêmes : 20-63 ans) et évolue en moyenne en 18 mois<sup>200, 407</sup>. Les principaux signes cliniques sont une insomnie d'apparition progressive, une dysautonomie, des troubles moteurs (ataxie, tremblements, myoclonies, hyperréflexie) et des troubles de l'attention et de la mémoire<sup>200, 361</sup>.

### 1.1.2.3 **Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker**

L'incidence du syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) est estimée à 1 à 10 cas/100 millions d'individus/an<sup>312</sup>. Les premiers symptômes apparaissent chez des individus âgés de 40 à 60 ans ; l'évolution est souvent longue (5 à 6 ans en moyenne). A chaque mutation correspond une forme clinique particulière. Malgré ce polymorphisme, les symptômes les plus fréquemment rapportés sont une ataxie cérébelleuse progressive et une démence tardive<sup>349</sup>.

## 1.1.3 **Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles infectieuses ou iatrogènes**

### 1.1.3.1 **Kuru**

Le kuru a été découvert dans les années 1950 au sein de la communauté Fore de Papouasie-Nouvelle Guinée<sup>197, 621</sup>. Les rites anthropophages pratiqués lors de cérémonies funéraires étaient à l'origine de la transmission horizontale de la maladie. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'apparition du kuru est une contamination initiale à partir d'un cas d'EST sporadique, dont l'agent aurait ensuite été propagé grâce au cannibalisme<sup>9, 579</sup>.

La période d'incubation moyenne du kuru a été estimée à 12 ans. Cependant, l'étude des cas apparus après l'interdiction des pratiques anthropophages par les autorités australiennes a permis d'établir que la phase asymptomatique pouvait atteindre au moins 50 ans<sup>136</sup>. La maladie, caractérisée par une ataxie progressive, évolue en quelques mois<sup>134, 136</sup>.

### 1.1.3.2 **Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob**

La première description du variant de la MCJ (vMCJ) date de 1996<sup>600</sup>. Rapidement, il a été démontré que cette nouvelle EST était causée par l'agent responsable de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), mettant ainsi en évidence une contamination par voie alimentaire à partir de viande bovine<sup>85, 133, 254</sup>. Au 1<sup>er</sup> août 2012, 224 cas de vMCJ ont été recensés<sup>626</sup>, dont 27 en France, auxquels viennent s'ajouter 4 cas « secondaires » attribués à des transfusions sanguines réalisées avec du sang d'individus en phase asymptomatique de la maladie (n=3)<sup>354, 608, 624</sup> ou à l'utilisation de facteurs de coagulation contaminés (n=1)<sup>457</sup>.

Le vMCJ se distingue des autres formes de MCJ par ses caractéristiques épidémiologiques et cliniques. L'âge moyen d'apparition (28 ans) est plus faible que lors de MCJ sporadique ou familiale. Des troubles psychiatriques (dépression, anxiété, apathie, retrait, illusions) précèdent les troubles moteurs (ataxie, myoclonies), qui n'apparaissent qu'au-delà de 6 mois d'évolution. Des troubles sensitifs douloureux persistants sont rapportés dans plus de la moitié des cas <sup>65, 600</sup>.

### 1.1.3.3 Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène

Les individus atteints par la MCJ iatrogène ont été contaminés par un agent responsable de MCJ sporadique à l'occasion d'actes médicaux ou d'interventions chirurgicales. Trois modalités de contamination ont été décrites :

- L'injection intramusculaire d'hormone de croissance (226 cas répertoriés dans le monde dont 119 en France) ou de gonadotrophines, extraites d'hypophyses prélevées sur des cadavres humains <sup>77, 78</sup>. Dès la fin des années 1980, le remplacement des hormones extractives par des hormones de synthèse a permis d'éliminer cette source de contamination. Les individus atteints étaient des jeunes adultes (environ 30 ans) développant un syndrome ataxique avec une démence en fin d'évolution (17 mois en moyenne) <sup>54, 268</sup>.
- La greffe de dure-mère (228 cas répertoriés dans le monde en 2012, dont les deux tiers au Japon) ou, plus rarement, de cornée <sup>77, 78, 172</sup>. Dans ce cas, la maladie apparaissait plusieurs années après l'intervention chirurgicale et évoluait en quelques mois. Le tableau clinique était proche de celui de la MCJ sporadique <sup>250, 326, 383</sup>.
- L'utilisation d'électrodes intracérébrales <sup>47</sup> ou de matériel chirurgical contaminé <sup>185</sup>. Ce mode de contamination est extrêmement rare (5 cas dans le monde) et aucun nouveau cas n'a été décrit depuis 35 ans <sup>77, 78</sup>.

Par ailleurs, la transfusion sanguine à partir d'un donneur atteint de MCJ sporadique, n'a jamais été décrite comme modalité de contamination humaine, contrairement à ce qui a pu être observé avec le vMCJ.

## 1.2 Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles des animaux

Six EST ont été décrites chez les animaux (tableau 3), dont trois sont dues au même agent (Encéphalopathie spongiforme bovine, encéphalopathie spongiforme féline, encéphalopathie spongiforme des ongulés exotiques).

**Tableau 3** : caractéristiques épidémiologiques des EST animales

Nom (première description)	Espèces atteintes	Mode de contamination	Fréquence et répartition
<b>Tremblante</b> (1750)	Mouton Chèvre Mouflon	Contamination « verticale » : placenta, colostrum, lait Transmission horizontale : - directe (salive, urine, fèces ?) - indirecte (environnement)	Endémique dans tous les pays où l'élevage de petits ruminants est développé, à l'exception de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande
<b>Encéphalopathie spongiforme bovine</b> (1986)	Bovins	Alimentaire : farines de viande et d'os contaminées	190 626 cas dans le monde au 16 avril 2012, dont 184 619 au Royaume Uni 3 cas chez des chèvres
<b>Encéphalopathie spongiforme féline</b> (1990)	Chat Guépard Léopard d'Asie Lion Ocelot Puma Tigre	Alimentaire : viande contaminée par l'agent de l'ESB	115 cas dans le monde au 16 avril 2012 (94 chats et 21 félidés sauvages en captivité)
<b>Encéphalopathie spongiforme des ongulés exotiques</b> (1988)	Bison Eland Grand koudou Nyala Oryx algazelle Oryx gazelle Oryx d'Arabie Watusi	Alimentaire : farines de viande et d'os contaminées par l'agent de l'ESB	19 cas au Royaume-Uni entre 1986 et 2007
<b>Maladie du dépérissement chronique des cervidés</b> (1967)	Cerf mullet Cerf de Virginie Wapiti Elan	Transmission horizontale : - directe (salive, urine, fèces) - indirecte (environnement)	Endémique aux Etats-Unis et au Canada 2 cas en Corée du Sud, importés du Canada
<b>Encéphalopathie transmissible du vison</b> (1947)	Vison	Alimentaire : viande contaminée par un agent d'origine indéterminée	Maladie rare, décrite uniquement aux Etats-Unis

### 1.2.1 Tremblante

La tremblante (ou *scrapie* en anglais) est la plus ancienne EST connue. Sa description dans les cheptels ovins européens est signalée dès le XVIII<sup>ème</sup> siècle. Elle atteint naturellement les petits ruminants domestiques (mouton, *Ovis aries* et chèvre, *Capra hircus*) et sauvages en captivité (mouflon, *Ovis amon musimon*)<sup>606</sup>.

Chez les ovins, la réceptivité/sensibilité à la tremblante est étroitement contrôlée par le génotype *PRNP* (cf. 1.4.4.2). L'incidence la plus élevée est observée chez des animaux âgés de 2 à 5 ans<sup>482</sup>. La durée de la phase clinique varie de quelques semaines à quelques mois. Cependant, des cas évoluant en moins de deux semaines ont été décrits<sup>281</sup>.

Dans sa forme classique, chez les ovins, la maladie est caractérisée par des troubles locomoteurs (parésie, ataxie), des tremblements, du prurit et un amaigrissement progressif<sup>126, 127, 160, 163</sup>. Chez les caprins, le tableau clinique est dominé par une perte de poids avec une moindre intensité ou fréquence des troubles locomoteurs et du prurit<sup>107</sup>.

### 1.2.2 Encéphalopathie spongiforme bovine

L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), appelée communément « maladie de la vache folle », a été identifiée pour la première fois au Royaume-Uni en novembre 1986<sup>586</sup>. La multiplication rapide des cas d'ESB dans ce pays puis en Europe continentale, couplée à la démonstration de son caractère zoonotique (vMCJ chez l'Homme)<sup>85, 133, 254</sup>, ont provoqué une crise sanitaire majeure en Europe à partir des années 1990.

La consommation de farines de viande et d'os (FVO) contaminées a été rapidement incriminée pour expliquer l'apparition et la diffusion de l'ESB<sup>596</sup>. L'origine de l'agent causal de la maladie est cependant incertaine. L'adaptation à l'espèce bovine d'un agent de tremblante présent dans des FVO fabriquées à partir de carcasses de petits ruminants est souvent évoquée. Le recyclage de cet agent « adapté » aurait ensuite permis sa dissémination<sup>596, 597</sup>. Une autre hypothèse est la propagation d'un agent d'EST bovine sporadique préexistant, permise par l'utilisation des FVO<sup>28, 44, 106, 568</sup>.

Cliniquement, l'ESB se manifeste d'abord par des troubles du comportement et de la sensibilité. Les animaux atteints sont nerveux et semblent inquiets, même dans un environnement familier. Une hyperesthésie aux sons et au toucher est rapportée dans 80 %

des cas. Ces symptômes sont particulièrement visibles chez les vaches laitières en production qui refusent fréquemment d'entrer en salle de traite et réagissent violemment lorsque l'éleveur manipule la mamelle. Les troubles locomoteurs (ataxie, tremblements) sont discrets en début d'évolution mais leur aggravation progressive entraîne des difficultés au relever et des chutes<sup>596</sup>. Ces symptômes nerveux s'accompagnent de signes généraux, tels qu'un amaigrissement et une réduction de la production laitière. La mort survient en quelques semaines (moyenne : 2 mois), mais les animaux sont souvent euthanasiés en phase terminale. L'interdiction de l'utilisation des FVO dans l'alimentation des bovins (1990), puis des petits ruminants (1994) et enfin de toutes les espèces animales dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine (2000) a permis de maîtriser la diffusion de l'ESB au sein des populations animales. L'association de ces mesures et du dépistage systématique de la maladie chez les bovins entrant dans la chaîne alimentaire a réduit très fortement les risques de contamination humaine.

### **1.2.3 Encéphalopathie spongiforme féline**

Les résultats de transmission expérimentale de l'Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF) et de l'ESB à la souris ont démontré que ces deux maladies étaient causées par le même agent infectieux<sup>81, 191</sup>. Les félidés auraient donc été contaminés en consommant de la viande provenant de bovins atteints d'ESB. Cependant, la possibilité d'une transmission maternelle de l'ESF a été évoquée chez un jaguar (*Acinonyx jubatus*)<sup>39</sup>.

Le tableau clinique de l'ESF est très proche de celui de l'ESB, avec des troubles du comportement, de l'ataxie et une hyperesthésie<sup>609</sup>.

### **1.2.4 Maladie du dépérissement chronique des cervidés**

Initialement décrite aux Etats-Unis dans les états du Colorado et du Wyoming, la maladie du dépérissement chronique des cervidés (*Chronic Wasting Disease – CWD*) est désormais identifiée dans 18 états américains et 2 provinces canadiennes, chez des animaux sauvages ou en captivité<sup>282, 623</sup>. En Europe, un programme de surveillance de cette EST a été mis en place entre 2006 et 2010 mais aucun cas n'a été détecté parmi les 13 000 animaux testés<sup>173</sup>. Les seuls cas détectés hors du continent américain, en Corée du Sud, concernaient des wapitis importés du Canada<sup>296, 529</sup>.

Cliniquement, après une période d'incubation de plusieurs années (au minimum 16 mois), les seuls symptômes véritablement constants sont une émaciation progressive, à l'origine du nom de la maladie, et des modifications comportementales parfois frustes. Du ptyalisme, causé par des troubles de la déglutition, est parfois présent. La mort survient en quelques semaines à quelques mois<sup>602, 603</sup>.

### **1.2.5 Encéphalopathie transmissible du vison**

L'encéphalopathie transmissible du vison (*Transmissible Mink Encephalopathy* – TME) est une maladie rare du vison d'élevage. Suite à des enquêtes épidémiologiques menées dans les premiers élevages atteints, l'hypothèse de la consommation de viande ovine ou bovine contaminée par un agent d'EST a été évoquée pour expliquer l'apparition de la TME<sup>247, 381</sup>. Cependant, les tentatives expérimentales de transmission orale de la tremblante au vison ont échoué<sup>381</sup>. Par ailleurs, des visons inoculés par voie intracérébrale ou orale avec l'agent de l'ESB ont développé une EST différente de la TME sur les plans clinique et histopathologique<sup>488</sup>. Malgré ces résultats, l'intervention d'un agent d'origine bovine ne peut être totalement exclue, comme le suggèrent les similitudes observées entre les propriétés de l'agent de la TME et celles d'un agent d'ESB atypique dans un modèle murin transgénique<sup>27</sup>. La phase asymptomatique de la TME dure au moins 7 mois<sup>93, 247</sup>. Des troubles du comportement (malpropreté, excitabilité, agressivité) sont ensuite observés, suivis par des troubles locomoteurs (incoordination motrice, démarche anormale). Les animaux atteints ont souvent une posture anormale (queue relevée ou rabattue sur le dos) et l'automutilation est fréquente. En phase terminale de la maladie, après 2 à 7 semaines d'évolution, les animaux deviennent somnolents<sup>247</sup>.

## **1.3 Caractéristiques communes aux Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles**

### **1.3.1 Caractéristiques cliniques**

La période d'incubation (ou phase asymptomatique) des EST est généralement longue par rapport à la durée moyenne de vie des espèces atteintes. L'incubation varie de quelques mois à quelques années chez les animaux et de quelques années à quelques décennies chez l'Homme.

La phase clinique, caractérisée par l'apparition de troubles nerveux, évolue de manière subaiguë à chronique (quelques semaines à quelques mois). Les symptômes associent des troubles moteurs (ataxie, tremblements, myoclonies), sensitifs (prurit, douleurs), comportementaux, auxquels s'ajoutent chez l'Homme des troubles cognitifs (démence). L'aggravation progressive des signes cliniques conduit inexorablement à la mort.

## **1.3.2 Caractéristiques lésionnelles**

### **1.3.2.1 Lésions macroscopiques**

Il n'existe aucune lésion macroscopique pathognomonique des EST. Seules des lésions non spécifiques, secondaires à la réduction de la mobilité (amyotrophie), au décubitus (myosite, escarres) ou à des troubles sensitifs (délainement consécutif au prurit lors de tremblante ovine classique) peuvent être observées.

### **1.3.2.2 Lésions microscopiques**

En histologie conventionnelle, les lésions microscopiques sont limitées au système nerveux central. Elles consistent en :

- une vacuolisation neuronale périkaryonique et une vacuolisation neuropilaire, à l'origine du qualificatif de spongieuse <sup>190</sup>
- une perte neuronale dont la répartition et l'intensité sont variables, en fonction de la région cérébrale examinée. L'absence de réaction inflammatoire et d'infiltration lymphocytaire suggère que la mort neuronale est de nature apoptotique.
- une gliose caractérisée par une hypertrophie et une hyperplasie astrocytaires et microgliales. La surexpression des marqueurs liés aux astrocytes (*Glial Fibrillary acidic protein* ou GFAP) et aux cellules microgliales (CD11 et CD68) démontre la forte activation de ces cellules <sup>211</sup>
- des dépôts amyloïdes, biréfringents après coloration au rouge Congo, dans la substance grise. Ces dépôts sont généralement péri-vasculaires et de taille réduite mais peuvent parfois prendre l'allure de grandes plaques intra-parenchymateuses <sup>606</sup>. Des plaques multicentriques sont pathognomoniques du syndrome de GSS <sup>349</sup>, des plaques entourées d'une couronne de vacuoles (« plaques florides ») sont évocatrices de



vMCJ<sup>65</sup> et des plaques arrondies entourées d'épines radiales (« plaques kuru ») sont détectées dans le cortex cérébelleux de 50 à 75 % des malades atteints de kuru <sup>306, 420</sup>.

Ces lésions microscopiques sont détectables en fin de période d'incubation et ne précèdent que de peu l'apparition des premiers signes cliniques.

### 1.3.3 Transmissibilité

Le caractère transmissible des EST a été démontré pour la première fois dans les années 1930 par deux vétérinaires, Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle, qui réussirent à reproduire une tremblante clinique chez deux brebis inoculées par voie intraoculaire avec un broyat de moelle épinière provenant d'ovins naturellement infectés <sup>146</sup>. Dans la suite de leurs travaux, ils découvrirent d'autres voies d'inoculation efficaces (intracérébrale, épidurale, sous-cutanée), confirmèrent le pouvoir infectieux du système nerveux central des animaux en phase clinique de tremblante <sup>147</sup> et réalisèrent la première transmission interspécifique (de l'ovin vers le caprin) <sup>148</sup>.

Ces observations associées aux analogies cliniques et lésionnelles entre la tremblante et le kuru ont suggéré que le kuru pouvait être provoqué par un agent transmissible <sup>238</sup>. Cette hypothèse fut confirmée par la reproduction des symptômes du kuru chez des chimpanzés inoculés par voie intracérébrale avec des extraits de cerveaux d'humains morts de cette maladie <sup>198</sup>. Dès lors, la tremblante et le kuru ont été classés dans un nouveau groupe de maladies neurodégénératives transmissibles, les EST, dont l'agent causal était inconnu.

Dans les années 1960, la transmission hétérospécifique de la tremblante du mouton à la souris<sup>119</sup>, au rat <sup>120</sup> et au hamster <sup>622</sup> constitua une étape importante dans l'étude des EST. L'utilisation de rongeurs de laboratoire permit de s'affranchir partiellement des contraintes inhérentes à l'entretien de grandes espèces animales, notamment en réduisant les coûts d'expérimentation. Toutefois, ces modèles montrèrent rapidement leurs limites puisque certains isolats d'EST, infectieux lors de transmission homospécifique, sont très difficiles voire impossibles à transmettre aux rongeurs <sup>299</sup>.

Par ailleurs, la transmissibilité de certaines EST, déjà démontrée en conditions expérimentales, a pu être constatée lors de contaminations iatrogènes :

- dans les années 1930, au Royaume-Uni, la tremblante a été transmise à 1500 ovins suite à l'utilisation d'un lot de vaccins contre le *louping ill* (flavivirus neurotrope), préparés à partir de tissus ovins contaminés <sup>225</sup>
- un épisode similaire a eu lieu en Italie dans les années 1990, suite à l'utilisation de vaccins contre *Mycoplasma agalactiae* (bactérie responsable de mammite, d'arthrite et de kératite) chez des ovins et des caprins <sup>2, 108</sup>
- dès les années 1970, des cas de transmission de la MCJ lors d'actes médicaux et chirurgicaux ont été rapportés (cf. 1.1.3.3)
- l'agent de la vMCJ a été transmis lors de transfusion de sang provenant d'individus en incubation de la maladie (cf. 1.1.3.2)

## **1.4 Etiologie**

### **1.4.1 Un agent de petite taille**

Dans les années 1960, des expériences d'irradiation avait permis d'estimer la taille de l'agent de la tremblante à environ 7 nm et son poids moléculaire à 150 kDa <sup>6, 8</sup>. Cette estimation initiale a été ultérieurement affinée. Lors d'expériences de sédimentation en gradient de sucrose, réalisées à partir d'homogénats de cerveaux de hamster inoculés avec un isolat de MCJ, le coefficient de sédimentation des fractions les plus infectieuses était de 120S <sup>5</sup>. Le diamètre de l'agent infectieux contenu dans ces fractions 120S a été estimé à 25-30 nm par une technique de fractionnement (couplage flux-force de sédimentation) et son poids moléculaire, évalué en chromatographie en phase liquide à haute performance, était compris entre 1000 et 10000 <sup>526</sup>.

### **1.4.2 Un agent non immunogène**

La transmission des EST par inoculation prouve que ce sont des maladies infectieuses. Cependant, aucune réaction immunitaire humorale spécifique n'est détectée chez les individus atteints d'EST, ce qui suggère que le système immunitaire de l'hôte tolère l'agent pathogène, autrement dit, que celui-ci n'est pas immunogène <sup>466</sup>.

### 1.4.3 Un agent transmissible non conventionnel

Les études physico-chimiques visant à déterminer de manière indirecte la nature des agents responsables des EST ont mis en évidence leur exceptionnelle résistance aux procédés de décontamination classiques, ce qui leur a valu la dénomination d'« agents transmissibles non conventionnels » (ATNC).

#### 1.4.3.1 Résistance aux procédés physiques de décontamination

Les ATNC sont résistants aux rayonnements ultra-violet, y compris à des longueurs d'onde altérant les acides nucléiques (254 nm) <sup>6, 7</sup>. Les rayonnements  $\gamma$  à 100-200 kGy peuvent réduire les titres infectieux de tissus contaminés par l'agent de la tremblante, du kuru ou de la MCJ <sup>210</sup>. En revanche, les radiations micro-ondes, les rayons X et les ultrasons sont sans effet <sup>334</sup>.

Les ATNC sont particulièrement thermostables. L'efficacité des traitements thermiques (chaleur sèche, autoclavage) de décontamination varie en fonction :

- de la nature du prélèvement à décontaminer. A traitement identique, le tissu cérébral intact est plus difficile à décontaminer qu'un homogénat de cerveau <sup>555</sup>
- de l'état d'hydratation du prélèvement. La déshydratation augmente la thermostabilité des ATNC <sup>18, 19</sup>. La dessiccation de tissus macérés (homogénats) provenant d'animaux atteints de tremblante sur une surface en verre ou en métal (*smear*) rend la décontamination plus difficile. Ainsi, alors qu'un autoclavage à 134°C pendant 18 minutes suffit à décontaminer 340 mg d'un pool de cerveaux de hamsters infectés par la souche de tremblante 263K, la même masse de cerveau préalablement macérée conserve un pouvoir infectieux après un traitement à 134°C pendant 1 h <sup>551</sup>
- de la souche de prion considérée (*cf.* 2.4.1)
- de la combinaison des paramètres de température et de temps utilisée. Un autoclavage à 136°C pendant 4 ou 9 minutes a permis de décontaminer 50 mg de cerveau de souris infectées par la souche 22A alors que, de manière paradoxale, des échantillons soumis à 138°C pendant 9 minutes sont restés infectieux <sup>301, 553</sup>. Pour la souche 301V, 60 % des souris inoculées avec des extraits de cerveaux autoclavés à 134°C ont déclaré la

maladie, alors que ce pourcentage s'élevait à 72 % pour des inocula préalablement chauffés à 138°C<sup>553</sup>.

#### 1.4.3.2 Résistance aux procédés chimiques de décontamination

Les ATNC sont peu sensibles à l'action des solvants organiques, des agents alkylants, des agents chaotropes et des agents oxydants. Par ailleurs, le formol renforce même leur résistance à l'autoclavage<sup>73, 546</sup>.

Les solutions d'acides et de bases dont le pH est compris entre 2 et 10 ont peu d'effet sur les ATNC<sup>414</sup>.

Parmi les acides, seul l'acide formique, qui a la propriété de solubiliser les protéines, permet de réduire de manière significative les titres infectieux de tissus fixés au formol<sup>73, 548, 549</sup>.

Par ailleurs, l'exposition d'homogénats de cerveaux bovins ou murins, infectés respectivement par l'ESB ou les souches de tremblante ME7 et 263K, à de la soude 1M ou 2M pendant 2 heures a permis de réduire fortement leur pouvoir infectieux sans toutefois le faire disparaître<sup>547</sup>. L'efficacité de la soude peut cependant être améliorée en l'associant à un traitement thermique, de manière séquentielle ou simultanée. Ainsi, les souches thermorésistantes 263K et 22A peuvent être complètement inactivées par autoclavage, respectivement à 121°C pendant 90 minutes en soude molaire, et à 121°C pendant 30 minutes en soude 2M<sup>550, 553</sup>.

Les détergents ont une action limitée sur les ATNC. Cependant, le dodécylsulfate de sodium (SDS) dilué à 3 ou 5 %, couplé à un traitement thermique (autoclavage ou ébullition) permet de réduire le titre infectieux des tissus contaminés<sup>301, 545, 552, 613</sup>.

L'hypochlorite de sodium sous forme de solution aqueuse a la capacité d'inactiver totalement les souches de tremblante 263K<sup>72, 613</sup>, 22A et 139A<sup>301</sup> ainsi que l'ESB<sup>547</sup>, sous réserve que la quantité de chlore libre disponible soit suffisante. Pour obtenir une efficacité optimale, il est recommandé d'effectuer un traitement d'une heure avec des solutions contenant au minimum 20000 ppm de chlore libre<sup>301</sup>.

Parmi les procédés enzymatiques de décontamination, seule l'action prolongée de protéases à large spectre, telles que la protéinase K (PK) ou la pronase permet de réduire significativement les titres infectieux<sup>399, 471</sup>. En revanche, les nucléases n'ont aucun effet sur l'infectiosité<sup>453, 470, 471</sup>.

#### 1.4.4 Un agent protéique ?

Les caractéristiques physico-chimiques singulières des ATNC (extrême résistance à la chaleur et aux autres procédés modifiant les acides nucléiques, sensibilité à l'action des protéases, petite taille) ont rapidement suggéré qu'ils pouvaient être de nature protéique<sup>233, 455</sup>. L'identification de polypeptides associés à l'infectiosité dans le système nerveux central d'individus atteints d'EST apporta du crédit à cette hypothèse.

##### 1.4.4.1 Les Scrapie-Associated Fibrils

La microscopie électronique à contraste négatif a permis d'identifier des agrégats fibrillaires, ou *Scrapie-Associated Fibrils* (SAF), de 10-20 nm de diamètre et de 100 à 200 nm de long, à partir de la fraction synaptosomale-mitochondriale de cerveaux de souris et de hamsters infectés par la tremblante, après digestion par la PK en milieu détergent<sup>391</sup>. Des SAF ont aussi été détectées chez des brebis naturellement atteintes de tremblante, des élans atteints de CWD et des humains atteints de MCJ, de kuru ou du syndrome de GSS<sup>392, 393, 395, 492</sup>. En revanche, elles sont systématiquement absentes des tissus nerveux sains<sup>394</sup>.

Les SAF sont associées à l'infectiosité, comme l'ont démontré les purifications des fractions infectieuses à partir de cerveaux de hamster et de souris inoculés avec les souches de tremblante 263K et ME7<sup>167, 473</sup>, et leur principal constituant est un polypeptide de 27-30 kDa<sup>57, 167, 387, 473</sup>.

La production d'anticorps dirigés contre ce polypeptide a révélé qu'il dérive d'une protéine de 33-35 kDa, détectable par western blot, à la fois chez les individus sains et chez les individus infectés<sup>432</sup>. Cette protéine est codée par un gène cellulaire et existe sous deux isoformes dont les propriétés biochimiques sont différentes. En effet, elle est partiellement résistante à la PK dans les tissus infectieux, où elle est dégradée en polypeptide de 27-30 kDa, alors qu'elle y est sensible dans les tissus sains<sup>35, 432</sup>.

A la suite de ces découvertes, la nomenclature suivante a été établie:

- la protéine de 33-35 kDa est dénommée PrP pour *Protease resistant Protein*
- le gène cellulaire codant la PrP est dénommé *PRNP*
- l'isoforme normale de la PrP, sensible à la PK, est appelée PrP cellulaire (PrP<sup>c</sup>)
- l'isoforme anormale de la PrP est appelée PrP *Scrapie* (PrP<sup>Sc</sup>) et la PrP de 27-30 kDa obtenue après digestion par la PK est dénommée PrP<sup>27-30</sup> ou PrP<sup>res</sup>

#### 1.4.4.2 Le gène *PRNP*

##### Localisation et structure

Un gène *PRNP* a été identifié chez toutes les espèces de mammifères étudiées ainsi que chez certaines espèces d'oiseaux<sup>196, 607</sup>, de reptiles<sup>523</sup> et d'amphibiens<sup>540</sup>. Chez les Téléostéens, plusieurs gènes paralogues de *PRNP* ont été décrits. Deux gènes codant respectivement les protéines PrP1 et PrP2 ont ainsi été décrits chez le poisson zèbre (*Danio rerio*)<sup>487</sup>.

Le gène *PRNP* est situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'Homme<sup>35</sup>, sur le chromosome 13 chez les ruminants domestiques et sur le chromosome 2 chez la souris. Il possède un nombre variable d'exons selon l'espèce considérée : 1 seul chez les primates non-humains, le lapin et les oiseaux, 2 chez l'Homme et le hamster, 3 chez la souris, le rat, les bovins et les petits ruminants. Toutefois, la totalité du cadre ouvert de lecture (*Open Reading Frame* – ORF), composé de 759 à 792 nucléotides, est toujours comprise dans le dernier exon<sup>475</sup>. Cet exon est constitué d'environ 2000 nucléotides, excepté chez le mouton (4000 nucléotides), en raison d'une région non traduite, plus longue en 3'.

##### Régulation

Le promoteur du gène *PRNP* est dépourvu de boîte TATA mais contient des îlots CpG et plusieurs sites de fixation du facteur de transcription Sp1<sup>35, 366, 475, 496, 497, 590</sup>. Bien que ces caractéristiques rappellent celles des gènes domestiques, il semble pourtant que l'expression de la PrP<sup>c</sup> soit régulée. En effet, l'activité du promoteur est dépendante de la conformation de la chromatine<sup>100</sup> et d'autres sites spécifiques de facteurs de transcription, tels que AP-1, AP-2,

MyoD et NF-IL6, ont été identifiés au sein de la région flanquante 5' du gène *PRNP* ou dans son premier intron <sup>366, 496, 590</sup>.

Par ailleurs, chez les ovins, la détection de deux types d'ARNm (2.1 et 4.6 kb) produits par polyadénylation alternative et présents en quantités différentes dans le névraxe et la rate, suggère une régulation post-transcriptionnelle tissu-spécifique de l'expression de *PRNP* <sup>219</sup>.

### **Polymorphisme et sensibilité génétique aux EST**

La séquence du gène *PRNP* est très conservée au sein des différentes espèces ce qui suggère un rôle physiologique important de la PrP. Dans certaines espèces, des polymorphismes de ce gène, associés à la sensibilité/résistance aux EST, ont été découverts.

*Chez les ovins*, 26 polymorphismes majeurs du gène *PRNP* ont été décrits. Les polymorphismes des codons 136 (A/V), 154 (R/H) et 171 (R/Q/H) sont des déterminants majeurs de la résistance/sensibilité génétique aux EST <sup>38, 55, 61, 128, 158, 177, 218, 220, 221, 237, 251, 269, 328, 429, 513, 564, 569</sup>. Des études cas-témoins ont ainsi montré que l'allèle ARR était associé à une forte résistance à la tremblante classique <sup>177, 269, 270, 564, 569</sup>. Les animaux ARR/ARR ne développent pas de signes cliniques et l'incidence de la maladie chez les animaux hétérozygotes ARR est très faible. De même, les animaux porteurs de l'allèle AHQ ne sont que rarement atteints. A l'inverse, les allèles VRQ et ARQ confèrent une forte sensibilité à la maladie <sup>177, 269, 270, 564, 569</sup>.

*Chez l'Homme*, des mutations ponctuelles sont associées aux EST familiales dont les plus fréquentes sont :

- la mutation E200K pour la MCJ familiale <sup>74, 215, 217, 264, 406</sup>
- la mutation D178N associée à la présence en cis d'une méthionine en position 129 (D178N – 129M) pour l'IFF <sup>216, 406</sup>
- la mutation P102L – 129M pour le syndrome de GSS <sup>263, 349</sup> (la mutation P105L – 129V est également fréquente au Japon) <sup>349</sup>

En outre, le polymorphisme au codon 129 (M/V) influe sur la sensibilité aux MCJ sporadique, iatrogène et au v-MCJ.

Ainsi, dans la population générale 51 % des individus sont hétérozygotes M/V, 37 % sont homozygotes M/M et 12 % sont homozygotes V/V<sup>445</sup> alors que les patients atteints de MCJ sporadique sont à plus de 80 % homozygotes M/M ou V/V<sup>64, 445</sup>. Des résultats comparables sont observés parmi les cas français de MCJ iatrogène contaminés par l'injection d'hormone de croissance<sup>64, 159</sup>.

L'homozygotie M/M est également un facteur de risque majeur du v-MCJ. Parmi les 228 cas recensés dans le monde, à l'exception de deux individus hétérozygotes M/V contaminés par voie sanguine, tous étaient homozygotes M/M<sup>457, 458</sup>. Toutefois au Royaume-Uni, une suspicion de v-MCJ a été établie chez un homme hétérozygote M/V sur la base de l'âge d'apparition de la maladie (30 ans), du tableau clinique et des résultats d'EEG et d'IRM. Toutefois, comme aucun examen histopathologique n'a été réalisé à la mort de ce patient, le diagnostic n'a pu être confirmé<sup>66, 288</sup>.

***Chez les cervidés*** sensibles au CWD, plusieurs polymorphismes ont été décrits:

- un polymorphisme au codon 225 (S/F) chez le cerf mulot. Les animaux hétérozygotes S/F et homozygotes F/F représentent 9.3 % de la population générale, mais seulement 0.3 % des individus atteints. En outre, l'incidence de la maladie est 30 fois plus élevée chez les animaux homozygotes S/S que chez les hétérozygotes S/F<sup>278</sup>.
- trois polymorphismes aux codons 95 (Q/H), 96 (G/S) et 116 (A/G) chez le cerf à queue blanche<sup>251, 279, 481</sup>. Dans cette espèce, les animaux porteurs de l'allèle QGA semblent moins fréquemment atteints que les porteurs de l'allèle QSA<sup>279, 430</sup>.
- un polymorphisme au codon 132 (M/L) chez le wapiti des montagnes rocheuses<sup>427, 502</sup>. Des études épidémiologiques et expérimentales (transmission par voie orale) suggèrent que l'allèle L pourrait avoir un effet protecteur contre le CWD<sup>242, 428, 431</sup>.
- quatre polymorphismes aux codons 2 (V/M), 129 (G/S), 138 (S/N) et 169 (V/M) chez le renne. Bien qu'aucun cas naturel de CWD n'ait été décrit dans cette espèce, les résultats d'essais de transmission par voie orale suggèrent que l'hétérozygotie au codon 138 pourrait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de cette maladie<sup>401</sup>.



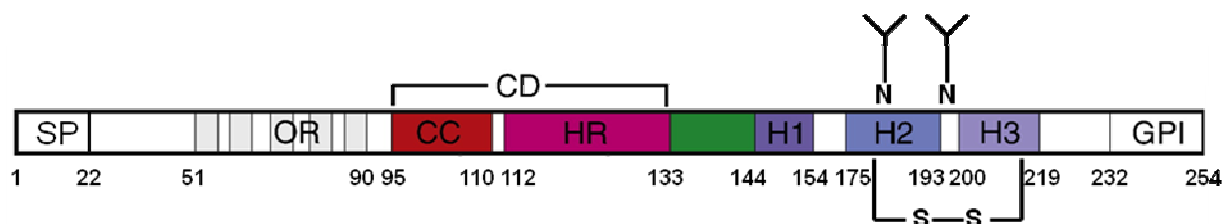
### 1.4.4.3 La PrP<sup>c</sup>

#### Structure

La PrP<sup>c</sup> native est composée de 253 acides aminés chez l'Homme, 256 chez le mouton, 264 chez la vache et 254 chez la souris<sup>486, 617</sup>. Dans la suite de ce paragraphe, nous adopterons la numérotation correspondant à la PrP<sup>c</sup> murine.

La PrP<sup>c</sup> est une sialoglycoprotéine dont la structure comporte cinq régions distinctes (figure 1) :

- un peptide signal de 22 acides aminés qui permet la translocation de la PrP<sup>c</sup> dans le réticulum endoplasmique et qui est clivé au cours de la maturation post-traductionnelle de la protéine
- une extrémité N-terminale (23-94) qui contient quatre à six (chez les bovins) répétitions d'une séquence octapeptidique, riche en proline et en glycine (PHGGGWGQ) et dont les résidus histidine peuvent fixer des ions Cu<sup>2+</sup> avec une forte affinité<sup>94, 593</sup>
- un domaine central (95-134) constitué d'un *cluster* chargé positivement (95-110) et d'un cœur hydrophobe (111-134). Les acides aminés 103 à 111 forment une séquence d'arrêt de transfert (*Stop Transfer Effector*) qui intervient dans la translocation de la PrP<sup>c</sup> dans le réticulum endoplasmique<sup>153, 615</sup>
- la région 135-231 au sein de laquelle se situent deux sites de glycosylation sur des résidus asparagine (180 et 196)<sup>243</sup>, à l'origine des trois glycoformes de la PrP<sup>c</sup> (a-, mono- et bi-glycosylée), et un pont disulfure reliant deux résidus cystéine (178 et 214)<sup>53</sup>
- une séquence C-terminale hydrophobe (acides aminés 232-254), clivée et remplacée par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) qui vient se greffer sur le résidu sérine en position 231 lors de la maturation protéique<sup>536</sup>. Cette ancre GPI permet la fixation de la PrP<sup>c</sup> aux microdomaines lipidiques riches en sphingolipides et en cholestérol (*rafts*) de la membrane plasmique, tout en lui assurant la mobilité au sein de la bicouche lipidique<sup>418</sup>.

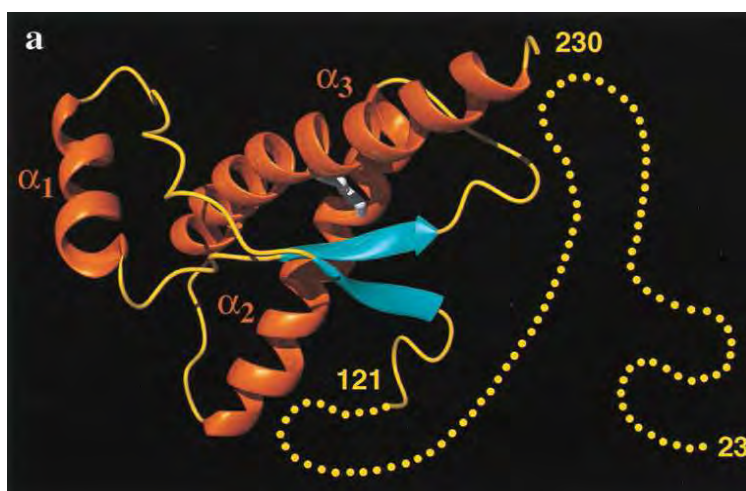


**Figure 1 :** Structure de la PrP<sup>c</sup> murine (adapté de [421])

SP : peptide signal ; OR : *octarepeat* ; CD : domaine central ; CC : *charge cluster* ; HR : *hydrophobic core* ; H : hélice ; GPI : ancre glycosyl-phosphatidylinositol

La structure spatiale de la PrP<sup>c</sup> naturelle est mal connue car les quantités de protéine tissulaire extraites par les techniques actuelles de purification sont généralement insuffisantes pour réaliser des analyses biophysiques structurales (Résonance magnétique nucléaire, cristallographie)<sup>425</sup>. La plupart des données concernant les structures secondaire et tertiaire de la PrP<sup>c</sup> ont donc été obtenues avec des protéines recombinantes, non glycosylées et dénuées d'ancres GPI, produites par des bactéries<sup>104, 169, 227, 360, 362, 485, 617</sup>. Toutefois, la structure tridimensionnelle et la stabilité thermique de la PrP recombinante bovine, déterminées par RMN et dichroïsme circulaire, sont similaires à celles de la PrP<sup>c</sup> naturelle<sup>262</sup>.

D'après ces études *in vitro*, l'architecture générale de la PrP<sup>c</sup> est semblable chez tous les mammifères (figure 2). Le cœur globulaire de la protéine est organisé en trois hélices  $\alpha$  (H1 : 144-154, H2 : 175-193 et H3 : 200-219), dont deux sont reliées par un pont disulfure, associées à deux feuillets  $\beta$  antiparallèles (128-131 et 161-164)<sup>53, 360, 485, 486, 617</sup>. La région N-terminale (23-120) n'a pas de conformation bien définie, du fait de sa flexibilité (figure 2)<sup>169</sup>. Par ailleurs, la fixation d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  dans la région des OR pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la structure de la protéine<sup>402</sup>.



**Figure 2** : structure tridimensionnelle de la PrP<sup>c</sup> humaine obtenue par RMN  
(d'après [617])

### Biosynthèse et cycle intracellulaire

Après la synthèse nucléaire, la protéine codée par le gène *PRNP* subit plusieurs modifications post-traductionnelles dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) rugueux : clivage du peptide signal et de l'extrémité C-terminale hydrophobe, ajout de l'ancre GPI, glycosylation et formation du pont disulfure. Elle transite ensuite par l'appareil de Golgi, où les chaînes oligosaccharidiques sont modifiées<sup>246</sup>, avant d'être exportée vers la membrane plasmique, où elle se fixe aux *rafts* grâce à son ancre GPI<sup>226, 418</sup>.

Bien que la PrP<sup>c</sup> mature soit localisée majoritairement à la surface de la cellule, trois formes intracellulaires de la protéine ont également été décrites. Parmi ces formes minoritaires, deux (<sup>Ntm</sup>PrP et <sup>Ctm</sup>PrP) sont fixées au RE grâce à leur cœur hydrophobe transmembranaire et sont orientées dans deux sens opposés : l'extrémité N-terminale de la <sup>Ntm</sup>PrP est située dans la lumière réticulaire alors qu'il s'agit de l'extrémité C-terminale pour la <sup>Ctm</sup>PrP<sup>252, 539</sup>. Les mécanismes moléculaires régulant la synthèse de <sup>Ntm</sup>PrP et <sup>Ctm</sup>PrP sont complexes et font intervenir à la fois la séquence signal<sup>436</sup>, la séquence d'arrêt de transfert, qui stoppe la translocation de la protéine dans la lumière réticulaire<sup>153, 615</sup> et les domaines hydrophobes transmembranaire et C-terminal<sup>259</sup>.

La troisième forme intracellulaire de la PrP est cytosolique ( $^{Cy}PrP$ ). Cette localisation pourrait provenir de la rétro-translocation (du RE vers le cytosol) d'une faible quantité de PrP mal repliée, pour permettre sa dégradation par le protéasome <sup>363</sup>. Cependant, même si l'inhibition du protéasome provoque effectivement l'accumulation de PrP dans le cytosol, une partie de cette  $^{Cy}PrP$  est porteuse d'un peptide signal, suggérant la possibilité d'une voie alternative de transfert de la PrP, indépendante du RE <sup>171</sup>.

La  $PrP^c$  membranaire subit régulièrement des cycles d'endocytose/recyclage. La durée de ces cycles a été estimée à 60 minutes en culture de cellules N2a (neuroblastome) transfectées avec de la  $PrP^c$  aviaire <sup>246</sup> mais elle semble être bien plus courte (< 10 min) dans des cultures primaires de neurones exprimant une  $PrP^c$  endogène <sup>542</sup>.

L'endocytose de la  $PrP^c$  peut être induite par la présence d'ions  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. La  $PrP^c$  interviendrait ainsi dans le maintien de l'homéostasie cuprique <sup>339, 456</sup>.

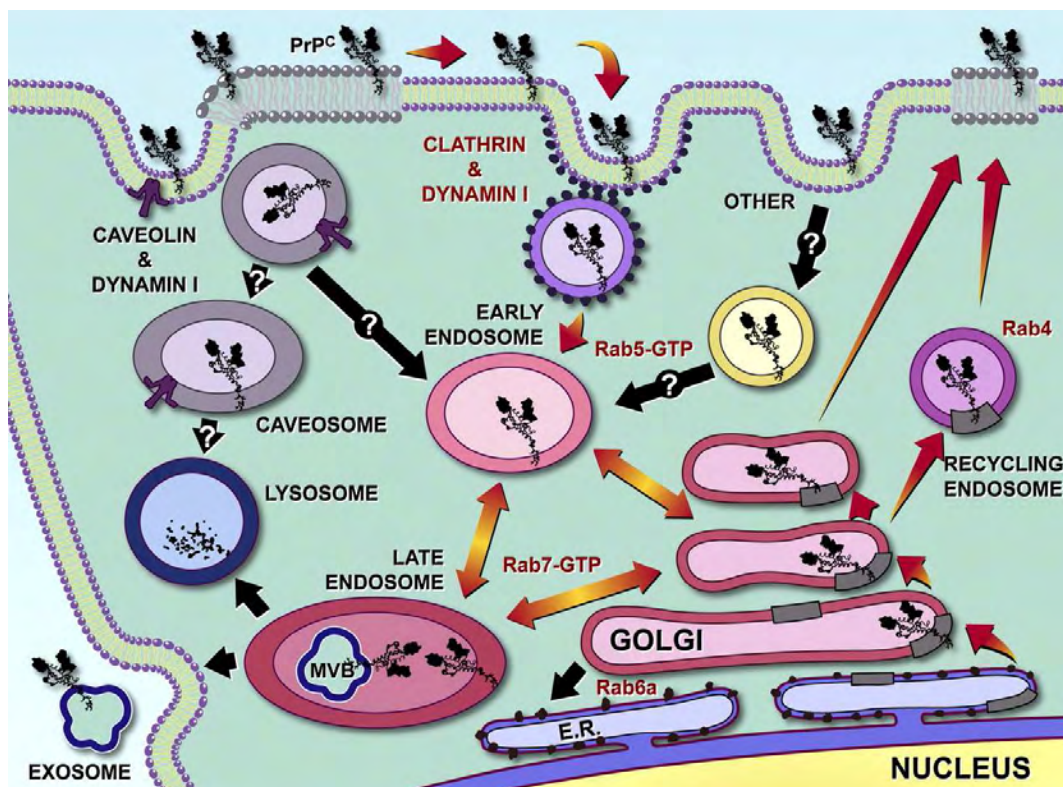


Figure 3 : Cycle intracellulaire de la  $PrP^c$  (d'après [352])

Suite à son internalisation, la PrP<sup>c</sup> est colocalisée avec des marqueurs endosomaux tels que le récepteur à la transferrine, FM4-64 ou Rab5<sup>365, 542</sup>, indiquant sa présence dans des vésicules recouvertes de clathrine. L'endocytose de la PrP<sup>c</sup> par la voie dépendante de la clathrine peut paraître surprenante car, comme toutes les protéines dotées d'une ancre GPI, elle ne possède pas de domaine cytoplasmique lui permettant d'interagir directement avec la clathrine ou avec des protéines adaptatrices<sup>246</sup>. Par ailleurs, la région N-terminale de la PrP<sup>c</sup> semble jouer un rôle clé dans ce phénomène : sa délétion empêche l'endocytose, alors que son insertion sur Thy-1, une autre protéine à ancre GPI, est suffisante pour provoquer son internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine<sup>542</sup>. La PrP<sup>c</sup> interagirait donc, *via* son extrémité N-terminale, avec une protéine transmembranaire portant un signal de localisation lui permettant d'être endocytée par la voie dépendante de la clathrine<sup>245</sup>. Cette protéine pourrait être le récepteur à la laminine<sup>202</sup> ou le récepteur des LDL LRP1<sup>556</sup>. En outre, de manière alternative, la PrP<sup>c</sup> pourrait aussi être endocytée par la voie cavéoline-dépendante, ou par la voie dépendante des *rafts*<sup>285, 574</sup>.

La plupart des molécules de PrP<sup>c</sup> endocytées est directement recyclée à la surface cellulaire mais un faible pourcentage (1-5 %) subit un clivage avant d'être exporté vers la membrane plasmique<sup>244</sup>. Enfin, une fraction de la PrP<sup>c</sup> internalisée est transportée jusque dans des lysosomes où elle est dégradée<sup>105</sup>.

### **Distribution tissulaire**

La PrP<sup>c</sup> est exprimée dans de très nombreux tissus : névraxe, appareil digestif, foie, cœur, muscles squelettiques, poumon, rate, nœuds lymphatiques, reins, tissu mammaire, ovaires, testicules, sang<sup>352</sup>. Les niveaux de PrP<sup>c</sup> les plus élevés sont retrouvés dans le système nerveux central (SNC). Chez les ovins, les quantités de PrP<sup>c</sup> dans l'encéphale sont ainsi 20 à 16000 fois plus élevées que dans les autres organes<sup>411</sup>.

Au sein de l'encéphale, la PrP<sup>c</sup> est exprimée par les neurones et, dans une moindre mesure, par les cellules gliales<sup>325, 410</sup>. La quantité de PrP<sup>c</sup> varie aussi en fonction de la zone et des populations neuronales considérées<sup>21, 186</sup>.

Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ expriment la PrP<sup>c</sup>. Alors que l'expression de la PrP<sup>c</sup> est maintenue tout au long de la différenciation des monocytes et des lymphocytes, elle semble réprimée au fur et à mesure de la différenciation des lignées granulocytaires<sup>168</sup>.

Parmi les cellules sanguines matures, la PrP<sup>c</sup> a été détectée à la surface des lymphocytes B et T, des monocytes, des cellules *Natural Killer* (NK) et des plaquettes<sup>14, 26, 95, 346, 353, 464</sup>. En outre, les cellules dendritiques et les cellules dendritiques folliculaires expriment très fortement la protéine<sup>70, 95, 346, 364, 386</sup>.

## Fonctions

Malgré une expression quasi-ubiquiste, les fonctions de la PrP<sup>c</sup> ne sont pas connues avec précision. Toutefois, des études *in vivo* utilisant des animaux transgéniques dépourvus de PrP<sup>c</sup>, couplées à des expérimentations *in vitro*, visant principalement à identifier les molécules capables d'interagir avec cette protéine, ont permis d'émettre plusieurs hypothèses.

### *Phénotype des animaux dénués de PrP<sup>c</sup>*

Chez la souris, l'inactivation du gène *Prnp* par délétion ou interruption (recombinaison homologue à partir de cellules souches embryonnaires) a conduit à la création de plusieurs lignées avec des phénotypes différents.

Lorsque les modifications génomiques sont limitées au cadre ouvert de lecture du gène *Prnp*, les animaux (souris *Prnp*<sup>0/0</sup> [Zürich I] ou *Prnp*<sup>-/-</sup> [Edinburgh]) se développent et se reproduisent normalement<sup>90, 373</sup>. Aucune pathologie nerveuse n'est observée, même si une démyélinisation des nerfs périphériques peut être mise en évidence chez certains individus âgés<sup>423</sup>. Toutefois, des études comportementales ont démontré que, comparées à des souris de type sauvage, ces souris *Prnp*<sup>0/0</sup> et *Prnp*<sup>-/-</sup> sont atteintes de troubles du rythme circadien<sup>566</sup>, du sommeil<sup>567</sup> et de l'apprentissage spatial<sup>143</sup>. En revanche, les lignées *Prnp*<sup>-/-</sup> [Nagasaki], [Zürich II] et Rcm0<sup>289, 408, 489, 500, 517</sup>, chez lesquelles l'ORF du gène *Prnp* ainsi que ses séquences flanquantes sont délétés, développent spontanément une ataxie accompagnée d'une perte massive des cellules de Purkinje (cervelet). Ce phénotype apparaît tardivement et peut être aboli en induisant l'expression de PrP<sup>c</sup><sup>423, 611</sup>.

La discordance phénotypique observée entre les différentes lignées de souris *Prnp* knock-out a été expliquée par la découverte du gène *Prnd*, situé 16 kb en aval du gène *Prnp*, avec lequel il

partage environ 25 % d'homologie<sup>408, 489</sup>. *Prnd* code une protéine nommée *Doppel* (Dpl) qui est exprimée en très faible quantité dans le système nerveux central des souris de type sauvage et des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> [Zürich I] et *Prnp*<sup>-/-</sup> [Edinburgh]<sup>408</sup>. A l'opposé, dans les lignées *Prnp*<sup>-/-</sup> [Nagasaki], [Zürich II] et Rcm0, la délétion des séquences flanquantes du gène *Prnp* place *Prnd* sous le contrôle du promoteur de *Prnp*, entraînant ainsi la surexpression de Dpl dans l'encéphale<sup>344, 408</sup>. Les troubles nerveux observés chez ces animaux seraient donc dus à la présence de Dpl en l'absence de PrP<sup>c</sup> plutôt qu'à l'absence de PrP<sup>c</sup> elle-même.

Par ailleurs, plus récemment, aucune anomalie clinique ou physiologique n'a été détectée chez des bovins et des caprins *PRNP*<sup>-/-</sup><sup>484, 616</sup>.

### ***Fonction cytoprotectrice***

De nombreuses études *in vitro* suggèrent une fonction cytoprotectrice de la PrP<sup>c</sup>, en relation avec une activité anti-apoptotique et/ou anti-oxydante.

Des premières observations ont démontré que les neurones issus de souris *Prnp*<sup>-/-</sup> [Nagasaki] (surexprimant Dpl), étaient plus sensibles à l'apoptose induite par la privation de sérum que les neurones de souris de type sauvage<sup>321</sup> et que la restauration de la PrP<sup>c</sup> abolissait ce phénomène<sup>295</sup>. Le rôle anti-apoptotique de la PrP<sup>c</sup> a été définitivement prouvé, en excluant un rôle possible de Dpl, suite à la reproduction de ces résultats dans des neurones issus de souris *Prnp*<sup>-/-</sup> [Zürich I] (sans Dpl)<sup>424</sup>.

Par ailleurs, la PrP<sup>c</sup> est capable d'inhiber la mort cellulaire induite par la surexpression de la protéine pro-apoptotique Bax dans des neurones primaires humains<sup>63</sup>. Dans ce contexte, la forme cytosolique de la PrP<sup>c</sup> empêcherait le changement de conformation de Bax, nécessaire à son activation<sup>351, 490, 491</sup>. Le mécanisme à l'origine de cette inhibition est mal connu mais semble faire intervenir la troisième hélice  $\alpha$  de la PrP<sup>c</sup><sup>329</sup> et la région des OR<sup>63</sup>; cette dernière possède en effet des caractéristiques communes avec le domaine BH2 des protéines Bcl-2, impliquées dans la régulation de l'apoptose et capables d'interagir avec Bax<sup>1, 614</sup>.

La PrP<sup>c</sup> pourrait également inhiber l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ . Des cellules tumorales mammaires résistantes à l'action cytotoxique du TNF $\alpha$  expriment la PrP<sup>c</sup> à des niveaux 10 fois supérieurs à ceux observés dans les cellules sensibles MCF-7. En outre, le transfert du gène *Prnp* dans des cellules sensibles leur confère un phénotype résistant<sup>161</sup>.

Parallèlement à sa fonction anti-apoptotique, la PrP<sup>c</sup> est impliquée dans les mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif. Comparées à des cellules de type sauvage, les cellules de souris *Prnp*<sup>0/0</sup> ont une sensibilité accrue à l'action des agents oxydants tels que les ions Cu<sup>2+</sup> ou le peroxyde d'hydrogène. Cette sensibilité est associée à une réduction de l'activité superoxyde dismutase (SOD)<sup>67, 68</sup>, glutathion réductase et catalase<sup>592</sup>. La PrP<sup>c</sup> participerait donc à la protection cellulaire soit indirectement, en stimulant l'activité d'enzymes anti-oxydantes, soit de manière directe, en exerçant elle-même une activité anti-oxydante. Une activité SOD-like a été démontrée *in vitro* pour la PrP<sup>c</sup> recombinante de souris et de poulet ainsi que pour la PrP<sup>c</sup> murine immunoprécipitée à partir d'homogénats de cerveaux<sup>69</sup>. Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits avec la PrP<sup>c</sup> recombinante humaine<sup>280</sup> et semblent difficilement transposables *in vivo*<sup>271</sup>.

La PrP<sup>c</sup> pourrait également exercer une activité anti-oxydante en interagissant avec les radicaux libres oxygénés. La PrP<sup>c</sup> jouerait alors le rôle de molécule « suicide » en neutralisant l'activité oxydante des radicaux hydroxyles libérés lors de l'oxydation du cuivre<sup>415</sup>. Ce mécanisme s'accompagnerait du clivage de la PrP<sup>c</sup> dans la région des octapeptides ( $\beta$  clivage)<sup>388, 581</sup>.

Les fonctions anti-apoptotique et anti-oxydante de la PrP<sup>c</sup> pourraient ne pas être exclusives, du fait de l'activation de certaines voies apoptotiques lors de stress oxydatif. Ainsi lors d'exposition prolongée au peroxyde d'hydrogène *in vitro*, la production de radicaux libres et l'activation de la voie caspase 9/caspase 3/PKC $\delta$  étaient significativement plus faibles dans des neurones exprimant la PrP<sup>c</sup> que dans des neurones *Prnp*<sup>-/-</sup><sup>10</sup>. Dans ce cas, l'activité anti-apoptotique de la PrP<sup>c</sup> pouvait donc être expliquée par son activité anti-oxydante seule, ou combinée à une activité inhibitrice de la voie des caspases.

A l'opposé, l'induction d'un stress réticulaire à l'aide de brefeldine A et de tunicamycine a permis de mettre en évidence un possible rôle pro-apoptotique de la PrP<sup>c</sup>. La fonction de la PrP<sup>c</sup> pourrait ainsi être modulée par la nature de l'agression cellulaire<sup>10</sup>.



## ***Transport du cuivre***

Une mosaïque de résultats expérimentaux suggère que la PrP<sup>c</sup> jouerait un rôle de transporteur du cuivre.

La PrP<sup>c</sup> a la capacité de fixer cet élément avec une forte affinité. Quatre ions Cu<sup>2+</sup> peuvent se lier de manière coopérative sur les chaînes latérales des motifs histidine contenus dans les octapeptides<sup>94, 593</sup>. En outre, deux sites supplémentaires de fixation ont été décrits dans le domaine central de la PrP<sup>c</sup> humaine (H<sub>96</sub> et H<sub>111</sub>)<sup>273</sup>.

La présence de cuivre dans le milieu extracellulaire provoque l'endocytose de la PrP<sup>c</sup> *in vitro*<sup>339, 456</sup>. L'utilisation de protéines tronquées a permis de montrer que ce phénomène était dépendant des octapeptides<sup>460</sup>. La capture des ions Cu<sup>2+</sup> par la PrP<sup>c</sup> pourrait donc être responsable de son internalisation.

*In vitro*, les ions Cu<sup>2+</sup> captés par les octapeptides sont réduits sous forme d'ions Cu<sup>+</sup>. L'efficacité de cette réaction est optimale à un pH de 6.5, très proche de celui des endosomes précoces<sup>403</sup>.

En résumé, la PrP<sup>c</sup> capterait des ions Cu<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire et après internalisation, ces ions seraient réduits dans les endosomes précoces. Les ions Cu<sup>+</sup> ainsi produits seraient ensuite transférés dans le cytosol grâce à un transporteur transmembranaire<sup>71</sup> qui pourrait être Ctr1<sup>403</sup>. La PrP<sup>c</sup> serait quant à elle recyclée à la surface de la cellule.

## ***Neurogenèse et différenciation cellulaire***

Lors de l'embryogenèse, la PrP<sup>c</sup> est abondamment exprimée dans le neuroectoderme<sup>372, 398, 570</sup> mais sa répartition n'est pas homogène au sein de l'encéphale en développement. La PrP<sup>c</sup> est absente de la zone ventriculaire, qui contient les cellules progénitrices en phase de mitose, alors qu'elle est fortement exprimée par les neuroblastes post-mitotiques qui migrent vers les couches intermédiaires et marginales<sup>459, 538, 570</sup>. En outre, l'expression de la PrP<sup>c</sup> augmente au fur et à mesure que la différenciation neuronale progresse<sup>341, 459, 538</sup>.

Ce profil spatial et temporel d'expression de la PrP<sup>c</sup> semble être en relation avec son implication dans le processus de différenciation cellulaire. En effet, *in vitro*, l'utilisation de cellules neurales multipotentes provenant de souris sauvages, tga20 (surexprimant le gène *PRNP*) et *Prnp*<sup>-/-</sup>, a permis de démontrer que le niveau de PrP<sup>c</sup> influait sur le taux et la vitesse de différenciation neuronale<sup>538</sup>. De la même façon, la réduction du niveau d'expression de la

PrP<sup>c</sup> endogène dans des cellules souches embryonnaires de type sauvage à l'aide d'ARN interférent, retarde la différenciation cellulaire <sup>459</sup>.

Par ailleurs, l'addition de PrP<sup>c</sup> recombinante dans des cultures de neurones, provenant de fœtus de rat, stimule le développement d'axones et de dendrites et induit la formation de synapses <sup>283</sup>. Ces effets semblent être le résultat de l'interaction entre la PrP<sup>c</sup> et des molécules d'adhésion, telles que la laminine <sup>229, 230</sup>, le précurseur du récepteur de la laminine <sup>202</sup>, ou N-CAM <sup>501</sup>.

### ***Signalisation cellulaire***

Grâce à sa localisation à la surface cellulaire et à son ancrage membranaire au sein des *rafts*, la PrP<sup>c</sup> pourrait intervenir dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. En outre, la PrP<sup>c</sup> interagirait aussi avec des facteurs de signalisation suite à son endocytose.

L'interaction entre la PrP<sup>c</sup> et N-CAM ainsi que l'utilisation d'anticorps dirigés contre la PrP provoquent l'activation de la tyrosine kinase Fyn <sup>412, 501</sup>. Les conséquences de cette activation ont été bien étudiées dans les cellules souches neuroectodermiques murines 1C11, qui peuvent se différencier en neurones sérotoninergiques (1C11<sup>5-HT</sup>) ou noradrénergiques (1C11<sup>NE</sup>). Dans ces modèles cellulaires, l'activation de Fyn conduit à la phosphorylation de ERK1/2 <sup>503</sup> et à l'activation du facteur de transcription CREB, soit par l'intermédiaire de la cascade PI3 kinase / PKC $\delta$  / NADPH oxydase, soit par une voie alternative, indépendante de la NADPH oxydase (uniquement dans les cellules différenciées) <sup>413, 468</sup>. La phosphorylation de CREB entraîne la transcription des gènes précoces Egr-1 et c-fos, impliqués dans la prolifération cellulaire et les mécanismes de plasticité synaptique dont fait partie la potentialisation à long terme (PLT) <sup>468</sup>. Ces résultats sont cohérents avec les troubles de la PLT mis en évidence par électrophysiologie sur des coupes d'hippocampes de souris *Prnp*<sup>-/-</sup> <sup>132</sup>, et avec l'observation de difficultés d'apprentissage spatial, potentiellement imputables à des troubles de la plasticité synaptique, chez ces animaux <sup>143</sup>.

Par ailleurs, d'autres perturbations électrophysiologiques décrites de manière récurrente dans des neurones *Prnp*<sup>-/-</sup>, tels que des troubles de la phase d'hyperpolarisation consécutive au potentiel d'action (AHP) <sup>131, 194, 467</sup>, ont été attribués au rôle probable que joue la PrP<sup>c</sup> dans l'homéostasie calcique. Les perturbations de l'AHP seraient dues essentiellement à la plus faible concentration de calcium libre dans le cytosol des neurones *Prnp*<sup>-/-</sup>. Deux mécanismes

ont été évoqués pour l'expliquer : un dysfonctionnement des canaux calciques voltage-dépendants permettant l'entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule <sup>194</sup> et une augmentation du piégeage du calcium, notamment dans le réticulum endoplasmique <sup>467</sup>.

*In vitro*, l'interaction entre la PrP<sup>c</sup> et STI1 diminue la sensibilité des cellules (explants de rétine ou neurones) à des signaux apoptotiques <sup>123, 618</sup> et/ou stimule la formation de neurites<sup>359</sup>. Ces deux effets sont la conséquence de l'activation de deux voies distinctes de signalisation cellulaire<sup>359</sup>. En effet, le signal neuroprotecteur fait intervenir l'AMP cyclique et la PKA alors que le signal de croissance neuritique nécessite l'endocytose de la PrP<sup>c</sup> et de STI1 et emprunte la voie des MAP kinases (MEK/ERK) <sup>101</sup>.

Un lien entre PrP<sup>c</sup> et voie des caspases a été démontré lors de stress oxydatif (cas-12, 8, 9 et 3) ou réticulaire (cas-9 et 3) avec un effet inhibiteur dans le premier cas et un rôle activateur dans le second (*cf.* fonction cytoprotectrice) <sup>10</sup>. Par ailleurs, la PrP<sup>c</sup> pourrait aussi interagir avec la voie PI3-kinase/Akt pour empêcher l'apoptose lors de stress oxydatif. En effet, l'activité de la PI3-kinase mesurée dans des lignées cellulaires *Prnp*<sup>0/0</sup> est significativement plus faible que celle détectée dans les mêmes lignées transfectées avec le gène *Prnp*. La protection contre le stress oxydatif conférée par cette activité semble dépendante de la région des OR <sup>573</sup>. De manière similaire, la forme phosphorylée de Akt est nettement plus abondante dans des lysats d'encéphales de souris de type sauvage que dans des lysats de souris *Prnp*<sup>0/0</sup>, que ce soit à l'état basal ou après l'induction d'un stress ischémique. Dans ce contexte, le niveau d'activation d'Akt est inversement corrélé à celui de la caspase-3 <sup>583</sup>.

La PrP<sup>c</sup> pourrait intervenir dans certains mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Chez les patients atteints par cette maladie, des plaques constituées de peptides  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ ) de 40-42 acides aminés s'accumulent dans l'encéphale. Les oligomères A $\beta$ <sub>1-42</sub> solubles sont neurotoxiques, interfèrent avec la potentialisation à long terme et provoquent des troubles de la mémoire et de l'apprentissage <sup>24, 213, 336</sup>. Ces oligomères peuvent se fixer avec une forte affinité à la PrP<sup>c</sup> <sup>24, 336</sup> et ne provoquent pas de modification de la PLT dans des coupes d'hippocampe préalablement traitées avec des anticorps anti-PrP ou provenant d'animaux *PRNP*<sup>-/-</sup> <sup>192, 336</sup>, suggérant que la PrP<sup>c</sup> pourrait être l'un des récepteurs membranaires des oligomères A $\beta$  impliqué dans la transmission du signal neurotoxique. Les résultats obtenus *in vivo* sont néanmoins plus mitigés. En effet, alors qu'aucun trouble de la

mémoire n'a été observé chez des souris transgéniques APP<sup>swe</sup>/PSen1 $\Delta$ E9 (modèles de la maladie d'Alzheimer) croisées avec des souris *PRNP*<sup>-/-</sup> <sup>213</sup>, il semble que dans d'autres modèles, le niveau d'expression de la PrP<sup>c</sup> n'influe pas sur l'intensité du déficit cognitif causé par les oligomères A $\beta$  <sup>24, 102</sup>.

A l'inverse, la PrP<sup>c</sup> pourrait également avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer en « piégeant » la  $\beta$ -sécrétase (BACE1), responsable du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) en peptides A $\beta$ , dans l'appareil de Golgi, ce qui limiterait la formation des plaques amyloïdes <sup>234, 451</sup>.

#### 1.4.4.4 La PrP<sup>Sc</sup>

La PrP<sup>Sc</sup> dérive de la PrP<sup>c</sup> par un processus post-traductionnel<sup>60</sup>. PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>Sc</sup> ont une structure primaire identique et aucune modification biochimique ne permet de distinguer la PrP<sup>c</sup> de son isoforme anormale<sup>537</sup>. En revanche, leurs structures secondaires et tertiaires sont clairement différentes.

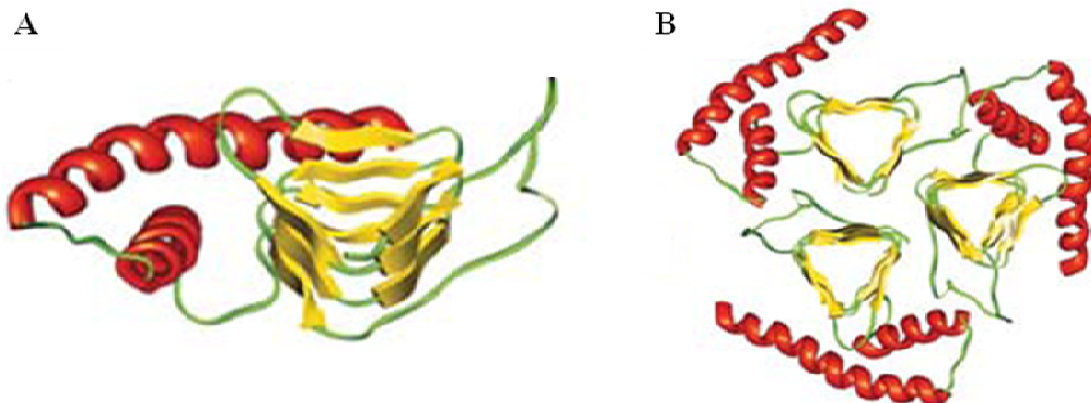
Des mesures en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et par dichroïsme circulaire ont ainsi permis de déterminer que la PrP<sup>c</sup> est composée majoritairement d'hélices  $\alpha$  (42% contre 3 % de feuillets  $\beta$ ) alors que la PrP<sup>Sc</sup> est riche en feuillets  $\beta$  (43 % contre 30 % d'hélices  $\alpha$ )<sup>439</sup>. Ces différences structurales peuvent expliquer que certaines des propriétés physico-chimiques de la PrP<sup>c</sup> et de la PrP<sup>Sc</sup> divergent (tableau 4). L'abondance de feuillets  $\beta$  serait notamment à l'origine de la résistance partielle de la PrP<sup>Sc</sup> à la digestion par la protéinase K, car seuls les acides aminés situés en partie N-terminale seraient facilement accessibles à cette enzyme ; la proportion de feuillets  $\beta$  (54 %) contenue dans le cœur protéique de 27-30 kDa (PrP<sup>27-30</sup>) obtenu après protéolyse est d'ailleurs comparable à celle mesurée dans la PrP<sup>Sc</sup> entière<sup>439</sup>. Par ailleurs, « l'épine dorsale » des SAF serait constituée d'un empilement de feuillets  $\beta$  stabilisé par des liaisons hydrogène<sup>228</sup>. Ces agrégats interfèreraient avec le catabolisme de la PrP puisque *in vitro*, le temps de demi-vie de la PrP<sup>Sc</sup> (>24 h) est nettement supérieur à celui de la PrP<sup>c</sup> (<6 h)<sup>59</sup>.

**Tableau 4 : Propriétés comparées de la PrP<sup>c</sup> et de la PrP<sup>Sc</sup>**

<b>PrP<sup>c</sup></b>	<b>PrP<sup>Sc</sup></b>
<p>Monomérique</p> <p>Soluble</p> <p>Digestion complète par les protéases</p> <p>42% d'hélices <math>\alpha</math> et 3% de feuillets <math>\beta</math></p> <p>Turnover intracellulaire rapide et demi-vie courte</p> <p>Distribution ubiquiste</p>	<p>Forme des agrégats</p> <p>Insoluble (hydrophobe)</p> <p>Digestion partielle par les protéases</p> <p>30% d'hélices <math>\alpha</math> et 45% de feuillets <math>\beta</math></p> <p>Catabolisme lent</p> <p>Dépôts principalement dans le SNC et les organes lymphoïdes</p>

L'insolubilité de la PrP<sup>Sc</sup> ainsi que sa tendance à former des agrégats constituent des obstacles majeurs à l'étude de sa structure tridimensionnelle par cristallographie ou par RMN en phase liquide. En outre, les tentatives de RMN en phase solide ont été limitées du fait de la taille de la PrP et des difficultés à produire de la PrP<sup>Sc</sup> marquée <sup>130</sup>.

Plus récemment, l'étude de cristaux 2D, découverts en microscopie électronique dans des préparations de PrP<sup>27-30</sup>, et de « miniprion » de 106 acides aminés <sup>543, 601</sup>, a fourni des contraintes additionnelles. Un modèle de PrP<sup>Sc</sup>, formé de deux hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  parallèles organisés en hélice lévogyre, capable de s'assembler sous forme de trimères a ainsi été proposé (figure 4) <sup>228</sup>.



**Figure 4 :** Structure tridimensionnelle hypothétique de la PrP<sup>Sc</sup> (d'après [228])

A : La PrP<sup>Sc</sup> serait composée de 2 hélices  $\alpha$  (en rouge) et d'une hélice constituée de feuillets  $\beta$  ( $\beta$ -hélice, en jaune) enroulée à gauche. La structure 3D de la  $\beta$ -hélice représentée ici s'inspire de celle de l'UDP N-acétylglucosamine O-acyltransférase d'*Escherichia coli*.

B : Les monomères de PrP<sup>Sc</sup> seraient capables de s'assembler pour former des trimères grâce aux interactions entre les  $\beta$ -hélices. La structure du trimère modélisé ici est inspirée de celle des trimères d'anhydrase carbonique de *Methanosarcina thermophila*.

#### 1.4.4.5 La théorie de la « protéine seule » (*protein only*)

##### Historique

Dès 1967, Pattison et Jones avaient suggéré que « l'agent de la tremblante pouvait être, ou pouvait être associé à, une petite protéine basique »<sup>455</sup>. La même année, John Stanley Griffith formula une théorie selon laquelle une protéine capable d'autoréplication était responsable de la tremblante<sup>233</sup>. Une quinzaine d'années plus tard, Stanley Prusiner, reprenant en partie les idées de Griffith, proposa le concept de prion (*proteinaceous infectious particle*), protéine infectieuse dont la structure serait très proche de celle d'une protéine cellulaire<sup>472</sup>. La découverte des SAF, de la PrP et du gène *PRNP* vint supporter cette hypothèse.

Selon la théorie de la « protéine seule », la PrP<sup>Sc</sup> serait l'agent infectieux responsable des EST et se propagerait en interagissant avec la PrP<sup>C</sup> de manière à lui faire adopter sa propre conformation. A l'époque où elle a été formulée, cette théorie a bousculé de nombreux paradigmes dans le domaine de l'infectiologie et de la biologie cellulaire. En effet, le concept d'un agent infectieux dépourvu d'acide nucléique, codé par un gène cellulaire et capable de transmettre une information conformationnelle pouvait paraître surprenant. Néanmoins, l'hypothèse prion a rapidement été exploitée pour expliquer des observations réalisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans les années 1960 et 1970, plusieurs équipes avaient découvert chez cet organisme l'existence de deux facteurs cellulaires, nommés [PSI<sup>+</sup>]<sup>142</sup> et [URE3]<sup>322</sup>, associés à l'apparition de phénotypes biochimiques particuliers, transmissibles horizontalement par cytoduction et dont la ségrégation se faisait selon un mode non-mendélien. L'origine et la nature exacte de ces facteurs cytoplasmiques demeurèrent obscures jusqu'en 1994, année où Wickner démontra que [URE3] se comportait comme un prion<sup>594</sup>. Comme l'indiquaient des travaux antérieurs<sup>4</sup>, il confirma que l'expression du gène *URE2*, codant la protéine Ure2, était nécessaire à la propagation de [URE3], prouva que la surexpression de *URE2* augmentait la fréquence d'apparition du phénotype associé à [URE3] d'un facteur 100 et montra qu'à l'inverse, l'emploi de chlorhydrate de guanidine permettait de supprimer ce phénotype de manière réversible. Fort de ces résultats et par analogie avec la théorie de Prusiner, il suggéra donc que [URE3] était la forme prion de Ure2 et que la conversion Ure2→[URE3] s'accompagnait d'une perte de fonction de la protéine pouvant

expliquer le phénotype observé. Par la suite, il fut également démontré que  $[PSI^+]$  était un prion et plusieurs autres prions de levure et de champignons furent découverts (cf. tableau 5).

**Tableau 5 :** Prions décrits chez les levures et les champignons filamenteux (d'après [241])

Protéine cellulaire	Prion correspondant	Organisme	Fonction de la protéine cellulaire	Conséquences
Ure2	[URE3]	<i>S. cerevisiae</i>	Répression de la transcription de gènes intervenant dans le catabolisme azoté	Utilisation non discriminante des sources d'azote
Sup35	[PSI <sup>+</sup> ]	<i>S. cerevisiae</i>	Terminaison de la traduction	Translecture des codons stop, décalage du cadre de lecture, modification de la stabilité des ARNm
Rnq1	[PIN <sup>+</sup> ]	<i>S. cerevisiae</i>	Inconnue	Favorise l'apparition d'autres prions
HET-s	[Het-s]	<i>P. anserina</i>	Incompatibilité des hétérocaryons	Inhibition de la fusion entre les mycéliums [Het-s] et <i>het-S</i>
Swi1	[SWI <sup>+</sup> ]	<i>S. cerevisiae</i>	Régulation de la transcription	Altération de la capacité d'utilisation du carbone
Mca1	[MCA]	<i>S. cerevisiae</i>	Régulation de l'apoptose Progression du cycle cellulaire	Inconnue
Cyc8	[OCT <sup>+</sup> ]	<i>S. cerevisiae</i>	Répression de la transcription	Altération de la capacité d'utilisation du carbone, floculation
Mot3	[MOT3 <sup>+</sup> ]	<i>S. cerevisiae</i>	Régulation de la transcription	Altération de la composition de la paroi cellulaire
Pma1/Std1	[GAR <sup>+</sup> ]	<i>S. cerevisiae</i>	Pompe à proton Pma1	Utilisation non discriminante des sources de carbone

### Une théorie cohérente

Le concept de prion est cohérent avec le fait que les souris  $Prnp^{0/0}$  et  $Prnp^{-/-}$  sont cliniquement résistantes aux EST et sont incapables de propager l'agent infectieux<sup>91, 474, 499, 585</sup>. En outre, le niveau d'expression de la PrP<sup>C</sup> est inversement proportionnel à la durée d'incubation de la maladie<sup>92, 374</sup> et la réintroduction du gène restaure la sensibilité.



Outre le fait qu'elle fournisse une explication aux EST « infectieuses », la théorie de la « protéine seule » est compatible avec la survenue des EST familiales. Les mutations, polymorphismes ou insertions associés à l'apparition de ces maladies modifieraient la structure tertiaire de la PrP<sup>c</sup> ce qui favoriserait sa transconformation spontanée ; le noyau de PrP<sup>Sc</sup> endogène ainsi créé initierait le processus pathologique <sup>129</sup>.

### **Limites et hypothèses alternatives**

Bien que séduisant, le mécanisme théorique aboutissant au développement des EST familiales n'a été que partiellement confirmé *in vivo* avec la création de lignées de souris transgéniques surexprimant une PrP<sup>c</sup> murine porteuse de mutations ou d'insertions homologues à celles rencontrées chez les patients humains atteints du syndrome de GSS (A117V, P102L) <sup>265, 266, 612</sup>, d'IFF (D178N) <sup>170, 274</sup> ou de MCJ familiale (insertion de 9 octapeptides) <sup>124</sup>. Comme attendu, ces animaux ont développé spontanément des troubles nerveux, des lésions similaires à celles des EST naturelles ont été observées dans leur SNC et de faibles quantités de PrP insoluble et partiellement résistante à la PK ont pu être détectées dans leur encéphale. Toutefois, même si l'inoculation intracérébrale d'homogénats de cerveaux préparés à partir de ces souris a permis de reproduire les signes cliniques avec une durée d'incubation réduite chez des animaux porteurs des mêmes mutations, elle n'a pas provoqué de maladie chez des animaux exprimant une PrP sauvage. Ces observations suggèrent donc une accélération du processus neurodégénératif lié aux formes mutées de PrP plutôt que la génération *de novo* d'un véritable prion <sup>419</sup>.

D'autres résultats expérimentaux suggèrent un découplage possible entre le pouvoir infectieux et la présence de PrP<sup>res</sup>.

Lors de transmission interspécifique d'EST, un pouvoir infectieux a été mis en évidence en l'absence de PrP<sup>res</sup> détectable, dans divers modèles <sup>331, 377, 478</sup>. En outre, les quantités détectées de PrP<sup>res</sup> ne sont pas systématiquement corrélées au titre infectieux. A titre d'exemple, des cellules microgliales purifiées à partir de cerveaux de souris inoculées avec un isolat de MCJ possédaient le même pouvoir infectieux que les homogénats de cerveaux de départ, alors qu'elles contenaient 50 fois moins de PrP<sup>res</sup> <sup>22</sup>. De même, le pouvoir infectieux de cellules hypothalamiques immortalisées et infectées *in vitro* par un isolat de MCJ a été multipliée par 650 au cours de passages successifs alors que leur niveau de PrP<sup>res</sup> est resté constant <sup>15</sup>. En

parallèle, des expériences de fractionnement cellulaire ont montré que plus de 75 % de la PrP<sup>Sc</sup> pouvait être retrouvée dans les fractions non infectieuses<sup>526, 528, 541</sup>.

Par ailleurs, bien que les premières tentatives de conversion *in vitro* de PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>, réalisées en mélangeant de la PrP<sup>Sc</sup> de hamster en excès avec de la PrP<sup>c</sup> recombinante de hamster<sup>310</sup>, de souris<sup>284</sup> ou chimérique hamster/souris<sup>255</sup>, aient effectivement permis la production de PrP résistante à la PK, cette dernière était dénuée de pouvoir infectieux.

Ces brèches dans la théorie du tout protéique ont amené certains auteurs à proposer des hypothèses alternatives.

La possibilité d'un « virino », agent infectieux composé d'un petit acide nucléique entouré de protéines et de lipides cellulaires a ainsi été évoquée<sup>165</sup>. Cette hypothèse a le double avantage d'apporter une explication à l'absence de réaction immunitaire, puisque le génome de l'agent est protégé par des protéines de l'hôte, tout en attribuant un rôle structural potentiel à la PrP.

L'hypothèse de l'intervention d'un virus « classique » est également proposée de manière récurrente depuis de nombreuses années sur la base de résultats expérimentaux. Des complexes protéines/acides nucléiques ont été mis en évidence au sein des fractions infectieuses 120S obtenues par sédimentation en gradient de sucrose<sup>376, 525, 527, 528</sup>. En outre, le diamètre (25-30 nm) de l'agent infectieux contenu dans ces fractions est compatible avec celui de particules virales<sup>526</sup> et des images évoquant de telles particules ont été obtenues en microscopie électronique<sup>378</sup>. Par ailleurs, il est possible d'observer des particules « tubulo-vésiculeuses » de 27-35 nm sur des coupes de cerveaux d'individus infectés naturellement ou expérimentalement par des EST ou dans des cultures cellulaires infectées par des souches de tremblante et de MCJ<sup>379</sup>. Ces particules sont visibles dès la période d'incubation<sup>276, 347, 348, 416</sup>, ne sont pas marquées par les anticorps anti-PrP et dans la plupart des modèles animaux, leur nombre est corrélé au titre infectieux<sup>276</sup>. Bien que le rôle de ses particules dans la pathogenèse des EST reste inconnu, certains suggèrent qu'il pourrait s'agir de l'agent viral responsable des EST<sup>378</sup>.

Ces deux hypothèses alternatives, « virino » ou « virus classique », impliquent obligatoirement la présence d'acide nucléique dans les fractions infectieuses. L'affinité de la PrP pour l'ARN a été prouvée<sup>204, 584</sup> et des images de SAF associées à une structure simple brin, réagissant au bromure d'éthidium et sensible aux nucléases ont été décrites<sup>417</sup>. Bien que ces observations ultrastructurales apportent des éléments en faveur de l'hypothèse « virino », les SAF ne sont observées que dans des préparations traitées avec des détergents et il est donc

probable qu'il s'agisse d'artéfacts plutôt que de structures naturelles. En revanche, il a été clairement établi que des préparations de SAF purifiées et traitées aux nucléases peuvent encore contenir de petits acides nucléiques<sup>292, 293</sup>. Cependant, leur dégradation n'entraîne pas de réelle altération du titre infectieux<sup>294, 397</sup>.

Des quantités conséquentes d'acides nucléiques ont également été signalées dans les fractions 120S<sup>5, 525</sup>. Récemment, Manuelidis et *al.* ont identifié, parmi ces acides nucléiques, des petites molécules circulaires d'ADN de 1.8 et 2.4 kb, résistantes aux nucléases dont il est toutefois difficile de déterminer l'origine et le rôle. En effet, ces molécules d'ADN ont également été détectées dans des tissus sains, à des niveaux très faibles<sup>380</sup>.

### **Des preuves définitives ?**

Pendant plus de deux décennies la préséance du concept prion sur la théorie virale a été davantage basée sur l'incapacité des défenseurs de l'hypothèse virale à fournir des éléments forts en faveur de l'implication d'un virus que sur des arguments expérimentaux fondateurs. Toutefois, depuis le début des années 2000, trois éléments majeurs en faveur de la théorie de la protéine seule sont venus bouleverser cette situation.

### ***Obtention de fibrilles amyloïdes infectieuses à partir de PrP recombinante***

Des fibrilles amyloïdes ont été produites par des méthodes physico-chimiques<sup>34</sup> à partir de PrP recombinante murine pure, tronquée en partie N-terminale (rPrP89-231) et correspondant à la PrP<sup>27-30</sup>. Ces fibrilles, lorsqu'elles sont inoculées par voie intracérébrale à des souris transgéniques surexprimant la PrP murine tronquée, entraînent le développement de troubles neurodégénératifs et de lésions compatibles avec une EST. L'inoculation d'homogénats de cerveaux issues de ces souris transgéniques à des souris de type sauvage a permis de propager la maladie<sup>342</sup>.

Plus récemment, l'inoculation intracérébrale de fibrilles amyloïdes obtenues à partir de PrP recombinante de hamster (*full length*) a permis de provoquer une EST, après deux passages itératifs dans cette espèce<sup>369</sup>.

### ***Génération de prions in vitro***

La PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*), une méthode permettant la conversion efficace de PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* a été développée à partir de 2001<sup>495</sup>. Schématiquement, un substrat contenant un large excès de PrP<sup>c</sup> et une faible quantité de PrP<sup>Sc</sup> subit des cycles successifs d'incubation et de sonication en présence de détergents. Au cours de chaque cycle, la quantité de PrP<sup>res</sup> augmente du fait de la transconformation de la PrP<sup>c</sup> et les facteurs d'amplification (plusieurs log<sub>10</sub>) sont tels que le produit final ne contient plus de quantité significative du matériel infectieux initial.

Dans un premier temps, il a été démontré que la PrP<sup>res</sup> néoformée par ce procédé possédait un réel pouvoir infectieux<sup>115</sup>. Par ailleurs, des expériences visant à comprendre la nature des mécanismes de la propagation des prions en PMCA ont permis d'identifier le rôle crucial de composés polyanioniques dans le phénomène de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup><sup>155, 156</sup>.

De manière inattendue, lors de ces travaux, il a été possible de générer un prion par PMCA sans avoir recours à un noyau initial de PrP<sup>Sc</sup>, à partir d'un mélange composé uniquement de PrP<sup>c</sup> tissulaire purifiée, de lipides co-purifiés avec la PrP<sup>c</sup> et de polyanions<sup>156</sup>. Suite à ces résultats, de nombreux doutes ont été émis sur la possible contamination des réactifs (PrP et lipides purifiés) ou des dispositifs expérimentaux (locaux, sonicateur)<sup>32</sup>. Toutefois, une étape décisive pour la validation du concept prion a été franchie en 2010 avec la génération *de novo* de PrP<sup>res</sup> par PMCA à partir de PrP<sup>c</sup> recombinante de souris (PrP 23-230) produite en système bactérien et mise en présence de phospholipides anioniques synthétiques (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol) et de polyanions (ARN)<sup>580</sup>. Cette PrP<sup>res</sup> néoformée s'est révélée infectieuse lors de bioessais sur souris de type sauvage : 100 % des animaux inoculés ont développé une EST.

### ***Génération spontanée de prions in vivo***

Chez le wapiti, contrairement à ce qui est observé chez les autres espèces de mammifères, la boucle  $\beta 2-\alpha 2$  de la PrP<sup>c</sup> est rigide. Cette particularité structurale est due à la présence d'une asparagine en position 170 et d'une thréonine en position 174<sup>227</sup>. Un modèle de souris transgéniques sur-exprimant une PrP portant les substitutions S170N et N174T a donc été créé afin de déterminer si, dans cette espèce, l'altération de la structure tridimensionnelle de la protéine pouvait avoir des conséquences pathologiques. Ces animaux ont tous développé une

maladie neurologique progressive caractérisée par de l'ataxie, une cyphose, un amaigrissement et de la léthargie (incidence de 50 % à un an) et des dépôts de PrP<sup>res</sup> ont été mis en évidence dans diverses zones de leur encéphale. L'inoculation d'homogénats de cerveaux issus de souris atteintes à des souris transgéniques sur-exprimant la PrP murine sauvage (Tga20) a conduit à l'apparition d'une maladie neurologique ayant toutes les caractéristiques d'une EST. Des passages en série successifs, réalisés sur des souris Tga20 puis C57BL/6 a permis une adaptation progressive de l'agent infectieux, illustrée par la réduction des durées d'incubation et l'augmentation de la résistance à la PK de la PrP<sup>516</sup>. Ce prion était le premier exemple d'agent d'EST généré spontanément dans un modèle animal et capable de se propager chez des individus porteurs d'une séquence PrP sauvage. Il constitue une preuve formelle qu'*in vivo* certains polymorphismes du gène PrP peuvent entraîner le développement spontané d'une EST.

Très récemment, des résultats comparables ont été obtenus à partir de souris transgéniques sur-exprimant une PrP chimérique murine/humaine portant une mutation (E199K) analogue à la mutation E200K, rencontrée chez de nombreux patients atteints de MCJ familiale<sup>193</sup>. Dans cette étude, l'EST spontanée apparue chez les animaux transgéniques a pu être transmise directement, sans passage par des hôtes intermédiaires, à des souris C57BL/6.

Plus de 40 ans après qu'ait été émise pour la première fois l'hypothèse d'un agent pathogène protéique, les progrès réalisés en matière de propagation *in vitro* et *in vivo* des agents des EST sont donc en passe de valider définitivement le concept prion. Toutefois, malgré ces avancées spectaculaires, de nombreuses inconnues demeurent quant à la structure physique exacte des particules infectieuses et leur mode de répliation.

### **Répliation des prions : quel mécanisme ?**

La génération *de novo* d'un prion à partir de PrP<sup>c</sup> recombinante et de composés synthétiques indique que la conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est l'événement central dans la répliation des agents des EST<sup>580</sup>. Historiquement, plusieurs modèles théoriques de conversion ont été imaginés<sup>3</sup>. Au modèle d'hétérodimère, initialement proposé par Prusiner<sup>129</sup>, ont ainsi succédé les modèles de polymérisation à partir d'un noyau de nucléation et d'autocatalyse coopérative, plus cohérents d'un point de vue thermodynamique<sup>275, 337</sup>. Cependant, jusqu'à présent, la pertinence de ces modèles n'a pu être véritablement évaluée à l'aide d'outils

expérimentaux. Le développement récent de méthodes performantes de production et de propagation de prions *in vitro* ouvre de nouvelles perspectives dans ce domaine.

## **2 DIVERSITE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES**

A la fin des années 1950, Pattison observa que des chèvres inoculées avec un *pool* d'homogénats de cerveaux d'ovins atteints de tremblante (SSBP/1) développaient deux formes distinctes de la maladie. L'une était caractérisée par de la somnolence (*drowsy*) alors que l'autre était dominée par un prurit intense et précoce (*scratchy*). Ces deux tableaux cliniques étaient reproductibles par inoculation intra-spécifique, suggérant que le phénotype de la maladie était lié à l'agent transmis<sup>452-454</sup>.

Ces résultats, associés à la mise en évidence de la variabilité de la thermostabilité des ATNC issus de différents isolats<sup>164</sup>, contribuèrent à développer le concept de diversité biologique des agents responsables des EST, bien qu'à cette époque, leur nature soit totalement inconnue.

### **2.1 Notion de souche de prion**

Historiquement, l'étude de la biodiversité des ATNC a d'abord été réalisée en inoculant des isolats d'EST à des rongeurs par voie intracérébrale<sup>82, 83, 299, 302</sup>.

Lorsqu'un isolat d'EST est transmis à des souris conventionnelles de la même lignée, on observe généralement en premier passage une phase asymptomatique longue, variant de quelques mois à plus de deux ans et une efficacité variable de transmission (nombre de souris malades/nombre de souris inoculées). Au cours des passages suivants, la durée d'incubation diminue progressivement et l'efficacité de transmission augmente. Ces deux paramètres se stabilisent généralement après deux à trois passages en série<sup>87</sup>. En outre, la stabilisation de la durée d'incubation s'accompagne d'une uniformisation de la sévérité et de la distribution des lésions vacuolaires cérébrales chez les souris infectées<sup>190</sup>.

La durée d'incubation et le profil lésionnel cérébral sont les deux critères essentiels permettant de caractériser une souche de prion chez la souris<sup>83</sup>, même si d'autres paramètres peuvent également être pris en compte pour compléter la définition de souche (tableau 6).

**Tableau 6 :** Critères utilisables pour distinguer expérimentalement des souches de prion (d'après [46])

Phénotype	Techniques/protocoles utilisés
Période d'incubation dans des modèles animaux	Mesure de la période d'incubation ou de la durée de survie
Tableau clinique	Signes cliniques chez l'animal Tests comportementaux
Propriétés biochimiques de la PrP <sup>Sc</sup>	Clivage protéolytique (protéinase K/thermolysine) Ratio des glycoformes Dénaturation par des agents chaotropiques Résistance à la chaleur Ratio PrP native / PrP dénaturée Spectroscopie infra-rouge, dichroïsme circulaire, spectroscopie par transformée de Fourier
Distribution de la PrP <sup>Sc</sup> dans l'encéphale	Immunohistochimie / Histoblot
Nature des dépôts de PrP <sup>Sc</sup>	Histologie, coloration au rouge Congo ou à la thioflavine S/T Mapping épitopique des dépôts de PrP <sup>Sc</sup>
Distribution et intensité de la spongiose	Histologie (profil lésionnel)
Tropisme	Pour le système lympho-réticulaire Pour les cultures cellulaires

## 2.2 Principaux critères de souche *in vivo*

### 2.2.1 Durée d'incubation

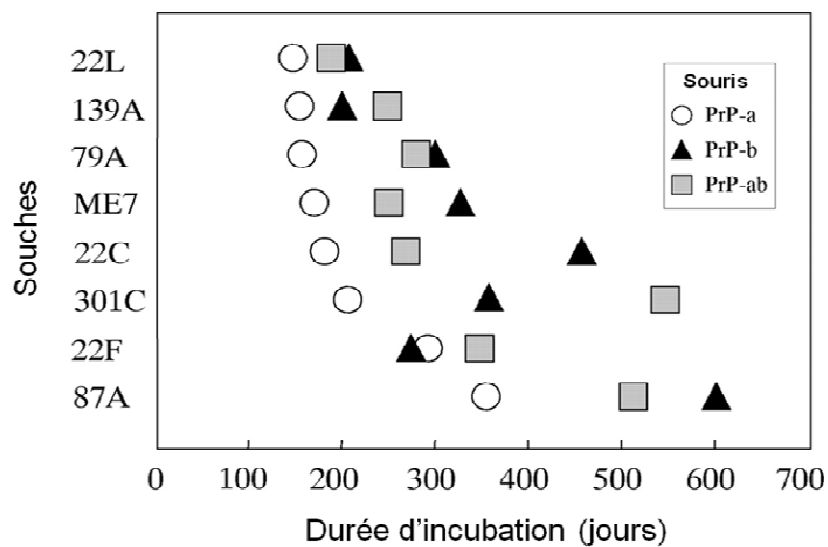
Pour une même souche, la durée d'incubation est hautement reproductible si les conditions expérimentales restent constantes.

En effet, la durée d'incubation peut varier en fonction :

- du titre infectieux de l'inoculum, qui est inversement proportionnel à la durée d'incubation<sup>553</sup>
- du génotype *Prnp* de la lignée de souris utilisée. Chez la souris, il n'existe que deux allèles du gène *Prnp* (désignés *Prnp-a* et *Prnp-b*) qui codent des protéines dont les séquences en acides aminés diffèrent aux codons 108 (L/F) et 189 (T/V)<sup>589</sup>. L'inoculation d'un même isolat à des souris de génotypes *Prnp-a* et *Prnp-b* peut aboutir à des différences de durée d'incubation de plusieurs centaines de jours<sup>87</sup>. La

durée d'incubation chez les souris issues du croisement F1 (*Prnp-ab*) est variable : elle peut être intermédiaire ou plus longue que la durée observée chez les souris *Prnp-a* et *Prnp-b*.

Lorsque ces deux paramètres sont contrôlés, la comparaison des durées d'incubation stabilisées observées dans des lignées de souris de génotypes *Prnp-a*, *Prnp-b* et *Prnp-ab* permet de distinguer différentes souches de prion (figure 5).



**Figure 5 :** Durées d'incubation de huit souches d'EST chez des souris de génotypes *Prnp-a*, *Prnp-b* et *Prnp-ab* (d'après [87])

Le typage biologique des souches de prion est théoriquement réalisable dans d'autres espèces de rongeurs que la souris mais, en pratique, l'absence de lignées congéniques avec des génotypes *PRNP* différents limite son intérêt. Toutefois, le hamster<sup>49, 297, 302, 304</sup> et le campagnol (*Clethrionomys glareolus*)<sup>426</sup> sont des modèles qui ont prouvé leur utilité pour différencier certaines souches d'EST.

Chez les espèces naturellement atteintes d'EST, outre l'absence de lignées consanguines, la caractérisation biologique de souches de prion se heurte aux difficultés à effectuer des passages en série sur des effectifs suffisants d'animaux. Hormis le recours aux rongeurs



conventionnels, une alternative à l'utilisation de ces espèces consiste à réaliser un typage de souches dans des modèles murins transgéniques exprimant une PrP hétérologue (cf. 3.5.2).

### 2.2.2 Profil lésionnel et profil de distribution de la PrP<sup>Sc</sup>

Une méthode standardisée basée sur l'évaluation semi-quantitative (notes de 0 à 5) de la sévérité des lésions vacuolaires dans douze zones (neuf zones de la substance grise et trois zones de la substance blanche) de quatre plans de sections cérébrales prédéfinis permet d'établir un profil lésionnel<sup>189, 190</sup>.

Dans l'espèce murine, le profil lésionnel est l'un des principaux critères permettant d'établir le phénotype biologique de souche. Toutefois, lorsqu'il est utilisé seul, son pouvoir discriminant peut être insuffisant car des souches de prions différentes peuvent avoir des profils lésionnels similaires, voire identiques. Récemment, le profil lésionnel de certains isolats de tremblante inoculés à des souris RIII (*Prnp-a*) s'est ainsi révélé proche de celui de l'ESB<sup>36</sup>.

Afin d'améliorer la caractérisation des souches, d'autres critères morphologiques tels que l'astrogliose, la microcytose, la présence de plaques amyloïdes ou la perte neuronale<sup>508</sup> sont parfois utilisés en complément du profil lésionnel.

D'autres méthodes complémentaires basées sur la distribution tissulaire de la PrP anormale sont plus fréquemment mises en œuvre, à l'échelle macroscopique (Histo blot, PET – *Paraffin Embeded Tissue* – blot)<sup>506, 588</sup> ou microscopique (immunohistochimie)<sup>12, 249</sup>.

Alors que l'intérêt du profil lésionnel et du profil de distribution de la PrP<sup>Sc</sup> dans le typage des souches de prion est largement documenté chez la souris, leur utilisation semble plus hasardeuse chez les hôtes naturels des EST. En effet, comme la transmission en série d'isolats est rarement réalisée chez les grandes espèces, les principales données neuropathologiques sont obtenues à partir d'isolats primaires. De nombreux facteurs individuels, notamment génétiques, interfèrent alors avec les résultats et gênent la discrimination phénotypique des agents.

La situation complexe de la tremblante chez les petits ruminants illustre bien ces difficultés. Bien que différents phénotypes de lésions nerveuses aient été identifiés chez des ovins atteints de tremblante classique, il semble que cette variabilité apparente soit autant attribuable au génotype *PRNP* de l'hôte<sup>37, 223, 350, 534</sup> qu'à la diversité des agents responsables de cette

maladie<sup>223, 224</sup>. Deux hypothèses peuvent être avancées: (i) un agent unique est responsable de tous les cas de tremblante classique et le génotype *PRNP* de l'hôte détermine le phénotype des lésions nerveuses, (ii) différents agents sont impliqués, chacun ciblant un génotype *PRNP* particulier.

De la même façon, chez l'Homme, plusieurs phénotypes de lésions nerveuses sont décrits dans les cas de MCJ sporadique<sup>443, 445</sup> sans qu'il soit possible de déterminer quelle part de cette variabilité est attribuable aux propriétés intrinsèques de l'agent infectieux et/ou au génotype de l'hôte au codon 129 (M/V) du gène *PRNP*.

Dans les EST familiales, il existe pratiquement autant de phénotypes de lésions nerveuses que de mutations associées à ces maladies<sup>138, 349</sup>. Toutefois, dans de rares cas de syndrome de GSS, deux phénotypes distincts ont été identifiés chez des individus porteurs de la même mutation (P102L – M129), suggérant une possible implication d'agents différents<sup>240</sup>.

A l'inverse, l'uniformité des profils lésionnels et des profils de distribution de la PrP anormale dans les cas de v-MCJ<sup>272</sup>, suggère que cette maladie est provoquée par un agent unique. Cette hypothèse est soutenue par l'existence d'un seul phénotype de lésions nerveuses dans tous les cas d'ESB classique étudiés<sup>507, 518, 587</sup>.

### 2.2.3 Lymphotropisme

Le caractère lymphotrope d'une souche de prion peut être mis en évidence par la présence de PrP anormale et/ou d'infectiosité dans les tissus lymphoïdes des individus infectés. Il a ainsi été démontré que la plupart des souches de tremblante classique et les prions responsables du CWD et du v-CJD ont un lymphotropisme marqué<sup>11, 272, 515, 578</sup>.

La quantité de PrP<sup>Sc</sup> dans les différents tissus lymphoïdes peut toutefois varier sous l'influence de facteurs indépendants de la souche de prion, notamment:

- la voie d'inoculation. La dissémination de la PrP anormale dans les organes lymphoïdes est moins large lors d'inoculation intracérébrale que lors d'inoculation orale<sup>277, 382</sup>. En outre, chez les individus contaminés par voie sanguine, la rate semble contenir de plus grandes quantités de PrP<sup>Sc</sup><sup>524</sup>.
- le génotype *PRNP* de l'hôte. De la PrP<sup>Sc</sup> est détectée dans les organes lymphoïdes des ovins ARQ/ARQ infectés expérimentalement par voie intracérébrale avec l'agent de

l'ESB alors que chez des ovins ARR/ARR inoculés avec le même isolat, la distribution de la PrP<sup>Sc</sup> semble limitée au SNC <sup>382</sup>.

- la durée d'évolution de la maladie. Lors d'une étude portant sur 36 patients atteints de MCJ sporadique, de la PrP<sup>Sc</sup> a pu être détectée dans la rate des 10 individus ayant eu la plus longue phase clinique <sup>214</sup>.

#### **2.2.4 Tableau clinique**

Les travaux de Bessen réalisés dans les années 1990 sur la TME illustrent bien la possibilité de distinguer des souches différentes de prion en fonction des signes cliniques observés.

Chez le hamster syrien, la propagation de l'isolat *Stetsonville* de TME provoque deux formes cliniques distinctes d'EST, caractérisées respectivement par de la somnolence ou de l'hyperexcitabilité. Après plusieurs passages dans cette espèce, d'autres critères tels que la durée d'incubation, le profil lésionnel, la présence de PrP<sup>Sc</sup> dans les organes lymphoïdes ou encore la virulence envers le vison permettent de différencier deux souches de prion, baptisées DY (pour *drowsy*) et HY (pour *hyperexcitability*) <sup>49</sup>.

Toutefois, le tableau clinique demeure, dans de nombreux cas, peu discriminant. Ainsi, chez la souris, la plupart des souches de prion provoquent les mêmes signes cliniques (ataxie, poil terne et cyphose) <sup>409</sup>. Chez les petits ruminants, la tremblante et l'ESB provoquent des signes cliniques indifférenciables <sup>316, 317</sup>.

De manière plus anecdotique, certains tests comportementaux ou visant à évaluer la sensibilité à la douleur pourraient permettre de différencier des souches de prion dans l'espèce murine, avant l'apparition de signes cliniques évidents <sup>157</sup>.

### **2.3 Application du typage biologique des souches de prion**

#### **2.3.1 Etude de la biodiversité des agents des EST animales**

Les différentes souches d'EST animales identifiées dans des modèles murins et cricétiens conventionnels sont répertoriées dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Origine et diversité des souches d'EST chez les rongeurs conventionnels  
(d'après [46])

Nom	Origine	Passage intermédiaire	Hôte
ME7	Tremblante ovine <sup>a</sup>	Non	Souris <i>Prnp-a</i>
87A	Tremblante ovine <sup>a</sup>	Non	Souris <i>Prnp-a</i>
221C	Tremblante ovine <sup>a</sup>	Non	Souris <i>Prnp-a</i>
87V	Tremblante ovine <sup>a</sup> / SSBP/1	Non, chèvre	Souris <i>Prnp-b</i>
79A	SSBP/1	Chèvre <sup>b</sup>	Souris <i>Prnp-a</i>
79V	SSBP/1	Chèvre <sup>b</sup>	Souris <i>Prnp-b</i>
139A <sup>d</sup>	SSBP/1	Chèvre <sup>b</sup>	Souris <i>Prnp-a</i>
22A	SSBP/1	Non	Souris <i>Prnp-b</i>
22F	22A non clonée	Non	Souris <i>Prnp-a</i>
22C	SSBP/1	Non, chèvre <sup>c</sup>	Souris <i>Prnp-a</i>
22H	22C non clonée	Non, chèvre <sup>c</sup>	Souris <i>Prnp-b</i>
22L	SSBP/1	Non	Souris <i>Prnp-a</i>
301C <sup>e</sup>	ESB	Oui ou non	Souris <i>Prnp-a</i>
301V	ESB	Oui ou non	Souris <i>Prnp-b</i>
139H	139A clonée	Non	Hamster syrien
263K <sup>f</sup>	SSBP/1	Chèvre, souris, rat	Hamster syrien
ME7-H	ME7 clonée	Non	Hamster syrien
HY <sup>g</sup>	TME <sup>h</sup>	Non	Hamster syrien
DY	TME <sup>h</sup>	Non	Hamster syrien

<sup>a</sup>: isolat de terrain ; <sup>b</sup> : passage de SSBP/1 chez la chèvre : isolat *drowsy* ; <sup>c</sup> : passage de SSBP/1 chez la chèvre : isolat *scratchy* ; <sup>d</sup> : aussi connue sous la dénomination Chandler ou RML ; <sup>e</sup> : on ne sait pas si 301C donne 301V chez des souris *Prnp-b* ; <sup>f</sup> : Sc237 est un sous-clone de 263K ; <sup>g</sup> : similaire à 263K ? ; <sup>h</sup> : TME : isolat Stetsonville.

La transmission expérimentale de plus d'une centaine d'isolats d'ESB à des lignées de souris consanguines a conduit à l'identification de deux souches distinctes grâce à leur phénotype biologique (durée d'incubation et profil lésionnel) : 301C chez les souris de génotype *Prnp-a* (RIII, C57BL/6) et 301V chez les souris de génotype *Prnp-b* (VM)<sup>81, 85, 232</sup>.

Plus récemment, l'inoculation de souris transgéniques pour le gène *PRNP* bovin avec des isolats d'ESB « atypiques » a permis de mettre en évidence l'existence de deux agents dont les caractéristiques phénotypiques étaient différentes de celles de l'agent responsable de l'ESB classique<sup>43, 44, 99, 110</sup>.

De nombreux phénotypes biologiques ont été identifiés lors de la transmission d'isolats de tremblante à des souris conventionnelles. Dans un premier temps, près d'une quinzaine de souches ont ainsi été décrites<sup>82, 163</sup> dont neuf étaient issues de l'isolat SSBP/1, transmis soit directement à la souris soit après passage intermédiaire chez la chèvre (isolats *drowsy* et *scratchy*). Toutefois, une diversité beaucoup plus réduite a été rapportée à partir d'isolats de terrain provenant de troupeaux britanniques. Dans ces conditions, seules quatre souches ont été identifiées : ME7, 87A et 221C chez des souris *Prnp-a* et 87V chez des souris *Prnp-b*<sup>82, 86, 562</sup> (tableau 7). Par ailleurs, l'utilisation de souris transgéniques pour le gène *PRNP* ovin (allèle VRQ ou ARQ) a également permis de distinguer des souches différentes, dont une associée à une forme de tremblante dite « atypique »<sup>16, 235, 338, 561, 562</sup>.

Les résultats issus de la transmission d'un panel d'isolats de CWD à des lignées murines transgéniques exprimant la PrP du cerf ou du wapiti suggèrent qu'au moins deux agents différents pourraient être responsables de cette EST<sup>13, 340</sup>.

Pour finir, comme évoqué précédemment, deux souches, HY et DY, ont été obtenues par passages en série d'un isolat de TME à des hamsters syriens (cf. 2.2.4).

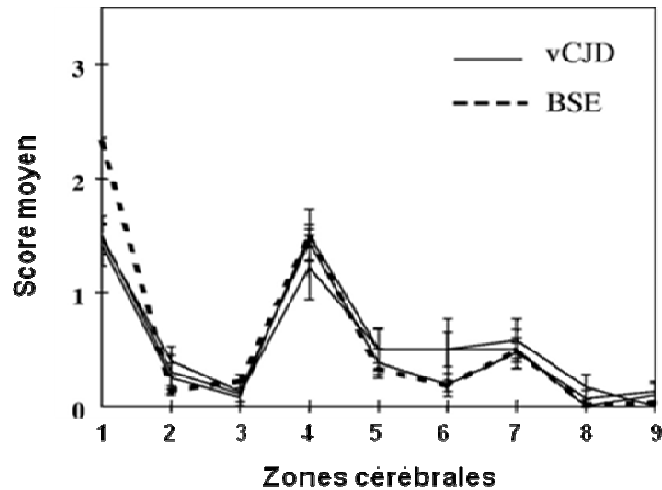
### **2.3.2 Démonstration du caractère zoonotique de l'ESB**

Suite à l'apparition de l'ESB dans les années 1980, un réseau européen de surveillance des MCJ a été initié dans le but de détecter l'émergence d'une éventuelle EST humaine due à l'agent de l'ESB. Une nouvelle forme de MCJ a pu être identifiée au Royaume-Uni dès 1996<sup>600</sup>. Ce variant de la MCJ se distinguait de la MCJ sporadique par un âge d'apparition

précoce, une durée d'évolution prolongée et la prédominance de symptômes psychiatriques associés à des troubles sensitifs persistants <sup>65</sup>. En outre, chez les individus atteints, aucune activité pseudo-périodique typique de la MCJ sporadique n'était visible à l'EEG<sup>620</sup>. *Post-mortem*, Le vMCJ pouvait être différencié des autres formes de MCJ grâce à ses lésions nerveuses, incluant notamment la présence de plaques florides dans l'encéphale et à la présence de PrP anormale dans les organes lymphoïdes <sup>65, 272</sup>.

D'un point de vue épidémiologique, l'apparition du vMCJ dans le pays où l'exposition humaine à l'agent de l'ESB avait été la plus large permettait d'envisager une cause commune à ces deux maladies. Cette hypothèse fut validée après des essais de transmission *in vivo*. Dans chacune des trois lignées murines (C57Bl6, RIII et VM), les durées d'incubation et les profils lésionnels (figure 6) obtenus après inoculation intracérébrale d'isolats de vMCJ ont été similaires à ceux observés avec des isolats d'ESB, démontrant l'identité des deux agents infectieux <sup>85, 332</sup>.

La même méthodologie fut adoptée pour démontrer que l'agent de l'ESB était également responsable de l'ESF et de l'encéphalopathie des ongulés exotiques <sup>85, 191</sup>.



**Figure 6 :** Comparaison des profils lésionnels obtenus chez des souris RIII inoculées avec des isolats de v-MCJ (n=3) ou un isolat d'ESB (d'après [87])

## 2.4 Typage biochimique des souches

Les souches DY et HY de TME identifiées *in vivo* chez le hamster, ont été associées à deux types de PrP<sup>Sc</sup>, caractérisés par leur solubilité dans le N-laurylsarcosyl, leur résistance à la digestion par la PK et leur profil électrophorétique<sup>48,50</sup>.

Ces résultats ont laissé entrevoir la possibilité de discriminer certaines souches de prion en se basant sur le phénotype biochimique de la PrP<sup>Sc</sup>. Présentée comme une alternative à l'utilisation des modèles rongeurs, ce typage biochimique a l'avantage d'être plus rapide (résultats en quelques jours) et moins coûteux.

Depuis vingt ans, l'amélioration des techniques de détection de la PrP<sup>Sc</sup> a permis d'élargir progressivement le panel des critères utilisables pour caractériser les souches de prion *in vitro*.

### 2.4.1 Thermorésistance

L'étude des propriétés physiques des ATNC a permis de montrer que, dans des conditions expérimentales équivalentes (nature du prélèvement et du traitement thermique, *cf.* 1.4.3.1), leur degré de résistance à la chaleur varie en fonction de la souche considérée.

Il est ainsi communément admis que les souches dérivées de l'ESB (301V et 301C) sont très thermostables alors que la situation des souches de tremblante est hétérogène<sup>76, 183, 212, 547, 554</sup>.

A titre d'exemple, l'autoclavage à 126°C pendant 30 minutes d'échantillons macérées d'encéphales de souris infectées par les souches 301V, ME7, 22A, 22C ou 139A a permis de réduire leur titre infectieux de manière variable. Aucun titre infectieux résiduel n'a été détecté pour la souche 22C (soit une réduction  $> 10^5$  DI<sub>50</sub>/g), alors, qu'après traitement, les titres des tissus contaminés par la souche 301V ont été estimés à  $10^6$  DI<sub>50</sub>/g (soit une réduction d'environ  $10^2$  DI<sub>50</sub>/g). Les souches ME7, 139A et 22A ont, quant à elles, donné des résultats intermédiaires<sup>554</sup>.

L'influence du génotype *PRNP* de l'hôte sur la thermostabilité des souches est controversée. Dans l'étude précédemment citée, pour chaque souche, les résultats obtenus avec des échantillons provenant de souris SV (*Prnp-a*) ou VM (*Prnp-b*) étaient comparables<sup>554</sup>. A l'inverse, la transmission des souches 79A, 301C et 301V à des souris ayant un génotype différent de celui sur lequel elles avaient été initialement propagées (*Prnp-a* pour 79A et 301C, *Prnp-b* pour 301V) réduisait leur résistance à l'autoclavage<sup>532</sup>.

## 2.4.2 Profil électrophorétique

Il est possible d'établir le profil électrophorétique de la PrP<sup>Sc</sup> extraite de tissus contaminés par migration sur gel en conditions dénaturantes (western blot). Toutefois, en l'absence d'anticorps reconnaissant spécifiquement la PrP anormale, il est nécessaire d'éliminer la PrP<sup>c</sup> de l'échantillon avant d'effectuer l'électrophorèse. Pour cela, les propriétés biochimiques respectives des deux isoformes de la PrP sont exploitées (tableau 4). L'homogénat est soumis à un traitement protéolytique (généralement à l'aide de PK) en milieu détergent. La PrP<sup>c</sup> est ainsi complètement dégradée alors que seule la partie N-terminale de la PrP<sup>Sc</sup> est lysée. La PrP<sup>res</sup>, insoluble dans les détergents non-ioniques, est ensuite récupérée par centrifugation/précipitation. L'électrophorèse est effectuée en conditions dénaturantes (SDS) et réductrices ( $\beta$ -mercaptoéthanol) de manière à ce que la vitesse de migration des protéines dépende « uniquement » de leur masse moléculaire.

Après le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur membrane, la révélation immunologique permet de visualiser un profil composé classiquement de trois bandes, correspondant aux formes bi-, mono- et non glycosylées de la PrP<sup>res</sup>.

### 2.4.2.1 Glycoprofil

La comparaison de l'intensité du signal correspondant à chacune des bandes permet d'estimer les proportions relatives des trois glycoformes de la PrP<sup>res</sup>. Le glycoprofil ainsi établi est un des critères biochimiques majeurs utilisés pour caractériser une souche ou un isolat.

Chez les ovins, les isolats expérimentaux d'ESB, caractérisés par une forte proportion de PrP<sup>res</sup> bi-glycosylée, peuvent, de cette manière, être différenciés de la plupart des isolats de tremblante classique<sup>565</sup>. Néanmoins, des exceptions existent puisque la souche expérimentale CH1641 et quelques isolats de terrain ont un glycoprofil similaire à celui de l'ESB<sup>29, 30, 187, 260</sup>. Chez l'Homme, le glycoprofil associé à l'ESB est retrouvé dans les cas de vMCJ. Cette signature spécifique permet de distinguer le vMCJ des cas de MCJ sporadique, caractérisés par une prédominance de la forme mono-glycosylée de la PrP<sup>res</sup><sup>133</sup>.

En complément de l'approche purement quantitative visant à déterminer le ratio des différentes glycoformes de la PrP<sup>res</sup>, il est possible de discriminer certains isolats de prion en fonction de la nature des groupements glucidiques attachés à la PrP<sup>res</sup><sup>440, 441</sup>.



En effet, ces derniers modifient non seulement la masse moléculaire de la protéine mais également son point isoélectrique. La diversité des groupements glucidiques peut donc être appréciée indirectement par électrophorèse bidimensionnelle, qui inclue une étape de migration en gradient de pH. Cette méthode a permis de distinguer deux isolats de MCJ sporadique (MM2 cortical et thalamique, tableau 8), indifférenciables par les techniques classiques de western blot <sup>440</sup>.

Une alternative à l'électrophorèse bidimensionnelle consiste à utiliser des lectines d'origine végétale se fixant spécifiquement à certains groupements oligosidiques à la place des anticorps anti-PrP lors de l'étape de révélation du western blot <sup>610</sup>.

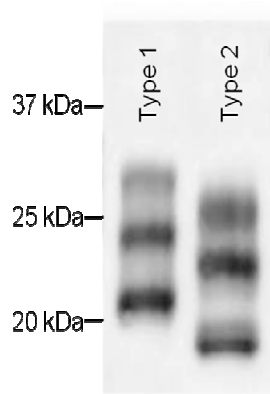
Toutefois, la nature de la souche n'est pas toujours l'unique facteur déterminant le glycoprofil. Ainsi, chez des souris infectées par les souches ME7 et 301V <sup>530</sup> ou chez des humains atteints de MCJ sporadique <sup>343</sup>, le profil de glycosylation de la PrP<sup>res</sup> varie selon la zone du cerveau considérée. Par ailleurs le génotype *PRNP* de l'hôte semble moduler la glycosylation de certaines souches murines (22A et 301C) <sup>531</sup> ou de certains isolats de MCJ <sup>343</sup>. La glycosylation différentielle de la PrP<sup>res</sup> est donc vraisemblablement le résultat d'interactions complexes entre la souche de prion, la PrP<sup>c</sup>, et les cellules de l'hôte, comme le suggèrent des essais de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* <sup>576</sup>.

#### 2.4.2.2 Masse moléculaire de la bande non glycosylée

L'analyse fine des profils électrophorétiques obtenus avec différentes souches ou isolats permet d'observer des variations de la masse moléculaire de la bande non glycosylée de la PrP<sup>res</sup>.

Chez l'Homme, deux types principaux de PrP<sup>res</sup> ont ainsi été identifiés : le type 1, caractérisé par une bande non glycosylée de 21 kDa et le type 2, avec une bande non glycosylée de 19 kDa <sup>443, 445</sup> (figure 7).

Chez les ovins, les isolats de tremblante classique peuvent également être classés en deux catégories principales, selon que la bande non glycosylée de la PrP<sup>res</sup> migre à 21 kDa (ex : SSBP/1) ou à 19 kDa (ex : CH1641). Sur ce seul critère, les isolats appartenant à la deuxième catégorie sont indifférenciables des isolats d'ESB <sup>29, 30, 260</sup>.



**Figure 7 :** Profils électrophorétiques des deux types humains de PrP<sup>res</sup> en western blot

La variabilité de la masse moléculaire de la bande non glycosylée est expliquée par le clivage de la PrP<sup>res</sup> par la PK à des sites différents de l'extrémité N-terminale<sup>50, 446</sup>. Le type 1 humain résulterait ainsi d'un clivage au niveau de l'acide aminé 82 alors que le type 2 serait le produit d'un clivage en position 97<sup>446</sup>.

Les résultats précédents ont permis d'envisager la possibilité de différencier certaines souches de prions en utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes situés à proximité des sites de clivage de la PrP<sup>31, 465</sup>.

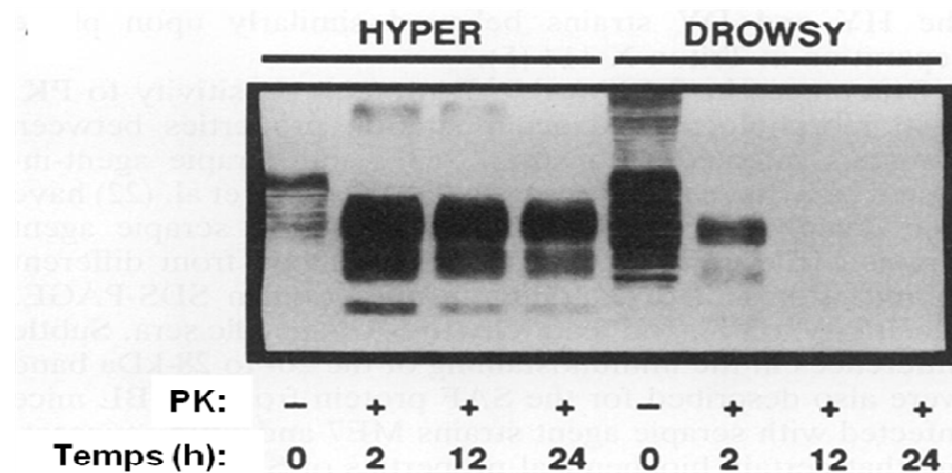
L'anticorps monoclonal 12B2, dont l'épitope correspond aux acides aminés 89 à 93 de la PrP humaine est utilisé pour détecter spécifiquement la PrP<sup>res</sup> de type 1. En outre, cet anticorps, tout comme l'anticorps P4, qui reconnaît les acides aminés 89 à 104 de la PrP ovine, ne détecte pas la PrP<sup>res</sup> issue d'isolats d'ESB. Des tests basés sur la comparaison de l'intensité des bandes obtenus avec ces anticorps ou avec des anticorps dont les épitopes sont situés dans le cœur de la PrP permettent ainsi de différencier l'ESB de la tremblante ovine classique<sup>327, 535, 565</sup>.

Par ailleurs, un anticorps polyclonal détectant uniquement la PrP<sup>res</sup> de type 2 a été produit récemment en immunisant des lapins contre un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 97 à 103 de la PrP humaine<sup>308</sup>. Cet anticorps a été utilisé pour le typage biochimique d'isolats de MCJ sporadique<sup>309</sup>.

### 2.4.3 Résistance à la digestion par les protéases

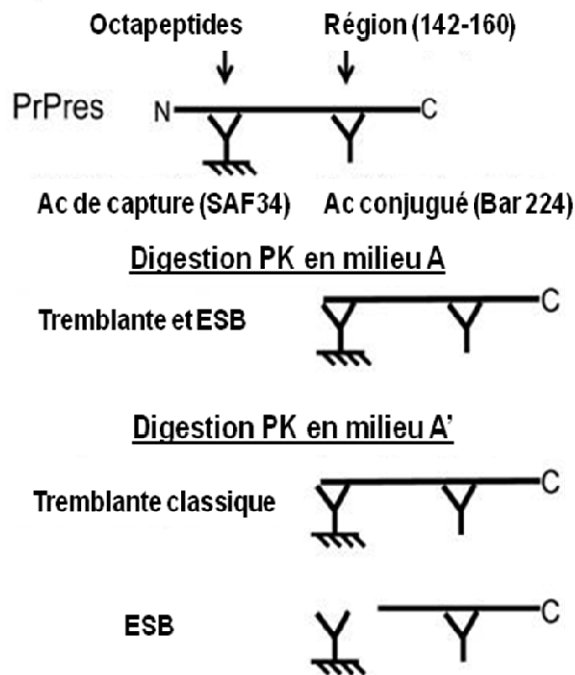
La PrP anormale n'est que partiellement digérée par les protéases. Toutefois, cette notion de résistance partielle à la protéolyse doit être nuancée.

La comparaison des cinétiques de dégradation de la PrP<sup>Sc</sup>, soumise à l'action prolongée de la protéinase K ou de la trypsine, permet de différencier certaines souches ou agents d'EST<sup>286, 287, 319, 437</sup> (figure 8).



**Figure 8 :** Cinétique de dégradation par la PK de la PrP<sup>tes</sup> associée aux souches HY et DY (d'après [48])

Il a ainsi été montré que la PrP<sup>Sc</sup> associée à l'ESB est particulièrement PK sensible<sup>319</sup>. Cette propriété a été exploitée pour mettre au point un test ELISA sandwich capable de discriminer les isolats d'ESB des isolats de tremblante classique<sup>522</sup>. Dans ce test, l'anticorps de capture reconnaît la partie N-terminale de la PrP (région des octapeptides) alors que l'épitope de l'anticorps conjugué est situé dans le cœur de la protéine (figure 9). Chaque échantillon subit une digestion par la PK dans deux milieux différents, A et A'. Dans le milieu A (détergents et agents chaotropiques) la digestion est modérée et la région des octapeptides est préservée, que la PrP<sup>Sc</sup> soit issue d'un isolat de tremblante ou d'un isolat d'ESB. En revanche, dans le milieu A', la digestion est effectuée avec une forte concentration de PK et seule la PrP<sup>Sc</sup> associée à la tremblante conserve sa partie N-terminale. La mesure des absorbances permet de calculer un ratio A/A' qui est beaucoup plus faible avec la tremblante classique (<2) qu'avec l'ESB (6-10).



**Figure 9** : Principe d'un test ELISA permettant de discriminer l'ESB de la tremblante classique (d'après [522])

#### 2.4.4 Conformation/Résistance à la dénaturation

L'existence de souches d'EST semble difficile à expliquer dans le cadre de la théorie de la « protéine seule ». En effet, quel peut être le support de la biodiversité chez des agents infectieux dépourvus d'acide nucléique ?

L'identification de souches différentes chez des individus de même génotype *PRNP* démontre que la structure primaire de la PrP<sup>c</sup> n'intervient pas dans ce phénomène. En outre, la possibilité de distinguer des souches de prion en fonction des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> suggère que les caractères de souche sont portés par cette protéine, probablement par l'intermédiaire de sa conformation.

Cette hypothèse a été confortée par la conservation des caractéristiques biochimiques de la PrP<sup>res</sup> issues d'isolats d'IFF et de MCJ, lors de leur propagation à des souris transgéniques exprimant une PrP chimérique humaine/murine (MHu2M). Bien que la séquence primaire de

la PrP soit identique chez tous ces animaux, la masse moléculaire de la PrP<sup>res</sup> non glycosylée détectée chez les souris inoculées avec les isolats d'IFF était de 19 kDa alors qu'elle était de 21 kDa chez les souris inoculées avec les isolats de MCJ. La différence de masse moléculaire reflétait donc l'existence de deux conformères de la PrP<sup>Sc</sup> MHu2M<sup>559</sup>.

Des preuves supplémentaires en faveur de ce concept ont été apportées *in vitro*. Lors d'expériences de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP anormale, les PrP<sup>Sc</sup> HY et DY avaient la capacité de transmettre leurs phénotypes biochimiques respectifs à la PrP<sup>Sc</sup> néoformée<sup>51</sup>. Par ailleurs, le lien entre la conformation de la PrP<sup>Sc</sup>, reflétée par son phénotype biochimique, et le biotype de souche a été établi par PMCA. Ainsi, la PrP<sup>Sc</sup> générée à partir de différentes souches d'EST murines (RML, ME7, 79A, 139A et 301C) conservait-elle non seulement la signature biochimique de ces souches, mais pouvait aussi reproduire leur phénotype biologique (durée d'incubation, profil lésionnel) lorsqu'elle était inoculée à des souris<sup>117</sup>.

Des mesures en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont mis en évidence des variations dans la structure secondaire de différentes souches de prion propagées chez le hamster<sup>118, 533, 563</sup>. Cette technique étant relativement lourde à mettre en œuvre, des méthodes alternatives, basées sur l'évaluation de la résistance de la PrP<sup>res</sup> à la dénaturation par le chlorhydrate de guanidine (GdnHCl) ont été imaginées pour détecter de manière indirecte les variations de conformation de cette protéine.

Un test immunologique (*conformation-dependent immunoassay*) dans lequel un anticorps monoclonal (3F4) reconnaissant un épitope conformationnel située dans la partie N-terminale de la PrP a été élaboré pour comparer l'immunoréactivité de la PrP<sup>res</sup> native et de la PrP<sup>res</sup> dénaturée. Lors d'un essai effectué chez le hamster, ce test a permis de distinguer clairement huit souches de prion<sup>498</sup>. Par ailleurs, ces huit souches ont été classées en quatre groupes distincts en utilisant une autre approche, consistant à évaluer par ELISA la résistance de la PrP à la PK après dénaturation par des concentrations croissantes de GdnHCl<sup>461</sup>.

## 2.5 Applications du typage biochimique de souche

### 2.5.1 Classification des cas de MCJ sporadique

Pendant plusieurs décennies, les cas de MCJ sporadique ont été classés uniquement sur la base de critères clinico-pathologiques. Ont ainsi été décrits (i) la forme typique (ou myoclonique) caractérisée par de la démence, des myoclonies et des crises épileptiformes, (ii) le variant de Heidenhain, différenciable de la forme typique par la prédominance de troubles visuels<sup>253, 396, 572</sup>, (iii) le variant de Brownell-Oppenheimer dont la symptomatologie est dominée par une ataxie cérébelleuse et une démence tardive<sup>79, 222</sup>, (iv) le variant thalamique indiscernable cliniquement de l'IFF<sup>444</sup>, (v) le variant panencéphalopathique dans lequel, à la spongiose de la substance grise classiquement observée, s'ajoutent des lésions sévères de la substance blanche<sup>42, 145, 404, 450</sup> et (vi) le variant « plaques kuru »<sup>125</sup>.

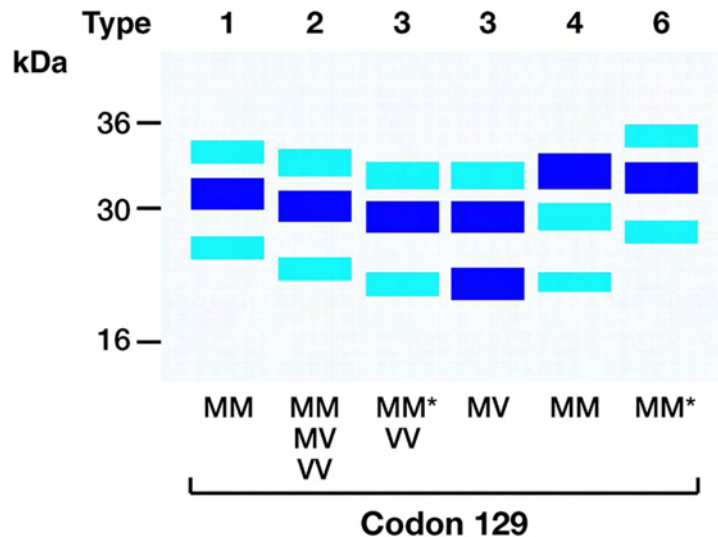
A partir d'une étude menée dans les années 1990 et portant sur 300 patients, Parchi et *al.* ont proposé une nouvelle classification des cas de MCJ sporadique, basée sur le génotype *PRNP* au codon 129 (M/M, M/V, V/V) des individus et le type biochimique de PrP<sup>res</sup> détecté dans leur encéphale<sup>445</sup>.

Cette classification permet de définir six catégories (MM1, MV1, MM2, MV1, MV2, VV1 et VV2), chacune associée à un tableau clinique et lésionnel particulier (tableau 8).

**Tableau 8 :** Classification des cas de MCJ sporadique proposée par Parchi (d'après [445])

Type	Classification précédente	% cas	Durée d'évolution (mois)	Caractéristiques cliniques	Caractéristiques neuropathologiques
MM1 MV1	Variant myoclonique Variant de Heidenhain	70	3.9	Démence rapidement progressive, myoclonie précoce, EEG pseudo-périodique caractéristique. Troubles visuels en début d'évolution dans 40 % des cas.	Lésions souvent importantes dans le cortex occipital. Dépôts synaptiques de PrP. Vacuoles confluentes et dépôts périvacuolaires de PrP dans 1/3 des cas.
VV2	Variant ataxique	16	6.5	Ataxie précoce, démence tardive, pas d'EEG caractéristique dans la plupart des cas.	Lésions importantes dans les régions sous-corticales dont les noyaux du tronc cérébral ; dans le néocortex, la spongiose est souvent limitée aux couches profondes. Dépôts focaux et périneuronaux de PrP.
MV2	Variant « plaques kuru »	9	17.1	Ataxie et démence progressive, pas d'EEG caractéristique, durée d'évolution longue (> 2 ans) dans quelques cas.	Idem VV2 avec présence de plaques kuru dans le cervelet. Dépôts focaux de PrP.
MM2 thalamique	Variant thalamique	2	15.6	Insomnie et hyperactivité psychomotrice dans la plupart des cas, ataxie et troubles cognitifs. Pas d'EEG caractéristique.	Atrophie du thalamus et de l'olive bulbaire (pas de spongiose), peu de lésions dans les autres zones ; spongiose parfois absente ou focale ; PrP <sup>Sc</sup> détectée en plus faible quantité que dans les autres variants.
MM2 cortical	Non établi	2	15.7	Démence progressive, pas d'EEG caractéristique.	Large vacuoles confluentes avec dépôts périvacuolaires de PrP dans toutes les couches corticales ; cervelet relativement épargné.
VV1	Non établi	1	15.3	Démence progressive, pas d'EEG caractéristique.	Lésions sévères dans le cortex cérébral et le striatum ; noyaux du tronc cérébral et cervelet épargnés ; pas de large vacuoles confluentes, très peu de PrP synaptique.

Plus récemment, une classification plus complexe, a été établie par Hill et *al.* <sup>258</sup>. L'analyse systématique du profil électrophorétique (poids moléculaire de la bande non glycosylée et glycoprofil) de la PrP<sup>res</sup> extraite de l'encéphale de 89 patients atteints de MCJ sporadique a permis de distinguer 4 types de PrP<sup>res</sup> (dont un détecté chez un seul patient), en plus du profil observé chez les patients atteints de vMCJ (type 4 ; figure 10).



**Figure 10 :** Profil électrophorétique de la PrP<sup>res</sup> dans les 9 catégories de cas de MCJ définies par Hill et *al.* (d'après [258]).

\* : un seul cas décrit

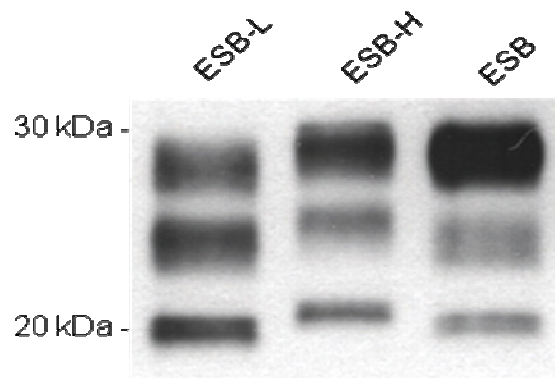
La comparaison de ces deux classifications permet d'identifier certaines similitudes. Ainsi, les cas MM1, MM2, MV2 et MV3 de la classification de Hill correspondent-ils respectivement aux cas MM1, MM2 corticaux, MV1 et MV2 de la classification de Parchi. En outre, le groupe VV2 de Hill pourrait comprendre à la fois les cas VV1 et une partie des cas VV2 de Parchi, l'autre partie appartenant au groupe VV3 <sup>258</sup>.



## 2.5.2 Découverte d'ESB atypiques

Suite à l'apparition de l'ESB et à la démonstration de son caractère zoonotique, des plans de dépistage de cette maladie ont été mis en place en Europe par recherche systématique de PrP<sup>Sc</sup> dans l'obex des bovins adultes abattus, morts ou euthanasiés, à l'aide de tests biochimiques (WB et ELISA) dits « rapides ».

Lors de ce dépistage à grande échelle, deux signatures biochimiques « atypiques » ont été identifiées par western blot <sup>52, 110</sup> chez des animaux âgés, et pour lesquels aucun signe clinique d'EST n'avait été rapporté. Ces signatures pouvaient être différenciées de celle de l'ESB classique grâce à la masse moléculaire de la bande non glycosylée de la PrP<sup>res</sup> : plus faible dans les cas d'ESB-L (pour *Low*) et plus élevée lors d'ESB-H (pour *Heavy*). En outre, le glycoprofil typique de l'ESB, caractérisé par une nette prédominance de la PrP<sup>res</sup> non glycosylée, n'était pas retrouvé dans les cas d'ESB-L (figure 11).



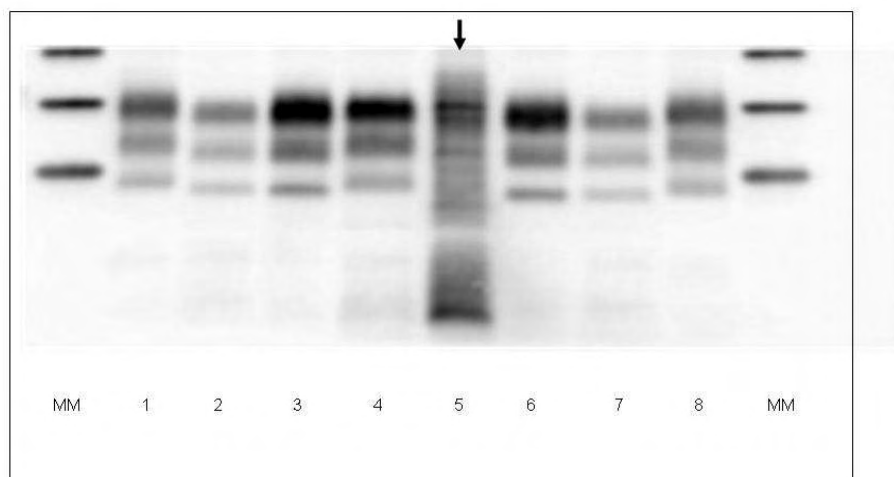
**Figure 11** : Profil électrophorétique de la PrP<sup>res</sup> issue d'isolats d'ESB classique et atypiques (d'après [514])

Des analyses immunohistochimiques effectuées sur l'encéphale de bovins atteints d'ESB classique et d'ESB atypique ont par ailleurs révélé des différences dans le profil de distribution de la PrP<sup>Sc</sup> <sup>99, 110, 318</sup>. Dans les cas d'ESB-L, le tronc cérébral, l'obex et le noyau moteur dorsal du nerf vague sont relativement épargnés alors que de grandes quantités de PrP<sup>Sc</sup>, formant des plaques amyloïdes, sont détectées dans le cervelet, la substance blanche corticale, le thalamus et le bulbe olfactif <sup>110</sup>. L'ESB-H est quant à elle caractérisée par la présence de PrP<sup>Sc</sup> intra-neuronale et intra-gliale dans la substance blanche du cervelet <sup>99, 318</sup>.

L'inoculation d'isolats d'ESB-L et d'ESB-H à des bovins a permis de reproduire ces phénotypes biochimiques et biologiques particuliers et de démontrer que ces maladies étaient de véritables EST, dues à des agents distincts de celui de l'ESB classique <sup>25, 195, 358, 433</sup>. Toutefois, l'origine de ces agents demeure énigmatique. La distribution géographique des cas d'ESB atypique, leur faible incidence (0.35 à 0.41 cas / millions d'individus testés) et l'âge relativement élevé (> 8 ans) des bovins détectés positifs <sup>175</sup> permettent de penser qu'il pourrait s'agir de maladies spontanées sans qu'aucune preuve expérimentale ne soit venue jusqu'à présent étayer cette hypothèse.

### 2.5.3 Découverte de cas de tremblante atypique

En 1998, des cas de tremblante ovine caractérisés par une signature biochimique inédite ont été identifiés en Norvège <sup>40</sup>. La PrP<sup>res</sup> détectée par WB dans l'encéphale des animaux atteints avait un profil électrophorétique constitué de 5 bandes dont la masse moléculaire variait de 11-12 kDa à 31 kDa environ <sup>16, 40, 41</sup>. Ce phénotype biochimique particulier contrastait avec le profil « 3 bandes » décrit jusqu'alors dans les cas classiques de tremblante (figure 12). Par ailleurs, la résistance à la dégradation de la PrP anormale par la PK apparaissait, dans les cas atypiques, beaucoup plus réduite par comparaison aux cas de tremblante classique <sup>97</sup>.



**Figure 12 :** Comparaison des profils électrophorétiques de la PrP<sup>res</sup> extraites d'isolats de tremblante classique et atypique

Pistes 1-4 et 6-8 : tremblante classique ; Piste 5 : tremblante atypique ; MM : marqueur de masse moléculaire

Sur le plan histopathologique, les cas de tremblante atypique pouvaient être distingués des cas de tremblante classique par une distribution des lésions vacuolaires et de la PrP<sup>Sc</sup> essentiellement dans le cervelet et le cortex cérébral, alors que l'obex était relativement épargné. En outre, les organes lymphoïdes des individus atteints semblaient dépourvus de PrP anormale<sup>40, 41</sup>.

La preuve que la signature biochimique détectée chez les animaux norvégiens était associée à un authentique agent d'EST a été apportée lors de la transmission d'isolats de tremblante atypique à des ovins<sup>519-521</sup> et à des souris transgéniques exprimant une PrP ovine<sup>16, 235, 338</sup>. Les animaux inoculés ont développé une maladie nerveuse et la PrP<sup>res</sup> extraite de leur encéphale avait les mêmes propriétés biochimiques que celle de l'isolat primaire. L'origine de ce « nouvel agent » est à ce jour indéterminée. Comme l'ESB-L et l'ESB-H, la tremblante atypique pourrait être une maladie neurodégénérative spontanée.

## **2.6 Limites des typages biologique et biochimique des souches de prion**

L'utilisation du typage biochimique comme moyen d'étude de la diversité des souches de prion ne peut être envisagée que si à une souche ne correspond qu'un seul phénotype biochimique et si à un phénotype biochimique ne correspond qu'une seule souche. Or, dans la plupart des cas, ce préalable n'est pas vérifié. A titre d'exemple, la transmission d'isolats de tremblante ovine possédant un profil électrophorétique et un glycoprofil identiques à des souris C57BL/6 n'a pas modifié leur phénotype biochimique, suggérant que le même agent était présent dans ces isolats. Pourtant, l'analyse des durées d'incubation et des profils lésionnels obtenus chez ces animaux a conduit à l'identification de plusieurs souches (87A, ME7, 221C)<sup>561, 562</sup>.

Le typage des souches à l'aide de rongeurs conventionnels est donc resté pendant longtemps la méthode de référence pour étudier la diversité des agents des EST. Pourtant, il est rapidement apparu que le recours à ces modèles animaux n'était pas dépourvu d'inconvénients. En effet, beaucoup d'isolats d'EST ne sont pas transmissibles à la souris<sup>80, 86, 87, 187, 261, 338</sup> et de nombreuses interrogations sur les conséquences de la transmission interspécifique des prions, en termes de propriétés biologiques et biochimiques, ont été soulevées.

Cet obstacle peut aujourd'hui être partiellement contourné grâce aux modèles animaux transgéniques pour le gène *PRNP* qui ont été créés suite à l'étude des facteurs influant sur l'efficacité de la transmission interspécifique des prions.

### **3 FRANCHISSEMENT DES BARRIERES DE TRANSMISSION ET CONSEQUENCES SUR LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES PRIONS**

#### **3.1 Un problème conceptuel aux implications sanitaires majeures**

Alors qu'expérimentalement la propagation intraspécifique des prions est relativement aisée<sup>146</sup>, la transmission d'isolats d'EST entre individus d'espèces différentes est généralement d'une efficacité limitée<sup>87</sup>. Au-delà de l'intérêt académique que peut avoir la compréhension des mécanismes responsables d'un tel phénomène, l'identification des barrières de transmission limitant la diffusion interspécifique des prions et l'évaluation de leur perméabilité constituent des enjeux majeurs de santé publique. En effet, l'ensemble des données épidémiologiques indiquent clairement que les agents des EST circulent à des niveaux significatifs dans les populations d'animaux de rente<sup>181, 182</sup>. Or, bien que la démonstration du lien entre l'ESB et le vMCJ ait conduit à la mise en place de mesures réduisant les risques d'entrée de ces agents dans la chaîne alimentaire (dépistage des EST, retrait des matériaux à risques spécifiés), il demeure impossible de garantir l'absence totale d'exposition des populations humaines aux prions d'origine animale.

Dans ce contexte, il apparaît donc primordial (i) d'estimer le potentiel zoonotique des différents agents d'EST circulant dans les populations d'animaux de rente, (ii) d'évaluer leur capacité à se propager chez des espèces différentes de celle(s) de leurs hôtes naturels et (iii) de déterminer quelles sont les conséquences de telles propagations interspécifiques sur leurs propriétés biologiques.

Par ailleurs, le dépistage rapide des EST animales reposant sur l'utilisation de tests de détection biochimique de la PrP<sup>Sc</sup>, il semble également pertinent de caractériser les éventuelles modifications de signature biochimique associée au franchissement des barrières de transmission.

## 3.2 Evolution des propriétés des prions lors de transmission interspécifique

Les tentatives de transmission interspécifique des agents d'EST peuvent aboutir à des résultats radicalement différents, variant en fonction de l'agent et des espèces considérés.

### 3.2.1 Absence totale de transmission / Infection asymptomatique chronique

Un hôte donné peut être totalement réfractaire à l'infection par les prions provenant de certaines espèces. Ainsi, tous les essais de transmission d'EST humaines (MCJ, kuru) et animales (treiblante, ESB) au lapin se sont soldés par des échecs<sup>209</sup>. De la même façon, la plupart des isolats de treiblante classique issus d'ovins de génotype *PRNP* ARQ/ARQ<sup>86, 87, 187, 261</sup> ainsi que les isolats de treiblante atypique<sup>88, 235, 338</sup> et de CWD<sup>80</sup> ne provoquent pas d'EST chez la souris conventionnelle. Le hamster syrien, quant à lui, ne semble pas sensible à l'ESB (isolats bovins) et à l'ESB-H<sup>422</sup>.

Toutefois, alors que le principal critère utilisé pour évaluer l'efficacité de la transmission des EST est le développement d'une maladie neurologique chez les animaux inoculés, il semble que l'absence de symptômes ne puisse suffire à garantir l'absence réelle de propagation d'un prion.

Ainsi, malgré des observations récurrentes faisant état de l'impossibilité de transmettre la souche de treiblante 263K (adaptée au hamster) à la souris conventionnelle<sup>299</sup>, des investigations plus poussées ont permis de montrer que l'encéphale des souris inoculées restait infectieux pour le hamster pendant plusieurs mois, et ce même en l'absence de PrP<sup>Sc</sup> détectable<sup>256, 478</sup>. Ce phénomène semblait être dépendant de l'expression de la PrP<sup>c</sup> murine puisqu'après la même période d'observation, aucun pouvoir infectieux résiduel n'était détecté chez des souris *Prnp*<sup>-/-</sup> inoculées avec la même souche<sup>477</sup>. Il est donc probable que la souche 263K ait la capacité de se répliquer à bas bruit chez la souris sans entraîner de manifestations cliniques. De la même façon, alors que la transmission d'isolats de MCJ sporadique à des souris conventionnelles n'aboutit que rarement au développement d'une maladie clinique (même après plusieurs passages itératifs)<sup>85</sup>, les tissus issus de ces animaux sont capables de provoquer une EST chez le campagnol, modèle par ailleurs décrit comme très sensible à la MCJ sporadique<sup>426</sup>.

Il est par ailleurs important de rappeler que les EST sont des maladies à incubation longue. Chez l'Homme, des cas de kuru ont ainsi été rapportés plus de cinquante ans après la dernière exposition des patients à l'agent infectieux<sup>136</sup>. Outre le fait que l'on puisse dès lors émettre des doutes légitimes sur la pertinence de certaines publications rapportant l'absence de propagation de l'agent de l'ESB au poulet ou au porc après respectivement quelques semaines ou quelques mois d'observation<sup>385, 493</sup>, il est possible d'imaginer que, dans certains cas, la durée d'incubation de la maladie dépasse l'espérance de vie des modèles animaux utilisés, laissant croire à tort à un échec de transmission<sup>162, 257</sup>. Il est sur ce point utile de rappeler que la durée d'incubation varie en fonction du titre infectieux de l'inoculum<sup>298, 469, 560</sup> et de la voie d'inoculation utilisée. En effet, les voies d'inoculation périphériques (voie orale notamment) sont généralement moins efficaces que la voie intracérébrale<sup>298, 303</sup>.

### **3.2.2 Conservation/Altération des propriétés de souche**

Après transmission interspécifique d'un prion, des similitudes peuvent parfois être mises en évidence entre le phénotype observé chez l'hôte donneur et celui obtenu chez l'hôte receveur (ex : signature biochimique de la PrP<sup>res</sup>, distribution des lésions dans l'encéphale). Cependant, il est extrêmement difficile d'évaluer à l'aide de cette seule comparaison phénotypique si l'agent propagé chez l'espèce receveuse a effectivement conservé ses propriétés initiales.

Deux stratégies principales sont donc couramment utilisées pour vérifier si la transmission d'un agent issu d'une espèce A à une espèce B a modifié ses propriétés biologiques.

La première consiste à réinoculer l'agent de l'espèce B à l'espèce A et à comparer le phénotype ainsi obtenu à celui initialement décrit. Il a été prouvé de cette façon que la souche de tremblante murine ME7, propagée chez des souris de génotype *Prnp*-a, conserve ses propriétés, même après plusieurs passages intermédiaires chez le hamster<sup>304</sup>.

La seconde méthode repose sur l'utilisation d'une espèce tierce, dite « rapporteuse ». Le recours à la souris conventionnelle a ainsi permis de mettre en évidence la stabilité des caractères phénotypiques de l'agent de l'ESB, malgré des passages intermédiaires chez des hôtes variés, infectés naturellement (Homme, félidés, ongulés exotiques) ou expérimentalement (ovins, caprins, porcs, macaques). En effet, dans l'espèce murine, la transmission d'isolats d'ESB, de vMCJ, d'ESF ou d'encéphalopathie spongiforme des

ongulés exotiques a abouti invariablement à la propagation des souches 301C ou 301V<sup>81, 85, 332</sup> (cf. 2.3.2).

Toutefois, cette approche possède des limites, comme l'ont montré des expériences de transmission d'isolats d'ESB provenant d'ovins de génotype ARQ/ARQ et de bovins à des souris transgéniques exprimant la PrP bovine. En effet, dans ce modèle, les durées d'incubation obtenues avec les isolats ovins étaient significativement plus courtes que celles observées avec les isolats bovins alors que les profils lésionnels, profils de distribution de la PrP<sup>Sc</sup> et propriétés biochimiques de la PrP<sup>res</sup> étaient similaires chez tous les animaux inoculés<sup>179</sup>. Dans la mesure où cette différence persistait lors de passages successifs, elle ne pouvait être expliquée par une différence de titre infectieux entre les isolats. Il semble donc que le passage de l'agent de l'ESB dans l'espèce ovine altère véritablement son comportement biologique sans modifier son phénotype chez la souris conventionnelle.

Des travaux récents ont par ailleurs montré que ce changement se manifestait aussi par une capacité accrue à se propager chez des souris transgénique porteuses du gène *PRNP* porcin<sup>180</sup> ou humain<sup>438</sup>.

Bien que ces observations suggèrent que la capacité à conserver des propriétés stables est une propriété intrinsèque de l'agent, les expériences menées sur les souches de tremblante adaptées à la souris ont montré qu'aucune règle simple ne semblait exister. La souche 139A, par exemple, demeure stable après plusieurs passages intermédiaires chez le rat mais subit une modification radicale de son phénotype après seulement deux passages intermédiaires chez le hamster<sup>302, 304</sup> (émergence de la souche 139H).

### **3.2.3 Emergence d'un nouvel agent**

Lors de transmission interspécifique, il est possible de voir émerger un prion dont les caractéristiques et les propriétés biologiques sont clairement différentes de celles de l'agent inoculé.

L'un des exemples illustrant le mieux ce phénomène, initialement dénommé « mutation » en référence à l'évolution brutale des caractéristiques biologiques d'autres agents infectieux (virus, bactérie), est la propagation des souches DY et HY chez des hamsters inoculés avec l'isolat *Stetsonville* de TME<sup>49</sup>. Après trois passages dans cette espèce, ces deux souches sont non seulement différenciables par leurs phénotypes biologiques (tableau clinique, durée

d'incubation, profil lésionnel, lymphotropisme) et biochimiques respectifs mais aussi par leur capacité à infecter le vison. En effet, la souche DY conserve un pouvoir pathogène pour cet animal, contrairement à la souche HY qui en est dépourvue<sup>49</sup>. Même si ces observations semblent indiquer que seule la souche DY était initialement présente chez le vison et que HY est apparue à la faveur d'une « mutation » de l'agent infectieux, une autre explication possible pourrait être que l'isolat de départ était constitué d'un mélange des deux souches dans lequel HY était minoritaire. Afin d'écarter cette éventualité, l'isolat de TME a été cloné par passages successifs en dilution limite d'infectiosité et inoculé à des hamsters. Là encore, HY et DY ont pu être isolées indiquant que HY ne préexistait pas dans l'isolat de départ mais a émergé *de novo*.

L'émergence d'un agent ayant un phénotype différent de celui de départ peut aussi être observée lors de transmission intraspécifique entre individus ayant des génotypes *PRNP* différents (barrière de transmission génotypique). Ainsi, lorsque la souche 22C, maintenue habituellement sur des lignées de souris *Prnp-a*, est propagée chez des souris *Prnp-b*, il est possible de voir apparaître progressivement une nouvelle souche, nommée 22H<sup>84</sup>. Cependant, si la souche 22C est préalablement clonée, son phénotype ne change pas, démontrant que 22H est un composé minoritaire contenu dans la souche 22C non clonée. A l'inverse, la souche 22A, issue de souris *Prnp-b*, peut générer la souche 22F lorsqu'elle est transmise à des souris *Prnp-a*. Ce résultat ayant été obtenu que la souche 22A ait été ou non clonée, il est clair que 22F est un « mutant » de 22A<sup>84</sup>.

Bien que le clonage des souches de prions soit une technique couramment utilisée pour distinguer les changements de phénotype dus à des « mutations » de ceux liés à la présence de plusieurs agents dans un même isolat, il apparaît que certaines souches clonées demeurent instables, même lorsqu'elles ne franchissent aucune barrière de transmission (transmission intraspécifique chez des individus ayant le même génotype *PRNP*). C'est le cas de la souche 87A, propagée chez des souris C57BL6, dont le phénotype peut évoluer brutalement lorsqu'elle est inoculée à forte dose alors qu'il reste stable lors d'inoculation à faible dose. L'agent obtenu présente alors toutes les caractéristiques de la souche ME7<sup>82</sup>.



### 3.3 Déterminants des barrières de transmission

#### 3.3.1 Séquence de la PrP

Historiquement, les travaux menés sur les premiers modèles d'animaux transgéniques pour le gène *PRNP* ont démontré que le degré d'homologie entre les séquences de la PrP de l'hôte donneur et de l'hôte receveur avait une influence majeure sur l'efficacité de la transmission interspécifique des prions. A la fin des années 1980, Scott *et al.* ont en effet prouvé qu'il était possible d'abolir l'apparente barrière de transmission « absolue » empêchant la propagation de la souche 263K chez la souris en faisant exprimer à cette dernière le gène *PRNP* du hamster<sup>509</sup>.

Le rôle capital joué par la structure primaire de la PrP dans le phénomène de barrière de transmission est également illustré par l'influence de certains polymorphismes du gène *PRNP* sur la sensibilité aux EST dans les espèces ovine et humaine (*cf.* 1.4.4.2). De la même façon, dans des conditions expérimentales, la substitution d'un seul acide aminé (101L) au sein de la séquence de la PrP murine, modifie la capacité de certaines souches (ME7, 22A, 263K) ou isolats d'EST (vMCJ, GSS) à se propager chez la souris conventionnelle<sup>33, 375</sup>.

Toutefois, la réussite de la transmission d'un isolat d'EST semble ne pas toujours dépendre uniquement des séquences PrP du donneur et du receveur. A titre d'exemple, il est plus difficile de transmettre le vMCJ à certains modèles murins transgéniques surexprimant la PrP humaine qu'à des souris conventionnelles<sup>17</sup>. Il est donc clair que d'autres facteurs interviennent dans le phénomène de barrière de transmission.

#### 3.3.2 Nature de l'agent

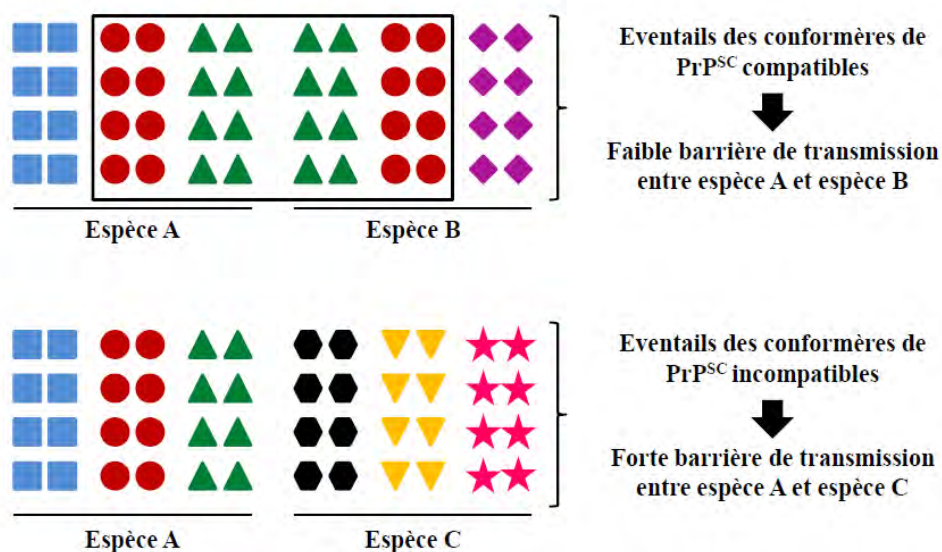
Dans certains cas, l'issue de la transmission interspécifique d'un agent d'EST semble dictée par sa nature même. L'agent de l'ESB peut par exemple infecter des hôtes ayant des séquences PrP très variées<sup>85</sup>. Par ailleurs, des résultats de transmission d'isolats d'EST humaines à la souris conventionnelle vont également dans ce sens. En effet, les souris (*Prnp*-a) sont sensibles au vMCJ alors qu'aucun signe clinique n'est détecté lorsque ces animaux sont inoculés avec des isolats de MCJ sporadique (cas MM1)<sup>85, 426</sup>. Pourtant dans les deux

cas, la séquence de la PrP des donneurs est identique (PrP humaine, homozygotie M/M en position 129).

### 3.4 Mécanismes moléculaires impliqués

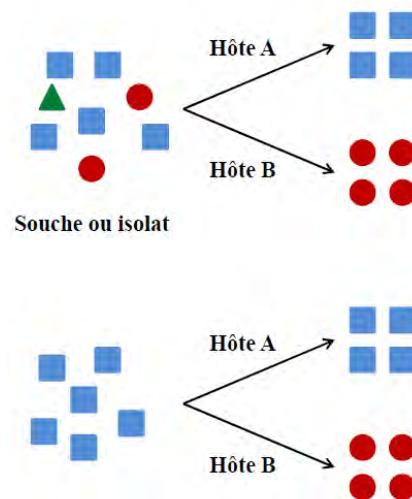
Malgré la mise au point de modèles de conversion *in vitro* de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> 310, les phénomènes moléculaire exacts mis en jeu lors du franchissement des barrières de transmission ne sont pas connus avec précision. L'ensemble des connaissances acquises au cours des deux dernières décennies a toutefois permis d'élaborer un modèle permettant d'unifier les notions de souche de prion et de barrière de transmission, qui ne seraient, d'après Collinge et Clarke, que les « deux faces opposées d'une même pièce » 135.

Selon ce modèle, la PrP<sup>Sc</sup> présente chez un individu atteint d'EST adopterait un éventail de conformations dont l'étendue serait déterminée à la fois par les contraintes liées à la séquence PrP de l'hôte, la stabilité thermodynamique des différents conformères et leur capacité à se répliquer à un niveau suffisant pour permettre leur persistance *in vivo*. La « force » d'une barrière de transmission serait dès lors dépendante du degré de compatibilité entre l'éventail des conformères existant chez l'hôte donneur et celui pouvant être potentiellement généré chez l'hôte receveur. Ainsi, la transmission d'un agent d'EST sera d'autant plus facile que la PrP<sup>c</sup> du receveur pourra être convertie en molécules de PrP<sup>Sc</sup> capables d'adopter la conformation d'au moins un des conformères de PrP<sup>Sc</sup> du donneur (figure 13)



**Figure 13 :** Principe du modèle de sélection conformationnelle (d'après [135])

Chez un hôte donné, diverses sous-populations de PrP<sup>Sc</sup>, aux propriétés physico-chimiques différentes, seraient donc générées au cours du processus réplcatif de l'agent <sup>368, 483</sup>, et le phénotype de souche observé refléterait celles de la sous-population majoritaire ou dominante <sup>462</sup>. Lors de la transmission d'un isolat d'EST à un individu d'une autre espèce ou de la même espèce mais ayant une séquence PrP différente (polymorphisme du gène *PRNP*), le conformère le plus adapté au nouvel hôte serait sélectionné (figure 14). Si celui-ci est différent du conformère majoritaire dans l'isolat de départ, on observe un changement de phénotype. Cette plasticité dynamique de l'agent, dont le principe est calqué sur le concept des quasi-espèces virales<sup>176</sup>, permettrait également d'expliquer qu'un prion biologiquement cloné dans un modèle de culture cellulaire chroniquement infecté <sup>345, 367</sup> ou dans un modèle animal <sup>49</sup> puisse, sous l'effet d'une pression de sélection environnementale, voir ses propriétés biologiques évoluer (figure 14).



**Figure 14 :** Explication du phénomène de mutation selon le modèle de sélection conformationnelle (d'après [135])

### 3.5 Modélisation du franchissement des barrières de transmission

La multiplicité des facteurs impliqués dans le modèle théorique de sélection conformationnelle et leurs interactions complexes, rendent impossible, en l'état actuel des connaissances, la prédiction *a priori* du résultat de la transmission d'un prion issu d'une

espèce A à une espèce B et/ou de l'évolution de son phénotype lors de cette transmission. Dès lors, la perméabilité des barrières de transmission ne peut être testée qu'expérimentalement, essentiellement à l'aide de modèles animaux.

### 3.5.1 Bio-essais sur hôtes conventionnels

L'approche la plus logique pour évaluer la capacité d'un agent d'EST à franchir une barrière de transmission interspécifique est de l'inoculer directement à des individus de l'espèce cible. De nombreuses expériences ayant pour but de déterminer le spectre d'hôtes potentiel de l'agent de l'ESB ont ainsi été mises en œuvre chez des petits ruminants<sup>188</sup>, des porcs<sup>390, 493</sup> ou encore des cervidés<sup>151</sup>. Il a été démontré par la même méthode que certains agents de tremblante ovine pouvait potentiellement infecter les bovins<sup>149, 150, 315</sup> ou que certains isolats de MCJ sporadique pouvaient être propagés chez les caprins<sup>239</sup>.

Toutefois, pour des raisons éthiques et financières, il n'est pas envisageable de réaliser dans chaque espèce d'intérêt de tels bio-essais, qui, pour donner des résultats pertinents, nécessiteraient l'inoculation d'un nombre significatif d'individus et un suivi pendant toute leur durée de vie. En outre, si cette méthode permet d'apporter des informations relatives à la capacité des prions à contaminer les animaux de rente, elle ne peut évidemment pas être utilisée pour évaluer leur potentiel zoonotique.

Le recours aux primates non-humains a longtemps été considéré comme la seule solution à ce problème. Le macaque (*Macaca fascicularis*)<sup>330, 332, 333</sup>, le ouistiti (*Callithrix jacchus*)<sup>23</sup> et le microcèbe (*Microcebus murinus*)<sup>58</sup> ont ainsi servi de modèles pour évaluer les risques de transmission de l'ESB à l'Homme. La comparaison des phénotypes biologiques obtenus chez des macaques inoculés par voie intra-cérébrale avec des isolats d'ESB et de vMCJ a contribué à révéler le lien entre ces deux maladies, en complément des données issues des bio-essais sur rongeurs conventionnels<sup>332</sup>. En outre, cette espèce a permis de démontrer que le vMCJ est transmissible par transfusion sanguine<sup>139</sup>.

D'autres EST animales telles que la tremblante classique<sup>23</sup> ou l'ESB-L<sup>140</sup> ont été également transmises à des primates. Toutefois, il semble délicat de tirer des conclusions définitives de ces travaux du fait du faible nombre d'isolats inoculés et/ou des faibles effectifs impliqués.

### 3.5.2 Modèles animaux transgéniques

Les résultats démontrant le rôle de la séquence de la PrP dans le phénomène de barrière de transmission, combinés au perfectionnement des techniques de transgénèse ont conduit au développement de très nombreux modèles murins exprimant la PrP d'espèces hétérologues (tableau 9 en annexe).

Ces modèles transgéniques sont généralement créés sur un fond génétique *Prnp*<sup>0/0</sup> pour éviter tout phénomène d'interférence dû à l'expression de la PrP murine endogène. En effet, il a par exemple été démontré que des isolats de MCJ ne pouvaient pas être propagés chez des souris transgéniques co-exprimant les gènes *PRNP* murin et humain alors qu'ils provoquaient une EST chez des souris exprimant uniquement la PrP humaine<sup>558</sup>.

Deux techniques peuvent être utilisées pour créer des souris transgéniques pour le gène *PRNP* : (i) la transgénèse additionnelle qui consiste à injecter directement des fragments d'ADN contenant le gène *PRNP* hétérologue dans des ovocytes fécondés et qui conduit à l'intégration au hasard de une à plusieurs copies du transgène dans le génome et (ii) la transgénèse ciblée (*knock-in*) dans des cellules souches, qui permet d'insérer le transgène à l'emplacement exact du gène *PRNP* murin par recombinaison homologue<sup>236</sup>. Les souris transgéniques générées par transgénèse ciblée expriment donc la PrP à des niveaux comparables à ceux observés chez des souris sauvages (WT) alors que les animaux créés par transgénèse additionnelle surexpriment le plus souvent la protéine. Cette différence se traduit par une moindre efficacité des modèles *knock-in* à propager certains prions pourtant issus d'hôtes exprimant une PrP de séquence homologue<sup>17</sup>. En effet, la durée d'incubation est généralement inversement proportionnelle au niveau d'expression de la PrP et il est possible que dans certains cas, la durée de vie de ces souris (environ 2 ans), qui est bien plus réduite que celle des hôtes naturels d'EST, ne soit pas suffisante pour permettre le développement d'une maladie clinique ou tout du moins l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> en quantité détectable<sup>56</sup>.

La méthodologie permettant d'évaluer la capacité d'un prion issu d'une espèce A à infecter une espèce B à l'aide modèles murins transgéniques est simple. Il suffit de l'inoculer à des souris transgéniques exprimant le gène *PRNP* de l'espèce B et de comparer le taux d'attaque avec celui obtenu lors de l'inoculation d'un prion issu de l'espèce B au même modèle (contrôle)<sup>512</sup>. Par exemple, afin d'évaluer la capacité d'isolats de tremblante ovine à franchir

la barrière de transmission bovine, ceux-ci sont inoculés à des souris transgéniques pour le gène *PRNP* bovin, et l'efficacité de transmission de ces isolats est comparée à celle observée avec des isolats d'ESB.

La création de souris transgéniques pour le gène *PRNP* a révolutionné l'étude de la perméabilité des barrières de transmission en permettant notamment d'évaluer le potentiel zoonotique des prions circulant dans les populations d'animaux de rente. Néanmoins, il n'est pas certain que les résultats obtenus avec ces modèles soient totalement extrapolables aux espèces naturellement atteintes par les EST. En effet, même si certains travaux suggèrent que, malgré la surexpression du gène *PRNP*, les animaux transgéniques ont une sensibilité aux EST similaire à celle des hôtes naturels<sup>98, 463</sup>, cette question fait toujours débat<sup>175</sup>. En outre, il ne peut être exclu que des facteurs de l'hôte autres que la séquence de la PrP puissent intervenir dans le phénomène de barrière de transmission. A titre d'exemple, l'inoculation de l'agent de l'ESB à des souris conventionnelles appartenant à deux lignées différentes (C57BL/6 et SJL) mais ayant une séquence PrP identique (*Prnp-a*) a conduit à la propagation de deux souches de prions distinctes<sup>17, 355</sup>.

Par ailleurs, hormis pour les EST iatrogènes, nous ne disposons que de peu d'éléments de comparaison entre les durées d'incubation obtenues expérimentalement chez des animaux transgéniques surexprimant la PrP et celles observées naturellement chez des hôtes tels que l'Homme. Ainsi, même si la surexpression de la PrP permet souvent de réduire le rapport durée d'incubation/durée de vie, rien ne permet d'affirmer qu'un prion incapable de se propager dans un modèle murin transgénique pour le gène *PRNP* humain ne pourrait pas contaminer des populations humaines dont l'espérance de vie moyenne serait supérieure à 80 ans. A l'inverse, il reste difficile d'évaluer quels sont les risques encourus par une population exposée par voie orale à de faibles doses d'un prion capable, comme l'agent responsable de l'ESB-L, de se propager chez des souris transgéniques humaines inoculées par voie intracérébrale<sup>45, 314</sup>.

### 3.5.3 Vers une modélisation *in vitro* ?

Dès le début des années 90, il a été démontré *in vitro* qu'un noyau de PrP<sup>Sc</sup> était capable d'entraîner la conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP anormale tout en conférant ses propriétés biochimiques à cette dernière<sup>310</sup>. Toutefois, il est rapidement apparu que l'efficacité de la

conversion était limitée si PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>Sc</sup> n'étaient pas issues de la même espèce. En effet, à l'instar des observations réalisées à l'aide de modèles animaux conventionnels <sup>299</sup>, la PrP<sup>Sc</sup> provenant de hamsters inoculés avec la souche de tremblante 263K était incapable de convertir de la PrP<sup>c</sup> recombinante murine <sup>311</sup>. Ces résultats ont permis d'envisager que l'efficacité avec laquelle la PrP<sup>Sc</sup> issue d'une espèce A était capable de convertir la PrP<sup>c</sup> d'une espèce B *in vitro* pouvait refléter la « force » de la barrière de transmission entre ces deux espèces. Des expériences ont partiellement validé cette approche en prouvant par exemple que, comparée à la PrP<sup>Sc</sup> extraite d'isolats de MCJ, la PrP anormale issue d'isolats d'ESB, de tremblante et de CWD avait une capacité réduite à convertir la PrP<sup>c</sup> humaine <sup>480, 481</sup>, suggérant l'existence de barrières de transmission susceptibles de limiter la propagation des agents des EST animales dans l'espèce humaine. De la même façon, il a été démontré que, en accord avec ce qui est observé *in vivo*, l'efficacité de conversion de la PrP<sup>c</sup> ovine par de la PrP<sup>Sc</sup> issue d'isolats de tremblante classique est dépendante des polymorphismes de la PrP aux positions 154 et 171 <sup>62</sup>. Néanmoins, les rendements de la méthode de conversion utilisée étant très faibles, y compris lorsque les séquences de la PrP<sup>Sc</sup> et de la PrP<sup>c</sup> sont homologues, des doutes peuvent subsister quant à la fiabilité de ces résultats (risque de faux négatifs).

Plus récemment, le développement de techniques telles que la PMCA <sup>495</sup> ou le QuIC (*Quacking Induced Conversion*) <sup>20, 598</sup> qui permettent de convertir la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> avec des facteurs d'amplification de plusieurs log<sub>10</sub> <sup>115, 117, 231</sup> et dont la sensibilité de détection des prions est au moins équivalente à celle des bio-essais <sup>494, 598</sup> a laissé entrevoir la possibilité de quantifier plus précisément la « force » des barrières de transmission. Il semble que, de manière paradoxale, l'incroyable efficacité de conversion de ces techniques rende cet exercice hasardeux. En effet, à titre d'exemple, alors qu'*in vivo* il existe une forte barrière de transmission entre la souris et le hamster, il est relativement facile de générer par PMCA un prion infectieux pour le hamster en mélangeant de l'homogénat de cerveaux de souris inoculées avec la souche de tremblante RML et de l'homogénat de cerveaux de hamsters sains. Inversement, il est également possible de générer un agent infectieux pour la souris à partir d'homogénat de cerveaux de hamsters inoculés avec la souche 263K et d'homogénat de cerveaux de souris saines <sup>116</sup>. En outre, dans les deux cas, le phénotype du prion généré est différent de celui de toutes les autres souches décrites dans ces deux espèces.

Par ailleurs, il a été rapporté récemment que, lors d'expériences de PMCA, la PrP<sup>Sc</sup> issue d'isolats de tremblante ovine ou murine, d'ESB et de CWD étaient capables de convertir la

PrP<sup>c</sup> de lapin en PrP anormale <sup>122</sup> alors qu'*in vivo*, toutes les tentatives de transmission d'isolats naturels d'EST à cette espèce se sont soldées par des échecs <sup>209</sup>.

#### **3.5.4 Bilan**

Les outils permettant d'estimer la capacité des prions à franchir les barrières de transmission ont formidablement évolué au cours des deux dernières décennies. Les modèles animaux transgéniques pour le gène *PRNP* et les méthodes de conversion *in vitro* sont venus compléter les bio-essais sur hôtes conventionnels. Ces progrès méthodologiques ont dans le même temps souligné avec encore plus d'acuité le peu de compréhension que nous avons des mécanismes moléculaires régissant la réplication et la transmission hétérospécifique des prions, nous laissant souvent incapables de juger de la validité des résultats obtenus dans certains systèmes expérimentaux.

Au-delà de ces limites et de ces interrogations, les animaux transgéniques pour le gène *PRNP* représentent sans nul doute aujourd'hui l'approche la plus pertinente (à conditions d'utiliser des contrôles appropriés) pour évaluer la perméabilité des barrières de transmission et l'impact d'une transmission hétérospécifique sur les caractéristiques d'un prion.



## **OBJECTIFS**



Malgré quatre décennies d'efforts et d'innovations nous ne disposons toujours pas aujourd'hui d'un système cohérent permettant de décrire la diversité biologique des agents des EST et leur capacité à évoluer au gré de leur transmission homo et hétérospécifiques.

L'étude de la diversité des agents des EST s'est pendant longtemps appuyée uniquement sur les données issues des essais de transmission *in vivo* à des hôtes conventionnels (rongeurs et espèces cibles). Au-delà des contraintes matérielles et financières inhérentes à l'utilisation de ces modèles animaux, l'impossibilité de propager certains prions chez les rongeurs conventionnels et l'impact potentiel du franchissement des barrières de transmission sur les caractéristiques biologiques de ces agents (mutation) constituent des écueils majeurs à l'utilisation de cette approche.

Dès le début des années 1990, le développement de méthodes permettant d'établir le phénotype biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> a laissé entrevoir la possibilité d'un typage « haut débit » des agents d'EST circulant sur le terrain, tout en s'affranchissant des limites associées aux bio-essais sur hôtes conventionnels. Toutefois, de nombreux doutes subsistent sur la capacité de la classification des isolats d'EST en fonction des caractéristiques biochimiques de la PrP anormale à refléter de manière pertinente la diversité biologique des prions.

La récente diffusion de lignées murines transgéniques exprimant le gène *PRNP* de nombreuses autres espèces de mammifères permet aujourd'hui de réaliser des bio-essais en abrogeant ou en reproduisant le phénomène de barrière de transmission. Malgré leurs imperfections, ces modèles animaux offrent des opportunités uniques (i) d'évaluer la capacité des prions à franchir les barrières de transmission interspécifique, (ii) d'étudier les conséquences du passage des barrières de transmission sur le phénotype de ces agents et (iii) de vérifier la corrélation entre les données issues du typage biochimique et celles provenant du typage biologique des prions.

Dans ce contexte, les objectifs de notre travail étaient :

- d'évaluer la cohérence d'une classification des prions reposant essentiellement sur les caractères biochimiques de la PrP anormale, au travers de l'étude d'un panel d'isolats de MCJ sporadique et iatrogène

- de caractériser l'évolution du phénotype et des propriétés biologiques de l'agent responsable de l'EST la plus répandue sur le terrain, la tremblante atypique, lors du franchissement de diverses barrières de transmission interspécifique
- d'évaluer, à l'aide de modèles murins transgéniques exprimant différents variants du gène *PRNP* humain, le potentiel zoonotique d'un panel d'isolats de tremblante classique.

## **RESULTATS**



# 1 DIVERSITE DES PRIONS RESPONSABLES DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB ET HETEROGENEITE DES SIGNATURES BIOCHIMIQUES DE LA PrP<sup>res</sup>

## 1.1 Problématique de la diversité des agents de la maladie de MCJ sporadique

Pendant de nombreuses années, les cas de MCJ sporadique ont été classés uniquement sur la base de critères clinico-lésionnels ; de nombreux variants ont ainsi été décrits (*cf.* introduction, 2.5.1). Les observations réalisées chez les animaux ont montré que des souches différentes d'EST pouvaient être différenciées en fonction des signes cliniques qu'elles engendraient<sup>49, 452-454</sup>. Par analogie, il a été suggéré que la variabilité des tableaux cliniques et lésionnels décrits dans les cas de MCJ sporadique pouvait être attribuée à l'implication d'agents distincts<sup>443</sup>.

Toutefois, alors que la MCJ sporadique est facilement transmissible aux primates<sup>208</sup>, les difficultés de transmission à la souris (échecs ou faible efficacité) ont considérablement freiné l'exploration de la diversité des agents responsables de cette EST<sup>85, 209</sup>.

Les techniques de typage biochimique, et l'identification par western blot de deux types de PrP<sup>res</sup> distincts dans l'encéphale des patients atteints ont contribué à l'évaluation de la diversité des isolats. Ces observations ont permis la classification, apparemment cohérente, des cas de MCJ sporadique, basée à la fois sur le type de PrP<sup>res</sup> et sur le génotype *PRNP* au codon 129 des patients (tableau 8).

La classification établie par Parchi et *al.*<sup>445</sup>, permet de fournir une explication pratique aux phénotypes clinico-lésionnels de MCJ sporadique. En effet, il a clairement été démontré que certaines souches de prion peuvent être distinguées en fonction des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup><sup>48</sup>. Dans le cas de la MCJ sporadique, les deux signatures différentes de PrP<sup>res</sup> suggèrent l'implication d'au moins deux agents distincts. La diversité des phénotypes résulterait principalement de l'interaction entre ces agents et des hôtes ayant des séquences PrP différentes (polymorphisme au codon 129 du gène *PRNP*).

Cette hypothèse séduisante, se heurte néanmoins à certaines observations anatomopathologiques et biochimiques.

Au sein d'un même groupe, certains aspects cliniques ou lésionnels (intensité de la perte neuronale, morphologie des dépôts de PrP) peuvent varier de manière importante ; de véritables variants phénotypiques, tels que des cas MM1, VV1 et MV1 avec des plaques amyloïdes, ont même été identifiés<sup>248, 291, 307, 356</sup>.

Sur le plan moléculaire, deux types de PrP<sup>res</sup> supplémentaires ont été identifiés par western blot<sup>133, 577</sup> avec en conséquence une classification alternative des cas de MCJ (cf. introduction, 2.5.1)<sup>258</sup>. Plus récemment, un profil électrophorétique atypique caractérisé par l'absence de bande biglycosylée et associé à une distribution anatomique originale de la PrP<sup>Sc</sup>, a été détecté chez une patiente italienne<sup>619</sup>. Par ailleurs, des observations récurrentes font état de la coexistence des deux types de PrP<sup>res</sup> chez certains patients<sup>166, 445, 465, 476, 504</sup>.

Ces observations soulèvent de sérieuses interrogations sur la pertinence de la classification des cas de MCJ sporadique basée sur la dichotomie phénotypique PrP<sup>res</sup> de type 1/PrP<sup>res</sup> de type 2. La diversité biochimique et biologique des agents responsables de cette EST pourrait être plus complexe.

## **1.2 Les formes iatrogènes de MCJ : une opportunité pour l'étude de la diversité des agents de la MCJ sporadique ?**

Les cas de MCJ iatrogène sont la conséquence de la transmission inter-humaine d'agents de MCJ sporadique, à l'occasion d'actes médicaux (injection d'hormones de croissance) ou chirurgicaux (greffes de cornée ou de dure-mère, pose d'électrodes intracérébrales)<sup>47, 78</sup>. Bien que nous ne disposions ni des génotypes *PRNP* des donneurs, ni des caractéristiques phénotypiques des agents chez ces individus, l'analyse des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> chez les receveurs, par d'autres méthodes que le western blot, pourrait permettre d'évaluer la pertinence de la dichotomie type 1/type 2. Si à chaque type de PrP<sup>res</sup> correspond un agent, les propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> chez les cas de MCJ sporadique et iatrogène de même génotype *PRNP* et porteurs du même type de PrP<sup>res</sup>, devraient être identiques. Dans le cas contraire, la comparaison des signatures biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> issue des isolats de MCJ sporadique et des isolats de MCJ iatrogène pourrait potentiellement révéler des liens



épidémiologiques (donneur/receveur) entre certaines catégories de patients, ce qui permettrait d'étudier l'influence du génotype *PRNP* sur le phénotype de la PrP<sup>Sc</sup> accumulée.

Dans ce contexte, la première partie de notre travail de thèse a été consacrée à l'étude de la diversité intra- et inter-individuelle des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> dans différentes zones de l'encéphale de patients atteints de MCJ sporadique (n=41) ou iatrogène (n=12), dont le génotype *PRNP* était connu et chez lesquels le type de PrP<sup>res</sup> avait été préalablement déterminé par western blot. Pour cela, nous avons utilisé des tests biochimiques évaluant la résistance de la PrP<sup>Sc</sup> à la dégradation par la PK dans différentes conditions.



# Beyond PrP<sup>res</sup> Type 1/Type 2 Dichotomy in Creutzfeldt-Jakob Disease

Emmanuelle Uro-Coste<sup>1,9</sup>, Hervé Cassard<sup>2,9</sup>, Stéphanie Simon<sup>3</sup>, Séverine Lugan<sup>2</sup>, Jean-Marc Bilheude<sup>4</sup>, Armand Perret-Liaudet<sup>5</sup>, James W. Ironside<sup>6</sup>, Stéphane Haik<sup>7,8</sup>, Christelle Basset-Leobon<sup>1</sup>, Caroline Lacroux<sup>2</sup>, Katell Peoch<sup>9</sup>, Nathalie Streichenberger<sup>5</sup>, Jan Langeveld<sup>10</sup>, Mark W. Head<sup>6</sup>, Jacques Grassi<sup>3</sup>, Jean-Jacques Hauw<sup>8</sup>, Francois Schelcher<sup>2</sup>, Marie Bernadette Delisle<sup>1</sup>, Olivier Andréoletti<sup>2\*</sup>

**1** INSERM U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil and Service d'Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie, C.H.U. Rangueil, Toulouse, France, **2** UMR Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)/Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, ENVT, Toulouse, France, **3** Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Service de Pharmacologie et d'Immunologie, DRM, CEA/Saclay, Gif sur Yvette, France, **4** Bio-Rad, Research and Development Department, Marnes-la-Coquette, France, **5** Hôpital Neurologique, Services de Neurochimie et de Pathologie, Bron, France, **6** National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit, Division of Pathology, University of Edinburgh, Western General Hospital, Edinburgh, United Kingdom, **7** INSERM, Equipe Avenir, Maladies à Prions chez l'Homme, Paris, France, **8** Neuropathology Laboratory, Salpêtrière Hospital, AP-HP, Paris, France, **9** Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, Paris (Laboratoire associé au CNR "ATNC") et EA 3621 Faculté de Pharmacie, Paris, France, **10** Central Institute for Animal Disease Control CIDC-Lelystad, Lelystad, The Netherlands

## Abstract

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) cases are currently subclassified according to the methionine/valine polymorphism at codon 129 of the *PRNP* gene and the proteinase K (PK) digested abnormal prion protein (PrP<sup>res</sup>) identified on Western blotting (type 1 or type 2). These biochemically distinct PrP<sup>res</sup> types have been considered to represent potential distinct prion strains. However, since cases of CJD show co-occurrence of type 1 and type 2 PrP<sup>res</sup> in the brain, the basis of this classification system and its relationship to agent strain are under discussion. Different brain areas from 41 sCJD and 12 iatrogenic CJD (iCJD) cases were investigated, using Western blotting for PrP<sup>res</sup> and two other biochemical assays reflecting the behaviour of the disease-associated form of the prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) under variable PK digestion conditions. In 30% of cases, both type 1 and type 2 PrP<sup>res</sup> were identified. Despite this, the other two biochemical assays found that PrP<sup>Sc</sup> from an individual patient demonstrated uniform biochemical properties. Moreover, in sCJD, four distinct biochemical PrP<sup>Sc</sup> subgroups were identified that correlated with the current sCJD clinico-pathological classification. In iCJD, four similar biochemical clusters were observed, but these did not correlate to any particular *PRNP* 129 polymorphism or western blot PrP<sup>res</sup> pattern. The identification of four different PrP<sup>Sc</sup> biochemical subgroups in sCJD and iCJD, irrespective of the *PRNP* polymorphism at codon 129 and the PrP<sup>res</sup> isoform provides an alternative biochemical definition of PrP<sup>Sc</sup> diversity and new insight in the perception of Human TSE agents variability.

**Citation:** Uro-Coste E, Cassard H, Simon S, Lugan S, Bilheude J-M, et al. (2008) Beyond PrP<sup>res</sup> Type 1/Type 2 Dichotomy in Creutzfeldt-Jakob Disease. *PLoS Pathog* 4(3): e1000029. doi:10.1371/journal.ppat.1000029

**Editor:** David Westaway, University of Alberta, Canada

**Received:** September 14, 2007; **Accepted:** January 7, 2008; **Published:** March 14, 2008

**Copyright:** © 2008 Uro-Coste 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 study was financially supported by the "GIS prion" (French Research Ministry) and the Midi-Pyrénées Region.

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

\* E-mail: o.andreoletti@envt.fr

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are neurodegenerative disorders affecting a large spectrum of mammalian species that share similar characteristics, including a long incubation period (which in man may be measured in decades) and a progressive clinical course resulting in death [1].

The most common form of human TSE is an idiopathic disorder named sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD). sCJD is not a uniform disorder in terms of its clinical and neuropathological phenotype. It remains unclear whether this variability is related to variations in the causative TSE agent strains, or to the influence of the methionine/valine polymorphism at codon 129 of the *PRNP* [2,3].

A key event in the pathogenesis of TSE is the conversion of the normal cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>, which is encoded by the

*PRNP* gene) into an abnormal disease-associated isoform (PrP<sup>Sc</sup>) in tissues of infected individuals. Conversion of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup> is a post-translational process involving structural modifications of the protein and resulting in a higher  $\beta$ -sheet content [4]. PrP<sup>C</sup> is completely degraded after controlled digestion with proteinase K (PK) in the presence of detergents. PrP<sup>Sc</sup> is N-terminally truncated under such conditions, resulting in a PK resistant core, termed PrP<sup>res</sup> [5]. PrP<sup>res</sup>, also named PrP 27–30, is a disease marker for TSE and the presence of PrP<sup>Sc</sup> seems to correlate with infectivity [5,6]. According to the prion hypothesis, PrP<sup>Sc</sup> is the infectious agent in TSE [7] and, in the last decades, several lines of evidence have indicated that particular biochemical properties of PrP<sup>Sc</sup>, such as solubility in *N*-lauroylsarcosine, PK resistance and electromobility in western blotting (WB) can be used to distinguish between different prion agents or strains [8,9].

## Author Summary

Prion diseases are transmissible neurodegenerative disorders characterized by accumulation of an abnormal isoform (PrP<sup>Sc</sup>) of a host-encoded protein (PrP<sup>C</sup>) in affected tissues. According to the prion hypothesis, PrP<sup>Sc</sup> alone constitutes the infectious agent. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) is the commonest human prion disease. Although considered as a spontaneous disorder, the clinicopathological phenotype of sCJD is variable and substantially influenced by the methionine/valine polymorphism at codon 129 of the prion protein gene (*PRNP*). Based on these clinicopathological and genetic criteria, a subclassification of sCJD has been proposed. Here, we used two new biochemical assays that identified four distinct biochemical PrP<sup>Sc</sup> subgroups in a cohort of 41 sCJD cases. These subgroups correlate with the current sCJD subclassification and could therefore represent distinct prion strains. Iatrogenic CJD (iCJD) occurs following presumed accidental human-to-human sCJD transmission. Our biochemical investigations on 12 iCJD cases from different countries found the same four subgroups as in sCJD. However, in contrast to the sCJD cases, no particular correlation between the *PRNP* codon 129 polymorphism and biochemical PrP<sup>Sc</sup> phenotype could be established in iCJD cases. This study provides an alternative biochemical definition of PrP<sup>Sc</sup> diversity in human prion diseases and new insights into the perception of agent variability.

In sCJD, two major PrP<sup>res</sup> types have been described by WB: in type 1 PrP<sup>res</sup>, the unglycosylated fragment is 21 kDa, while in type 2, the apparent molecular weight of this unglycosylated fragment is 19 kDa [3]. Protein N-terminal sequencing revealed that type 2 isoform derives from preferential cleavage of the protein during PK digestion at amino acid 97, while in type 1 preferential cleavage occurs at amino acid 82 [10]. sCJD cases can be subclassified according to the PrP<sup>res</sup> isoform and the *PRNP* codon 129 methionine (M)/valine (V) polymorphism, resulting in 6 major subtypes: MM1, MM2, MV1, MV2, VV1 and VV2. Interestingly, these subtypes appear to carry distinct pathological and clinical features, [2,3], and it has been proposed that type 1 and type 2 isoforms in sCJD might correspond to different TSE agent strains. However, the description of PrP<sup>res</sup> isoforms which appear to be distinct from type 1 and type 2, and the increasing number of reports describing the coexistence of type 1 and type 2 PrP<sup>res</sup> in different areas or the same area in the brain from a single sCJD patient, calls into questions the subclassification system described above in sCJD [11–14]. Here, in a large group of cases including 41 sCJD and 12 iCJD patients, we confirmed that type 1 and type 2 PrP<sup>res</sup> can be observed as a mixture in a substantial number of patients. However, using two novel assays described here, PrP<sup>Sc</sup> from these patients with mixed PrP<sup>res</sup> types are homogeneous irrespective of the brain area considered. Moreover, based on these novel PrP<sup>Sc</sup> biochemical properties, four distinct subgroups were observed in our cohort of sCJD patients. Similar findings were observed in iCJD cases from two countries and differing sources of infection.

## Materials and Methods

### Cases Studied

A total of 41 French cases of sCJD, each of which had frozen tissue (2–4 g) available from preferentially 5 brain regions: (occipital, temporal and frontal cortex, cerebellum and the caudate

nucleus), were included in this study. All six currently defined classes of sCJD patients (MM1-MM2-MV1-MV2-VV1-VV2) were represented in our panel (Table 1). Moreover, 12 cases of iatrogenic CJD (iCJD), linked to contamination by growth hormone (GH) or dura mater grafts, from patients originating either from United Kingdom (UK) or France, were also investigated (Table 1). None of the patients had a familial history of prion disease and, in each case, the entire *PRNP* coding sequence was analyzed, either by denaturing gradient gel electrophoresis and/or direct sequencing. All patients died from CJD during the period 1997–2004. Additionally, five cases of Alzheimer's disease were included as non-CJD controls.

In all cases, informed consent for research was obtained and the material used had appropriate ethical approval for use in this project.

### Tissue Homogenate Preparation

For each sample, a 20% brain homogenate (weight/volume) in 5% glucose was prepared using a high-speed homogenizer (TeSeE Pprocess 48 system). The homogenates were then filtered through a 20 Gauge needle before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Western Blot PrP<sup>Sc</sup> Banding Pattern

Various factors have been reported to influence the results of PrP<sup>res</sup> analysis by WB, including tissue pH and the effect of  $\text{Cu}^{2+}$  ions [15–17]. In order to limit these factors, each homogenate was diluted a 100-fold in a single non-CJD control brain homogenate prior to further investigation.

A WB kit (TeSeE WB kit Bio-Rad) was used following the manufacturer's recommendations.

Three different monoclonal PrP-specific antibodies were used for PrP detection: Sha31 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) [18], 8G8 (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) [19] and 12B2 (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) [20], which recognized the amino acid sequences YEDRYRYRE (145–152), SQWKNKPSK (97–104) and WGQGG (89–93) respectively. After incubation with goat anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase, signal was visualized using the ECL western blotting detection system by enhanced chemiluminescent reaction (ECL, Amersham). Molecular weights were determined with a standard protein preparation (MagicMark, Invitrogen).

### PrP<sup>Sc</sup> Resistance ELISA

PrP<sup>Sc</sup> detection was carried out using sandwich ELISA test (TeSeE CJD, Bio-Rad) used following the manufacturer's recommendations. The assay protocol includes a preliminary purification of the PrP<sup>Sc</sup> (TeSeE purification kit) consisting in (i) digestion of PrP<sup>C</sup> with PK, (ii) precipitation of PrP<sup>Sc</sup> by buffer B and centrifugation, (iii) denaturation of PrP<sup>Sc</sup> in buffer C at  $100^{\circ}\text{C}$ , before immuno-enzymatic detection. In this ELISA, the capture antibody 3B5 recognizes the octarepeat region of PrP [19], while the detection antibody 12F10 binds to the core part of the protein [18].

PK resistance of the PrP<sup>Sc</sup> portion recognized in the ELISA test was determined by measurement of the ELISA specific signal recovered from a series of homogenate aliquots digested with different concentrations of PK in buffer A' reagent (TeSeE Sheep/Goat purification kit). Each sample was first diluted in normal brain homogenate (between 100- and 10,000-fold) until obtaining a signal between 1.5 and 2 absorbance units after digestion with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PK. Triplicate of equilibrated samples were then submitted to a PK digestion with concentrations ranging from 50 to 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , before PrP<sup>Sc</sup> precipitation and ELISA detection. Results were expressed as the percentage of residual signal when compared to the 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PK digestion (lowest PK concentration). In each assay, two standardized controls (scrapie and BSE

**Table 1.** Abnormal PrP Properties as Assessed by Western Blot, PK Digestion ELISA and Strain Typing ELISA in 41 French Sporadic CJD Patients and 12 Iatrogenic CJD Patients Originating either from France or the United Kingdom

Codon 129	3F4 Type	Number	Etiology	Sha 31 PrP <sup>res</sup> WB type			Cerebel	Occipt. Cort.	Temp Cort	20% Signal PK Concentration (µg/ml) <sup>b</sup>		Ratio in CEA Strain Typing Test <sup>c</sup>		PrP <sup>Sc</sup> Groups
				Front Cort.	Caud Nucl.					Mean-SD	Min-Max	Mean-SD	Min-Max	
MM	1	n = 11	Sp	1	1	1	1	1	—	> 500	0.20–0.02	0.17–0.23	Group 1	
MM	1	n = 1	Sp	1+2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	
MM	1	n = 1	Sp	1	—	1+2	—	—	—	—	—	—	—	
MV	1	n = 8	Sp	1	1	1	1	1	—	> 500	0.22–0.05	0.18–0.32	Group 1	
VV	2	n = 8	Sp	1	2	2	2	2	171.6–21.4	139–193	1.76–0.2	1.45–2.09	Group 2	
				2	1	2	2	2						
				1+2	1	2	2	2						
				2	2	2	2	2						
				1+2	1+2	2	1+2	1+2						
				2	2	2	2	2						
				2	2	2	2	2						
				1+2	2	1	1+2	2						
MV	2	n = 8	Sp	2	1	2	1+2	2	164.3–13.7	149–187	1.63–0.34	1.23–2.05	Group 2	
				2	2	2	2	2						
				1+2	1	1+2	2	2						
				1+2	1+2	2	2	2						
				2	2	2	2	2						
				2	1+2	1	2	2						
				2	1+2	1	2	2						
				2	1	1+2	2	1+2						
VV	1	n = 1	Sp	1	1	1	1	1	268.3–17.4	249–284	0.58–0.02	0.56–0.60	Group 3	
MM	2	n = 3	Sp	2	2	2	2	2	98.3–12.2	87.4–117.2	3.25–0.35	3.0–3.78	Group 4	
MM	1	n = 2	DM <sup>a</sup>	1	—	—	—	—	—	> 500	—	0.22–0.25	Group 1	
MM	1	n = 3	GH	1	1	1	1	1	282.1–28.6	259–301	0.64–0.06	0.57–0.71	Group 3	
MV	1	n = 2	GH	1	1	—	—	1	276–15.8	263–289	—	0.49–0.62	Group 3	
MV	1	n = 1	GH	1	1	—	—	1	162–4.3	153–176	—	1.28–1.84	Group 2	
MV	2	n = 1	GH <sup>a</sup>	2	1+2	1+2	—	2	174.4–13.3	160–192	—	1.04–1.35	Group 2	
VV	1	n = 1	DM	1	1	1	1	1	111.3–2.4	109–113	—	3.0–4.75	Group 4	
VV	2	n = 2	GH <sup>a</sup>	2	—	—	—	—	—	165–177	—	1.38–1.45	Group 2	

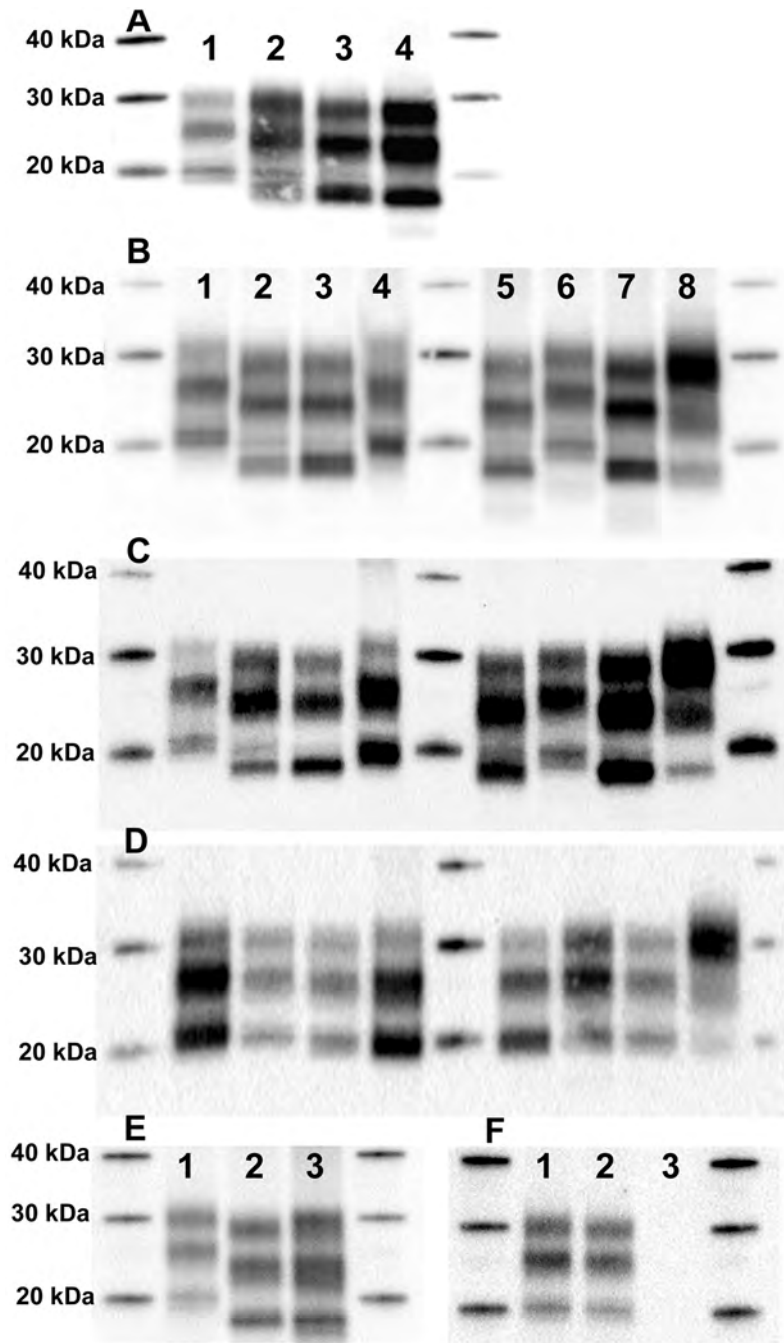
Sp, Sporadic; DM, iatrogenic cases linked to dura mater grafts; GH, iatrogenic cases linked to growth hormone treatment.

<sup>a</sup>Patients originating from the United Kingdom.

<sup>b</sup>Express the PK concentration for which, when increasing PK concentration, the ELISA PrP<sup>Sc</sup> signal reach an arbitrary cut-off value set at 20% of the signal observed with a PK concentration of 50 µg/ml.

<sup>c</sup>Express the ratio of ELISA signal obtained (A/A') after PrP<sup>Sc</sup> PK digestion differential PK digestions in a non-perturbing detergent mixture (A), and a denaturing (SDS) detergent mixture (A').

doi:10.1371/journal.ppat.1000029.t001



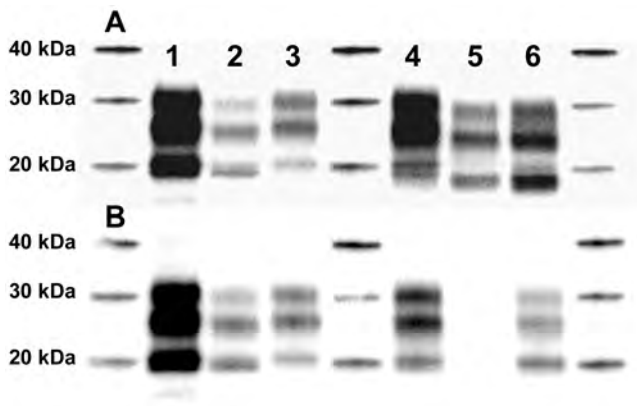
**Figure 1. PrP<sup>res</sup> Profiles in sCJD Patients.** (A) PrP<sup>res</sup> from cerebellum (lane 1), caudate nucleus (lane 2), frontal cortex (lane 3) and occipital cortex (lane 4) of a single MV patient was extracted and submitted to WB. Detection with antibody Sha31 reveals different PrP<sup>res</sup> profiles. (B–D) PrP<sup>res</sup> in cerebellum from seven different patients using Sha31 mAb (B), 8G8 mAb (C), and 12B2 mAb (D). Because of their epitope, Sha31 and 8G8 can detect both type 1 and type 2 PrP<sup>res</sup> while 12B2 detects type 1 only. Lane 1, MM patient; lane 2, MV patient; lane 3, VV patient; lane 4, MV patient; lane 5, MV patient; lane 6, VV patient; lane 7, MM patient; line 8, sheep BSE control. (E, F) PrP<sup>res</sup> profile in temporal cortex from three MV patients revealed by Sha31 mAb (E) or 12B2 mAb (F). doi:10.1371/journal.ppat.1000029.g001

from sheep) were used as an internal standard. About 20% of samples were randomly selected and submitted to two independent tests separated in time as to assess inter-assay variation.

#### “Strain Typing” ELISA

The ELISA test used in this study was adapted from the Bio-Rad TeSeE test, validated at CEA for EU strain typing studies in

ruminants and designed to distinguish BSE in sheep from scrapie. The principle was to measure conformational variations in PrP<sup>Sc</sup> by applying two differential PK digestions under the modification of detergent conditions (SDS sensitivity). For each sample, PK digestion was performed under two conditions: (i) two aliquots of 250  $\mu$ l of 20% homogenate were mixed either with 250  $\mu$ l of A reagent (TeSeE purification kit) containing 20  $\mu$ g of PK, (ii) with 250  $\mu$ l of A' reagent (N-lauroylsarcosine sodium salt 5% (W/V),



**Figure 2. PrP<sup>res</sup> Profiles in iCJD Patients.** PrP<sup>res</sup> (frontal cortex) was revealed in WB by antibodies Sha31 (A) and 12B2 (B). Lane 1, MM UK dura mater patient; lane 2, VV French dura mater patient; lane 3, MM GH French patient; lane 4, French MV GH patient; lane 5, MV UK GH patient; lane 6, VV UK GH patient.  
doi:10.1371/journal.ppat.1000029.g002

sodium dodecyl sulfate 5% (W/V) containing 55 µg of PK. All the tubes were then mixed by inversion 10 times and incubated at 37°C (in a water bath) for exactly 15 min. Subsequently, 250 µl of reagent B (Bio-Rad purification kit)/PMSF (final concentration 4 mM) were added, mixed and the tubes were centrifuged for 5 minutes at 20,000 g at 20°C. Supernatants were discarded and tubes dried by inversion onto an absorbent paper for 5 min. Each pellet was denatured for 5 min at 100°C with 25 µl of C reagent (Bio-Rad purification kit). The samples were diluted in 250 µL of R6 buffer containing 4 mM of serine protease inhibitor AEBSF (4-(2-aminoethyl benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), and, if desired, further serially diluted in R6 buffer. ELISA plates were then incubated for two hours at room temperature and, after three washes, antibody detection (TeSeE CJD, Bio-Rad) was added for two hours at 4°C. The ratio of the absorbance obtained in the two conditions (A/A') was calculated using appropriate dilutions providing absorbance measurements ranging from 0.5 to 2.5 absorbance units in A conditions. For each plate, the same three control samples (one MM1, one VV2 and one MM GH) were included. To avoid inter-assay variations, final results were expressed as a normalized ratio established by dividing the ratio obtained for the analyzed sample by the one obtained for a VV2 sample selected as standard.

## Results

### Intra-Individual Variability of WB Banding Pattern

For each sCJD case, PrP<sup>res</sup> profile was determined from five brain areas using both Sha31 and 8G8 antibodies. A single PrP<sup>res</sup> type (type 1 or type 2) was observed in investigated brain areas of most of the MM1 (n = 11), and all the areas from MV1 (n = 8), VV1 (n = 1) and MM2 (n = 3) sCJD cases of our panel. However, in several cases initially classified as MM1 (n = 2), and in a majority of VV2 (n = 5) or MV2 (n = 6) cases, some brain areas harboured mixed electrophoretic pattern characterized by two distinct bands at 19 and 21 kDa, indicating the coexistence of PrP<sup>res</sup> type 1 and type 2 (Table 1 and Figure 1A). Moreover, in individual patients some brain areas were found to be type 1, while another area could be found to be type 2 (Table 1 and Figure 1A). Since both Sha31 and 8G8 gave similar results this phenomenon cannot be attributed to some antibody peculiarity in PrP recognition (Figure 1B and 1C).

Antibody 12B2 is specific for the amino acid sequence 89–93 that is located N-terminally of the type 2 cleavage site (amino acid 97). In principle, this antibody is unable to recognize type 2 PrP<sup>res</sup>. Systematic western blotting with 12B2 consistently demonstrated the presence of the 21 kDa band, characteristic for type 1 PrP<sup>res</sup>, in nearly all type 2 classified samples, regardless of the PRNP codon 129 polymorphism (Figure 1D). In a limited number of type 2 samples, 12B2 failed to detect a type 1 band (Figure 1E and 1F, lane 2,3).

Using Sha31 or 8G8, mixed type 1/type 2 PrP<sup>res</sup> profiles were observed in several iCJD cases (Figure 2A), regardless of their national origin or mode of infection. In most (but not all) samples initially classified as type 2, the 12B2 antibody revealed the presence of a 21 kDa band, characteristic of type 1 PrP<sup>res</sup> (Figure 2B).

Together these findings point to the existence of variable amounts of type 1 PrP<sup>res</sup> molecules in all or nearly all type 2 classified patients (Table 1).

### All Brain Areas from a Single Patient Have Similar PrP<sup>Sc</sup> Features

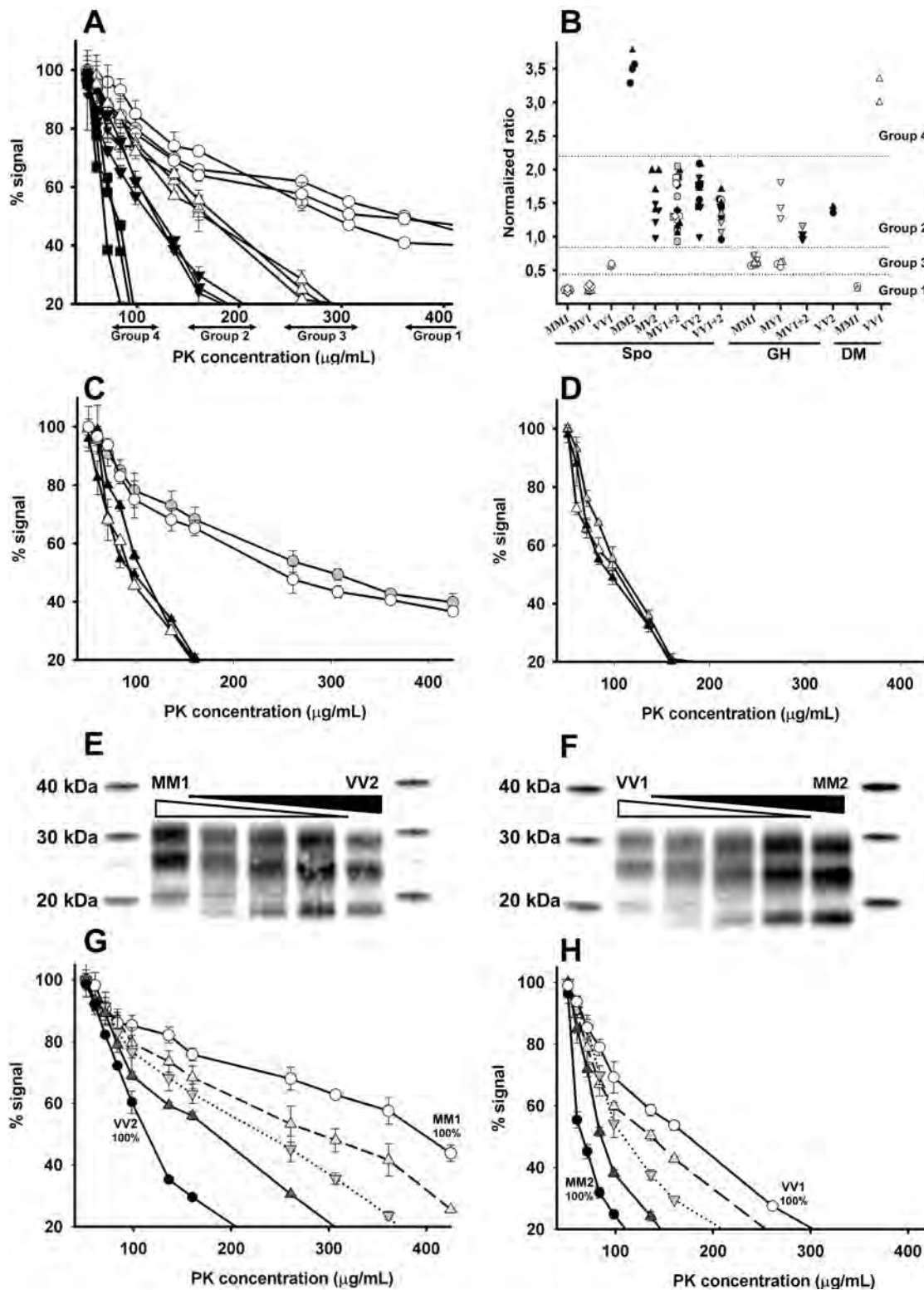
In sCJD and iCJD patients who harboured a single WB PrP<sup>Sc</sup> type in the different brain areas, as assessed by Sha31, a single ELISA PK resistance profile (Table 1 and Figure 3A) and a comparable ratio in strain typing assay (Table 1 and Figure 3B) were observed in all brain areas. Surprisingly, in each patient harbouring both type 1 and 2 PrP<sup>res</sup>, either in the same or in different brain areas, a single ELISA PK digestion profile (Table 1 and Figure 3C and 3D) and a comparable signal ratio in strain typing assay (Table 1 and Figure 3B) was also observed, irrespective of region assayed.

MM1 and VV2 samples but also MM2 and VV1 samples, which harboured similar apparent PrP<sup>Sc</sup> content (as assessed by ELISA) were artificially mixed in different proportions. Using WB, a mixed type 1+2 profile could, or could not, be observed depending on the mixture proportions (Figure 3E and 3F). Both PrP<sup>Sc</sup> resistance ELISA assay (Figure 3G and 3H) and strain typing ELISA (not shown) were able to discriminate the different mixtures from the original isolates and from each other. These results clearly demonstrate that the uniformity of PrP<sup>Sc</sup> biochemical properties, as demonstrated by both PrP<sup>Sc</sup> resistance ELISA and strain typing ELISA, in patients harbouring different PrP<sup>res</sup> isoforms cannot be attributed to a lack of discriminative power of these techniques.

Together, these data strongly indicate that, despite possible variations in PrP<sup>res</sup> type on WB analysis, patients with either sCJD or iCJD appear to harbour a single PrP<sup>Sc</sup> isoform in their brain.

### Four Distinct PrP<sup>Sc</sup> Biochemical Signatures Are Observed in iCJD and sCJD Patients

According to the results from PrP<sup>Sc</sup> PK resistance assay and strain typing ELISAs, sCJD patients could be split into four groups (Table 1, and Figure 3A and 3B). The first group was characterized by a strong PK resistance (Figure 3A) and a low ratio in strain typing assay (Figure 3B). Group 1 could be readily differentiated from Group 2 which showed a higher sensitivity regarding PK digestion, as well as an increased signal ratio in strain typing assay, when compared to Group 1. Two other PrP<sup>Sc</sup> groups were also observed. Group 3 harboured an intermediate PK lability in the PrP<sup>Sc</sup> resistance ELISA and ratio in the strain typing ELISA, when compared to Group 1 and 2. Group 4 had a very high PK-sensitivity and ratio in the strain typing ELISA. No overlapping in PK resistance profile or ratio value in strain typing assay were observed between the four determined groups (Table 1).



**Figure 3. PrP<sup>Sc</sup> PK Resistance and Molecular Strain Variations in sCJD and iCJD Brain Samples.** Each investigated brain sample was initially characterized by WB using antibody Sha31. Symbol patterns represent type 1 in white, type 1+2 in grey and type 2 in black. (A) Results from PK resistance ELISA carried out on three different brain areas (cerebellum, caudate nucleus and temporal cortex) from a MM1 (open circles), a VV1 (open triangles), a VV2 (inverted filled triangle) and a MM2 (filled squares) sCJD patient. Values obtained are expressed as percentage of signal obtained with the lowest PK concentration (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (B) Results from CEA strain typing ELISA (one symbol per patient—3 to 5 different areas by patients). PrP<sup>Sc</sup> signal intensity was measured after PK digestion into two different detergent solutions. Normalized A/A' ratio was calculated for each sample (see Methods section). MM1 and MV1 had a low ratio indicating an absence of alteration of PrP<sup>Sc</sup> PK sensitivity linked to the modification detergent digestion conditions. This ratio was higher in MV2, VV2, MV1+2, and VV1+2, while, in the unique VV1 case, an intermediate ratio was observed. In MM2 patients, the huge ratio indicated a strong increase in PK sensitivity by modification of detergent conditions. (C, D) PK resistance



assay in three areas from a (C) VV (triangles) or MM (circles) patient and in (D) a MV (triangles) patient harbouring distinct PrP<sup>Sc</sup> WB type in their different brain areas. Artificial mixtures of MM2/VV1 or MM1/VV2 samples were prepared. All homogenates were first equilibrated by dilution into negative brain homogenate to obtain an equal PrP<sup>Sc</sup> signal in ELISA. (E, F) Mixtures were then tested by Western Blot (200 µg PK digestion—Sha31 anti PrP antibody). (E) Lane 1: MM1 100%; Lane 2: MM1 75%/VV2 25%; Lane 3: MM1 50%/VV2 50%; Lane 4: MM1 25%/VV2 75%; Lane 5: VV2 100%. (F) Lane 1: VV1 100%; Lane 2: VV1 75%/MM2 25%; Lane 3: VV1 50%/MM2 50%; Lane 4: VV1 25%/MM2 75%; Lane 5: MM2 100%. (G, H) Same mixtures were tested in the PK resistance ELISA assay. (G) VV2 100% (filled circles), VV2 75%/MM1 25% (filled triangles), VV2 50%/MM1 50% (filled inverted triangles), VV2 25%/MM1 75% (open triangles), MM1 100% (open circles). (H) MM2 100% (filled circles), MM2 75%/VV1 25% (filled triangles), MM2 50%/VV1 50% (filled inverted triangles), MM2 25%/VV1 75% (open triangles), VV1 100% (open circles).

doi:10.1371/journal.ppat.1000029.g003

Group 1 was composed of sCJD MM and MV patients, harbouring predominantly type 1 PrP<sup>res</sup> while Group 2 consisted in VV and MV patients harbouring predominantly type 2 or type 1+2 PrP<sup>res</sup>. Groups 3 and 4 were respectively composed with VV1 and MM2 patients from our sCJD panel.

Striking differences were observed in the PrP<sup>Sc</sup> properties between the different iCJD cases and all four groups relying on PrP<sup>Sc</sup> signatures observed in sCJD cases were identified (Table 1, and Figures 3B and 4).

As it might have been expected from sCJD cases observations, Group 1 PrP<sup>Sc</sup> properties was identified in MM1 UK dura mater graft patients (n = 2) (Figure 4A) while Group 2 PrP<sup>Sc</sup> features were observed in UK VV2 (n = 2) (Figure 4D) and MV2 (n = 1) (Figure 4B) GH patients. Surprisingly, a typical Group 2 PrP<sup>Sc</sup> signature was also observed in one out of the three MV1 French GH patients (type 1 in all brain areas). Meanwhile, all investigated MM1 and two out of the three MV1 French GH cases (Figure 4A) harboured identical PrP<sup>Sc</sup> properties than Group 3 sCJD (Figure 4E). Finally, a Group 4 sCJD PrP<sup>Sc</sup> signature (Figure 4F) was observed, using both PrP<sup>Sc</sup> resistance ELISA (Figure 4E) and strain typing ELISA (Figure 3B), in a French dura mater VV1 case (n = 1), which harboured a type 1 PrP<sup>res</sup> WB profile in every investigated area.

Taken together, these observations support the concept that, in iCJD patients, variability in the PrP<sup>Sc</sup> biochemical properties is not related to the route of infection or the *PRNP* codon 129 genotype. It also indirectly suggests that the range of different PrP<sup>Sc</sup> properties observed in iCJD might be related to those in the source of infection (likely to have been a sCJD case).

## Discussion

### Coexistence of Different PrP<sup>res</sup> Types in the Same Subject

In this study, detection, by WB, of the coexistence of two PrP<sup>res</sup> types in about 30% (13/41) of cases is consistent with already published data [12,14]. This observation could suggest the existence in brain from a single patient of different abnormal PrP species. Although two main PK cleavage sites are associated with PrP<sup>res</sup> type 1 and type 2 (respectively amino acid 82 and 97), N-terminal sequencing revealed in all investigated cases the presence of a whole spectrum of overlapping cleavage sites. Moreover in a part of investigated cases this technique demonstrated the presence (i) of variable but consistent level of type 1 PrP<sup>res</sup> in patients classified type 2 using WB and (ii) in some patient classified type 1, of low amount of type 2 PrP<sup>res</sup> [10]. These observations could suggest that, rather than a pure type 1 or type 2 PrP<sup>res</sup>, PK digestion of a PrP<sup>Sc</sup> specific conformer generate variable mixture of PrP<sup>res</sup> fragments (with presence of dominant or sub dominant type 1 or type 2 PrP<sup>res</sup>), which WB usually failed to reveal accurately because its intrinsic technical limits [14]. Antibodies either harbouring higher affinity to PrP (like Sha31) [18] or probing specifically type 1 PrP<sup>res</sup> (like 12B2) [20], now allow a better perception of such mixture. However, investigations

carried out using artificial mixture of type 1 and type 2 brain homogenate, even using high affinity anti-PrP antibodies, clearly indicate the current limits of WB discriminative power [14]. Together, these data suggest that WB analysis of PrP<sup>res</sup> on its own could be misleading for adequate discrimination between PrP<sup>Sc</sup> variants in CJD.

Both PrP<sup>Sc</sup> PK resistance ELISA and strain typing ELISA are based on the characterization the N terminal part of the PrP<sup>Sc</sup> PK digestion either by increasing PK amount or modifying detergent conditions. While WB profile could be compared to a snapshot picture of PrP<sup>res</sup> fragments generated by PK digestion process, these assays reflect the dynamics of the PK cleavage rather than its final result (different forms of PrP<sup>res</sup>). Consequently they could provide different but also more accurate perception of the PrP<sup>Sc</sup> conformers.

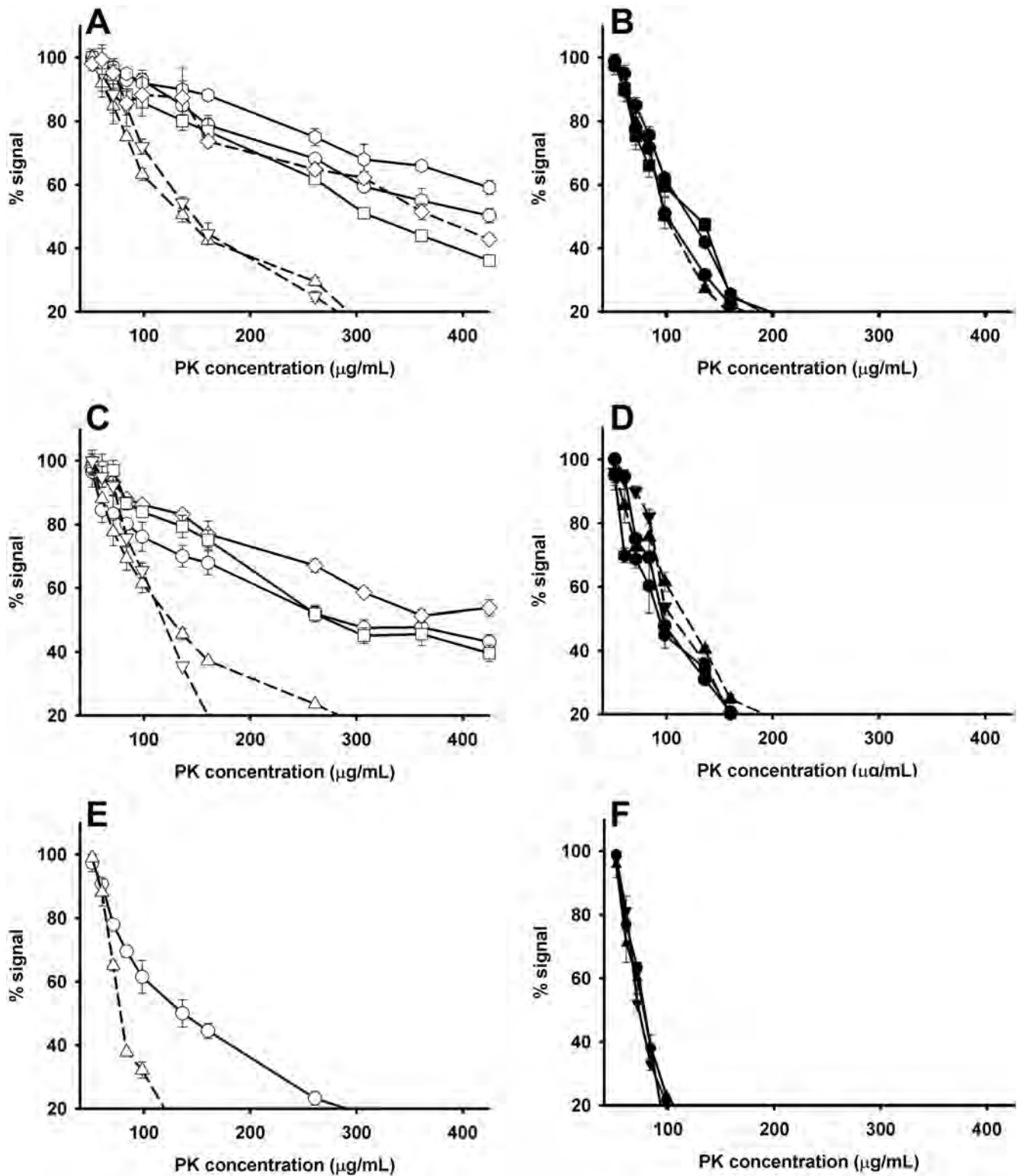
Our findings from the PrP<sup>Sc</sup> capture immunoassays clearly indicate that in a single patient, irrespective of brain area, sCJD associated PrP<sup>Sc</sup> displays uniform biochemical properties, regardless of the regional variation of type 1 and type 2 isoforms determined by WB. Such findings support the idea of the presence of a specific TSE agent in each brain and the accumulation of a single associated PrP<sup>Sc</sup> conformer.

### sCJD Classification

Because the limited size of our cohort of cases, an in depth comparison between the PrP<sup>Sc</sup> signature (as established in this study) and the Parchi classification system is not possible.

However, despite this limitation, two major groups were identified in our panel according to the PrP<sup>Sc</sup> properties. The first major group was constituted with patients harbouring a highly PK resistant PrP<sup>Sc</sup> (MM1 and MV1 patients). The second group included patients harboring a PK labile PrP<sup>Sc</sup> (VV2 and MV2 patients). Using both lesion profile and clinical parameters [2], two major forms of sCJD are commonly recognized. The first sCJD form, named “classical”, is characterized by a “rapid evolution” (usually around 4 months), and affects most of the MM1 and MV1 patients. The second sCJD form, named “atypical”, affects VV2 and MV2 with a longer symptomatic evolution (usually longer than 6 months) and a late dementia. Despite inter-individual variations, sCJD Groups 1 and 2, as we defined them on biochemical criteria were consistent with this classification.

Both VV1 and MM2 sCJD cases are extremely rare; they respectively represent 1% and 4% of the identified sCJD cases. According to the literature, these patients have clinical features and lesion profiles that are very different from other sCJD patients [2]. However, in our study as in previously published studies, WB did not identify any distinct biochemical difference from other type 1 and type 2 cases. In contrast, both the strain typing ELISA and PrP<sup>Sc</sup> resistance assays clearly differentiated these cases from Group 1 and Group 2 cases. This finding, which is consistent with clinico/pathological observations carried out in patients, could indicate that there are indeed differences in PrP<sup>Sc</sup> that distinguish these VV1 and MM2 cases from other sCJD groups.



**Figure 4. PK Resistance ELISA in Frontal Cortex from sCJD and French or UK iCJD (Growth Hormone and Dura Mater Cases).** sCJD (solid line) and iCJD (dashed line) frontal cortex samples were investigated by PK resistance assay. (A) MM1 sCJD cases (open circles, hexagons and squares), MM1 iCJD UK dura mater cases (open diamonds, open triangles). (B) MV2 sCJD cases (filled circles, hexagons and squares) and MV2 UK GH case (filled triangles). (C) MV1 sCJD (open circles, diamonds and squares) and MV1 French GH (open triangles) cases. (D) VV2 sCJD (filled circles and hexagons) and VV2 UK GH (filled triangles) cases. (E) VV1 sCJD case (open circles) and VV1 dura mater French case (open triangles). (F) MM2 sCJD cases (filled circles and triangles).  
doi:10.1371/journal.ppat.1000029.g004

## Prion Strains and PrP<sup>Sc</sup> Phenotype

Although prion strains can only be identified definitively by bioassay, molecular *in vitro* tools to characterize PrP<sup>Sc</sup> are more and more widely used for the rapid identification of particular agents, such as BSE in cattle, sheep, rodent and humans (vCJD) [20,21]. This has come to be termed “molecular strain typing” and although widely employed, the exact relationship between PrP<sup>Sc</sup> biochemistry and the biological properties of the agents responsible remain to be determined. In sCJD, the presence of four distinct PrP<sup>Sc</sup> biochemical forms apparently correlated to clinico-pathological phenotypes as defined by Parchi et al. [2] could be an indication of the involvement of different TSE agents.

iCJD cases are a consequence of accidental human to human TSE transmission, most likely representing transmission of sCJD. The identification in iCJD cases of the four PrP<sup>Sc</sup> signatures identified in sCJD is consistent with the existence of distinct prions associated with these biochemical forms.

Three examples of human-to-human transmission of variant CJD through blood transfusion have now been identified. While all blood donors were MM at codon 129 *PRNP*, the recipients had either a MM (n=2) or a MV genotype (n=1). Despite this genotype difference there appears to have been conservation of the disease phenotype and PrP<sup>res</sup> type in all “secondary” vCJD cases [22–25]. These observations could suggest that in case of inter-human transmission, difference in donor/recipient genotype could result in un-altered abnormal PrP signature.

Our identification of MM GH iCJD cases harbouring similar PrP<sup>Sc</sup> signature as a VV1 sCJD case or of a VV *dura mater* iCJD case similar to MM2 sCJD might indicate preservation of a specific PrP<sup>Sc</sup> biochemical signature after human to human transmission between individuals of different codon 129 genotypes.

Treatment with extracts of GH contaminated by CJD has led to a high number of iCJD cases in France and the UK. The codon 129 genotypes of the affected individuals in the two countries differ, with the French cohort predominantly MM and MV and the British cohort MV and VV [26]. In the absence of any clear explanation for this finding, it was suggested that it might be due to contamination of different batches of GH with different prion strains from individuals of differing *PRNP* codon 129 genotypes. Our identification of different biochemical forms of PrP<sup>Sc</sup> in GH French patients and in UK patients is consistent with this hypothesis. The variability observed within the French GH cases could signify involvement of different prion strains, consistent with multiple contaminated GH batches in the French epidemic.

## Conclusion

The identification in this study of different PrP<sup>Sc</sup> species in CJD patients with the same *PRNP* polymorphism at codon 129 and WB PrP<sup>res</sup> profile offers a new perspective on our understanding of the relationship between PrP biochemistry, prion disease phenotype and agent strain. We highlight two novel approaches to analysing PrP<sup>Sc</sup> in sCJD and iCJD and offer evidence that these analyses provide potentially-strain associated information, which appears to be lacking from the conventional WB assay.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EU HC JG FS OA. Performed the experiments: EU HC SS SL CB CL KP NS OA. Analyzed the data: EU HC SS SL JB AP JI CB CL KP JL MH FS OA. Contributed reagents/materials/analysis tools: EU HC SS JB AP JI SH KP NS JL MH JG JH MD OA. Wrote the paper: EU HC SS JB JI KP JL MH JG FS OA.

## References

- Fraser H (1976) The pathology of a natural and experimental scrapie. *Front Biol* 44: 267–305.
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, et al. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46: 224–233.
- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, et al. (1996) Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 39: 767–778.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, 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.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35: 57–62.
- Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B (2001) Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 75: 10106–10112.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136–144.
- Bessen RA, Marsh RF (1992) Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66: 2096–2101.
- Bessen RA, Marsh RF (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68: 7859–7868.
- Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, et al. (2000) Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10168–10172.
- Dickson DW, Brown P (1999) Multiple prion types in the same brain: Is a molecular diagnosis of CJD possible? *Neurology* 53: 1903–1904.
- Puoti G, Giaccone G, Rossi G, Canciani B, Bugiani O, et al. (1999) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Co-occurrence of different types of PrP(Sc) in the same brain. *Neurology* 53: 2173–2176.
- Schoch G, Seeger H, Bogousslavsky J, Tolnay M, Janzer RC, et al. (2006) Analysis of prion strains by PrPSc profiling in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Med* 3: e14.
- Polymenidou M, Stoeck K, Glatzel M, Vey M, Bellon A, et al. (2005) Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol* 4: 805–814.
- Notari S, Capellari S, Giese A, Westner I, Baruzzi A, et al. (2004) Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by protease digestion: Implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem* 279: 16797–16804.
- Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, et al. (1999) Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol* 1: 55–59.
- Zanusso G, Farinazzo A, Fiorini M, Gelati M, Castagna A, et al. (2001) pH-dependent prion protein conformation in classical Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 276: 40377–40380.
- 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.
- Krasemann S, Groschup MH, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W (1996) Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice. *Mol Med* 2: 725–734.
- Langeveld JP, Jacobs JG, Erkens JH, Bossers A, van Zijderveld FG, et al. (2006) Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res* 2: 19.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* 383: 685–690.
- Hewitt P (2006) vCJD and blood transfusion in the United Kingdom. *Transfus Clin Biol* 13: 312–316.
- Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG (2006) Three reported cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission following transfusion of labile blood components. *Vox Sang* 91: 348.
- Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG (2006) Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 91: 221–230.
- Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, et al. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417–421.
- Brandel JP, Preece M, Brown P, Croes E, Laplanche JL, et al. (2003) Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK. *Lancet* 362: 128–130.



## **2 FRANCHISSEMENT DES BARRIERES DE TRANSMISSION INTERSPECIFIQUES PAR LES PRIONS RESPONSABLES DE TREMBLANTE ET CONSEQUENCES SUR LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES**

La synthèse des données issues du typage biochimique dans les espèces ovine et caprine et des bio-essais réalisés chez des rongeurs conventionnels et transgéniques pour le gène *PRNP* ovin suggère que plusieurs agents distincts responsables de la tremblante classique et atypique sont présents dans les élevages (*cf.* introduction, 2.3.1 et 2.5.3).

Suite à l'épidémie d'ESB, l'interdiction de l'utilisation des farines de viande et d'os (FVO) dans l'alimentation des bovins (1990), des petits ruminants (1994) et enfin de toutes les espèces dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine (2000) a permis de maîtriser les risques de transmission interspécifique des prions d'origine animale. Cependant, la tremblante étant présente dans les cheptels ovins et caprins depuis plusieurs dizaines (forme atypique)<sup>88,582</sup> voire plusieurs centaines d'années (forme classique), les populations d'animaux d'élevage ont probablement été exposées aux agents responsables de ces maladies avant la mise en place de ces mesures restrictives.

Actuellement, deux types de mesures sont prises pour réduire les risques d'entrée des agents des EST animales dans la chaîne alimentaire humaine : (i) la détection des individus et des troupeaux infectés, soit par l'identification de cas cliniques (surveillance passive) soit grâce à l'utilisation de tests biochimiques de détection de la PrP<sup>Sc</sup> dans l'obex des animaux abattus (surveillance active) et (ii) le retrait systématique des tissus susceptibles d'être infectieux (« matériels à risque spécifié » ou MRS). Toutefois, le dépistage des EST n'est réalisé que sur un nombre restreint de petits ruminants et le retrait des MRS ne permet pas de garantir l'absence totale d'infectiosité des carcasses des animaux infectés par la tremblante classique ou atypique<sup>174</sup>. Il est donc probable que les populations humaines aient été et soient encore exposées aux agents responsables ces maladies.

Bien que les systèmes d'épidémiologie passive des maladies animales et humaines aient permis par le passé de détecter l'apparition de l'ESB puis du vMCJ, la diffusion large et soudaine de ces EST a vraisemblablement été un des facteurs majeurs ayant contribué à leur identification rapide. Des doutes subsistent sur la capacité de tels systèmes à détecter une

transmission interspécifique ponctuelle des prions. Face à ces incertitudes, il apparaît donc crucial d'évaluer expérimentalement les risques liés à l'exposition des populations humaines et animales aux prions présents en élevage afin de permettre la mise en place de mesures sanitaires préventives rationnelles.

Dans ce contexte, et à l'aide de modèles murins transgéniques, la deuxième partie de notre travail a consisté à évaluer :

- la capacité de l'agent de la tremblante atypique à franchir les barrières de transmission porcine et bovine
- la capacité d'isolats de tremblante classique à franchir la barrière de transmission humaine
- les conséquences du franchissement de ces barrières de transmission sur les propriétés biologiques et biochimiques de ces agents.

# Transgenic Mice Expressing Porcine Prion Protein Resistant to Classical Scrapie but Susceptible to Sheep Bovine Spongiform Encephalopathy and Atypical Scrapie

Juan-Carlos Espinosa,<sup>1</sup> María-Eugenia Herva,<sup>1</sup> Olivier Andréoletti, Danielle Padilla, Caroline Lacroux, Hervé Cassard, Isabelle Lantier, Joaquin Castilla, and Juan-María Torres

How susceptible pigs are to infection with sheep prions is unknown. We show, through transmission experiments in transgenic mice expressing porcine prion protein (PrP), that the susceptibility of this mouse model to bovine spongiform encephalopathy (BSE) can be enhanced after its passage in ARQ sheep, indicating that the pathogenicity of the BSE agent is modified after passage in sheep. Transgenic mice expressing porcine PrP were, nevertheless, completely resistant to infection with a broad panel of classical scrapie isolates from different sheep PrP genotypes and with different biochemical characteristics. The atypical (Nor98 like) isolate (SC-PS152) was the only scrapie isolate capable of transmission in these mice, although with a marked transmission barrier. Unexpectedly, the atypical scrapie agent appeared to undergo a strain phenotype shift upon transmission to porcine-PrP transgenic mice and acquired new strain properties, suggesting that atypical scrapie agent may exhibit different phenotypes depending on the host cellular PrP or other genetic factors.

**T**ransmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are infectious diseases that affect humans and several livestock species, causing fatal neurodegeneration. TSEs are

linked to the conversion of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) to the aberrant form associated with the disease (PrP<sup>Sc</sup>). Sheep scrapie, the most widely known TSE (1), has been documented in Europe for >2 centuries and is thought to have spread to other countries worldwide throughout the 1900s (2). Classical scrapie is caused by a variety of prion strains that can be distinguished by their biological and biochemical features (3), although several so-called atypical scrapie strains that have remarkably different biochemical and transmission characteristics have been recently described (4,5). Other TSEs include bovine spongiform encephalopathy (BSE), which reached epidemic proportions in Europe at the end of the past century due to the use of animal feed containing BSE-contaminated feedstuffs (6). A human variant of BSE, called variant Creutzfeldt-Jacob disease (vCJD) (7), was discovered in 1994 and reported in 1996 as linked to the BSE epidemic in the United Kingdom and elsewhere.

No reports exist of naturally occurring TSEs in pigs. However, the experimental inoculation of pigs and transgenic mice overexpressing porcine PrP has indicated that swine are susceptible to BSE infection by the parenteral route, although with a considerable transmission barrier (8,9). The oral transmission of BSE in pigs has not been demonstrated to date.

The potential spread of BSE to animals in the human food chain such as sheep, goats, and pigs needs assessing because a risk for human infection by animals other than BSE-infected cattle cannot be excluded. Moreover,

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

Author affiliations: Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid, Spain (J.-C. Espinosa, M.-E. Herva, D. Padilla, J. Castilla, J.-M. Torres); École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France (O. Andréoletti, C. Lacroux, H. Cassard); and Centre Institut National de la Recherche Agronomique de Tours, Nouzilly, France (I. Lantier)

DOI: 10.3201/eid1508.081218

the use of pigs as graft donors could cause concern, given a recent report of vCJD in the recipient of a porcine dura mater graft (10).

The transmission barrier limits TSE infection between different species. Sheep can be experimentally infected with BSE that is not easily distinguished from some scrapie strains showing a 19-kDa atypical proteinase K-resistant PrP (PrP<sup>res</sup>) unglycosylated band (11–13). Susceptibility and resistance to TSE infection in sheep is determined by polymorphisms at PrP amino acid positions 136, 154, and 171; sheep have the VRQ and ARQ alleles that are most susceptible to scrapie infection (14). Although ARQ is considered to show the highest susceptibility to BSE infection (15), the ARR allele was until recently thought to confer full resistance to BSE and scrapie (16,17). However, the successful transmission of BSE prions to ARR/ARR sheep (18) and the detection of natural cases of classical scrapie in sheep with the ARR/ARR genotype (19) have shown that this resistance is penetrable. Moreover, the identification of previously unrecognized atypical scrapie strains in sheep with various genotypes, including ARR/ARR, further supports this statement (20,21).

Although only 1 case of BSE in a goat has been confirmed, several putative field cases of BSE infection affecting goats and sheep have been detected in Europe, and the infectious properties of the resulting TSEs are not well known (22,23). In addition, a rise in scrapie outbreaks among flocks in Europe has been described; it is possible that some cases of alleged sheep scrapie could be ovine BSE. In a previous report, we demonstrated that BSE experimentally passaged in homozygous ARQ sheep showed enhanced infectivity (compared with cattle BSE) as determined in transgenic mice expressing bovine PrP protein (24).

Previous experiments showed that transgenic mice expressing porcine PrP (PoPrP-Tg001) can be infected with cattle BSE, but that infection is limited by a strong barrier (8): only some BSE inocula were able to infect PoPrP-Tg001 mice in primary transmission experiments, and when transmission occurred only a reduced percentage of the inoculated mice were affected. In the present study, we used the PoPrP-Tg001 mouse model to compare the porcine PrP transmission barrier to BSE infection before and after passage in sheep. In parallel, we also analyzed the susceptibility of PoPrP-Tg001 mice to a broad panel of scrapie isolates from different ovine PrP genotypes and with different biochemical characteristics.

## Materials and Methods

### Transgenic Mice

The PoPrP-Tg001 mouse line was generated and characterized as previously described (8). These mice express

porcine PrP protein under the control of the murine PrP promoter in a murine PrP0/0 background. The animals express  $\approx 4\times$  the level of porcine PrP in the brain compared with the levels expressed in pig brains.

### TSE Isolates

#### Cattle BSE

Three isolates of different origins were used: cattle-BSE1, a pool of material from 49 BSE-infected cattle brains (TSE/08/59) supplied by the Veterinary Laboratory Agency (New Haw, Addlestone, Surrey, UK); cattle-BSE2, material obtained from the brainstem of 1 cow naturally infected with BSE supplied by the same agency (RQ 225:PG1199/00); and cattle-BSE0, an isolate obtained from the brainstem of 1 cow naturally infected with BSE (case 139) supplied by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (Nouzilly, France).

#### Sheep BSE0

Sheep BSE0 came from a pool of brainstems from 7 ARQ/ARQ sheep experimentally infected by intracerebral inoculation with the same cattle-BSE0 described above. That work was part of the project “BSE in sheep” QLRT-2001-01309 (INRA, Nouzilly, France).

#### Sheep Scrapie Isolates

Eight scrapie isolates of different origins and biochemical characteristics obtained from sheep with different PrP genotypes were also used in this study. These isolates were SC-UCD-99, obtained from the brainstem of an Irish ARQ/ARQ sheep naturally infected with scrapie (provided by the Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Ireland); SC-Langlade, obtained from the brainstem of an ARQ/ARQ sheep from France naturally infected with scrapie (provided by INRA, Toulouse, France); SC-N662-97, obtained from the brainstem of an ARQ/ARQ sheep from Spain naturally infected with scrapie; SC-JR01, obtained from the brainstem of an infected VRQ/VRQ sheep provided by J. Requena (Santiago de Compostela University, Santiago de Compostela, Spain); SC-PS13, obtained from the brainstem of an ARQ/ARQ sheep from France naturally infected with scrapie (provided by INRA, Toulouse); SC-PS48, obtained from the brainstem of a VRQ/VRQ sheep from France naturally infected with scrapie (provided by INRA, Toulouse); SC-PS83, obtained from the brainstem of a ARR/ARR sheep from France naturally infected with scrapie (provided by INRA, Toulouse [19]); and SC-PS152, obtained from the brainstem of a AfRQ/AfRQ sheep from France naturally infected with atypical (Nor98-like) scrapie (provided by INRA, Toulouse).

SC-UCD/99 adapted to BoPrP-Tg110 was obtained after 2 subpassages of the SC-UCD-99 isolate in BoPrP-



Tg110 mice expressing bovine PrP (24). For subpassages, equivalent amounts of brain homogenates from all PoPrP-Tg001 mice collected from primary passage were pooled and used as inocula. Brainstem from healthy homozygous ARQ sheep was inoculated in PoPrP-Tg001 mice as a negative control.

All inocula were prepared in sterile 5% glucose as 10% homogenates. To minimize the risk for bacterial infection, we preheated inocula for 10 min at 70°C before inoculation.

### Transmission Studies

Groups of 12–20 mice (6–7 weeks of age) were housed according to the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioural Research on Animals (Directive 86/609EC). Mice were inoculated in the right parietal lobe by using a disposable 25-gauge hypodermic needle. Twenty microliters of 10% brain homogenate, containing similar amounts of PrP<sup>res</sup> (as estimated by Western blot), was delivered to each animal.

The neurologic status of the inoculated mice was assessed twice a week. The presence of 3 of 10 signs of neurologic dysfunction established diagnostic criteria (25) was needed to score a mouse positive for prion disease. The animals were killed for ethical reasons when progression of the disease was evident or when considered necessary due to old age (650 days), and their brains were harvested for subsequent biochemical and histologic analysis.

### PrP<sup>res</sup> Assay

Frozen brain tissue samples from mice were homogenized in 5% glucose in distilled water by using grinding tubes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and adjusted to 10% (wt/vol) with TeSeE Precess 48 Ribolyser OGER (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Brain samples were analyzed by using the TeSeE Western Blot 355 1169 kit (Bio-Rad) but with some adjustments for the different amount of sample used. To arrive at the volume proposed in the manufacturer's recommendations, 100  $\mu$ L of the 10% brain homogenates to be tested was supplemented with 100  $\mu$ L of 10% brain homogenate from PrP null mice (26). Processed samples were loaded on Criterion 12% acrylamide gels (165.6001; Bio-Rad) and electrotransferred to immobilon membranes (IPVH 000 10; Millipore, Billerica, MA, USA). For the immunoblotting experiments, Sha31 (27) and 12B2 (28) monoclonal antibodies (MAbs) were used at concentrations of 1  $\mu$ g/mL. Immunocomplexes were detected by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

### Lesion Profiles and Paraffin-embedded Tissue Blots

All procedures involving mouse brains were performed as previously described (29). Briefly, samples were fixed in neutral-buffered 10% formalin (4% formaldehyde) before paraffin embedding. Once deparaffinated, 2  $\mu$ m-thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Lesion profiles were established according to the standard method described by Fraser and Dickinson (30). For paraffin-embedded tissue (PET) blots, the protocol described by Andréoletti et al. (31) was used.

### Results

#### Biochemical Properties of TSE Isolates

Samples of each TSE isolate were processed and analyzed by Western blotting. As shown in Figure 1, PrP<sup>res</sup> in sheep BSE showed the characteristic unglycosylated band of 19 kDa (32); when compared with the original cattle BSE0 isolate, only slight differences could be observed in terms of the electrophoretic mobility of the PrP<sup>res</sup>, probably due to PrP amino acid sequence differences. ARQ/ARQ isolates SC-UCD/99, SC-Langlade, and SC-662/97 showed a PrP<sup>res</sup> unglycosylated band of 21 kDa, and isolate SC-PS13 from the same sheep PrP genotype showed a smaller band of 20 kDa. The SC-JR01 and SC-PS48 isolates from a VRQ/VRQ sheep showed unglycosylated bands of 21 kDa and 19 kDa, respectively. An unglycosylated band of 21 kDa was detected in the ARR/ARR SC-PS83 isolate. Finally, the SC-PS152 isolate, whose genotype is widely associated with Nor98 cases (33,34), showed the characteristic band pattern of the atypical (Nor98-like) scrapies (4,35).

All scrapie isolates showing a 20–21-kDa unglycosylated band and the atypical SC-PS152 isolate were recognized by the Sha31 antibody (Figure 1, panel A) and the 12B2 antibody (Figure 1, panel B), which probe

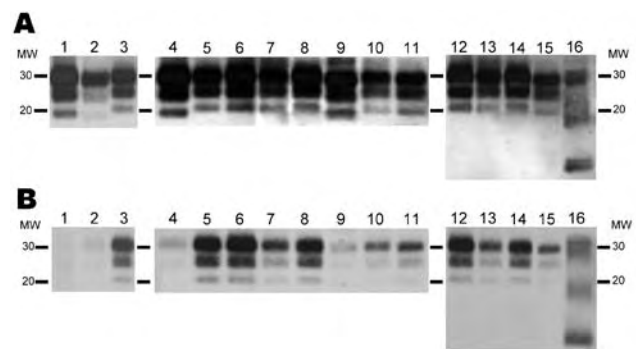


Figure 1. Electrophoretic profiles and antibody labeling of atypical proteinase K-resistant prion protein (PrP<sup>res</sup>) detected with monoclonal antibodies Sha31 (A) and 12B2 (B) in different isolates used for inoculating porcine PrP transgenic mice. Panels A and B were loaded with the same quantities of extracted PrP<sup>res</sup> from each sample. MW, molecular mass in kilodaltons.

the WGQGG epitope (amino acids 93–97 of sheep PrP). However, SC-PS48 and sheep-BSE (showing a 19-kDa unglycosylated band) were poorly recognized by 12B2 MAb (Figure 1, panel B), suggesting that the 12B2 epitope is not protected against digestion with proteinase K in these isolates, as in cattle BSE.

### Susceptibility of PoPrP-Tg001 Mice to TSE Isolates

To evaluate the susceptibility of PoPrP-Tg001 mice to ARQ sheep BSE as opposed to the original cattle BSE, the BSE agent was inoculated in parallel before and after passage in ARQ/ARQ sheep in these mice. As shown in the Table, all PoPrP-Tg001 mice survived the cattle BSE0 infection and were culled without clinical signs at 650 days postinoculation (dpi), but when assessed for the presence of PrP<sup>res</sup> in the brain, 3 (19%) were positive. In the second passage, all mice died at  $197 \pm 4$  dpi. Similar results were obtained when 2 other BSE inocula (cattle BSE1 and cattle BSE2) were used (Table). In contrast, in PoPrP-Tg001 mice inoculated with BSE passaged in ARQ sheep (sheep BSE), an attack rate of 100% and survival time of  $458 \pm 11$  dpi were observed, indicating that the PoPrP-Tg001 mice were fully susceptible to sheep BSE. Secondary subpassage in these mice led to a considerable reduction in the survival time ( $162 \pm 4$  dpi), which was maintained in subsequent subpassages. These results suggest the increased infectivity of BSE after passage in sheep in the PoPrP-Tg001 mouse model.

To evaluate the susceptibility of PoPrP-Tg001 mice to other sheep TSEs, we inoculated these mice with a panel of sheep scrapie isolates from different genotypes and with different strain properties. As shown in the Table, the atypical scrapie SC-PS152 isolate was the only one able to infect PoPrP-Tg001 mice at a low attack rate (16%) and survival

time of 300 to 600 dpi. Secondary passage rendered a 100% attack rate and survival time of  $162 \pm 13$  dpi. The other scrapie isolates included in the panel were not transmitted in the PoPrP-Tg001 mice either in primary or subsequent passages. We verified that the infectivity of the different scrapie isolate used in this work was sufficiently high for efficient transmission in transgenic mice expressing ovine PrP (data not shown).

PoPrP-Tg001 mice inoculated with healthy homozygous ARQ sheep brain material as controls were also euthanized after 600 dpi without showing clinical signs after first and second passages. None were positive for PrP<sup>res</sup> in their brains.

### Biochemical Characterization of PrP<sup>res</sup> in Inoculated PoPrP-Tg001 Mice

PrP<sup>res</sup> from BSE adapted to porcine PrP in PoPrP-Tg001 mice showed a different glycoprofile than the original inoculated BSE (Figure 2, panel C), although it preserved biochemical properties such as electrophoretic mobility (Figure 2, panel A) and lack of immunoreactivity to the 12B2 MAb (Figure 2, panel B). The 12B2 MAb is able to recognize porcine PrP<sup>C</sup> as confirmed by Western blotting when samples not treated with proteinase K are used (data not shown).

In PoPrP-Tg001 mice, cattle BSE and sheep BSE agents produced identical PrP<sup>res</sup> signatures and shared similar PrP<sup>res</sup> biochemical properties (Figure 2, panel A). These features persisted after subsequent passages (data not shown).

In contrast, Western blot analysis of the porcine prion generated through the inoculation of atypical scrapie isolate (SC-PS152) showed a dramatic molecular shift after

Table. Transmission of cattle BSE, sheep BSE, and sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing porcine prion protein\*

TSE isolate	Genotype	PrP <sup>res</sup> , kDa	First passage		Second passage		Third passage	
			Survival time, dpi	% (Attack rate)	Survival time, dpi	% (Attack rate)	Survival time, dpi	% (Attack rate)
Cattle-BSE1	–	19	>650	0 (0/12)†	269 ± 3	100 (10/10)	204 ± 12	100 (9/9)
Cattle-BSE2	–	19	498 ± 9	17 (2/12)†	198 ± 6	100 (15/15)	193 ± 17	100 (6/6)
Cattle-BSE0	–	19	>650	19 (3/16)†	197 ± 4	100 (12/12)	190 ± 10	100 (7/7)
Sheep-BSE0	ARQ/ARQ	19	458 ± 11	100 (15/15)	162 ± 4	100 (13/13)	166 ± 7	100 (7/7)
SC-662/97	ARQ/ARQ	21	>650	0 (0/10)	>650	0 (0/12)	ND	ND
SC-UCD/99	ARQ/ARQ	21	>650	0 (0/12)	>650	0 (0/9)	ND	ND
SC-Langlade	ARQ/ARQ	21	>650	0 (0/12)	>650	0 (0/12)	ND	ND
SC-PS13	ARQ/ARQ	20	>650	0 (0/12)	>650	0 (0/12)	ND	ND
SC-JR01	VRQ/VRQ	21	>650	0 (0/12)	>650	0 (0/12)	ND	ND
SC-PS83	ARR/ARR	21	>650	0 (0/12)	>650	0 (0/12)	ND	ND
SC-PS48	VRQ/VRQ	19	>650	0 (0/9)	>650	0 (0/10)	ND	ND
SC-PS152	AfRQ/AfRQ	≈7–14	300–600	16 (2/12)	162 ± 13	100 (9/9)	172 ± 16	100% (7/7)
SC-UCD/99 adapted to BoPrP-Tg110	–		>650	0 (0/13)	>650	0 (0/10)	ND	ND
Healthy sheep brain	ARQ/ARQ		>650	0 (0/14)	>650	0 (0/9)	ND	ND

\*BSE, bovine spongiform encephalopathy; TSE, transmissible spongiform encephalopathy; PrP<sup>res</sup>, atypical proteinase K-resistant prion protein; dpi, days postinoculation; ND, not determined.

†No. animals positive for the aberrant form of PrP associated with disease / no. inoculated animals.

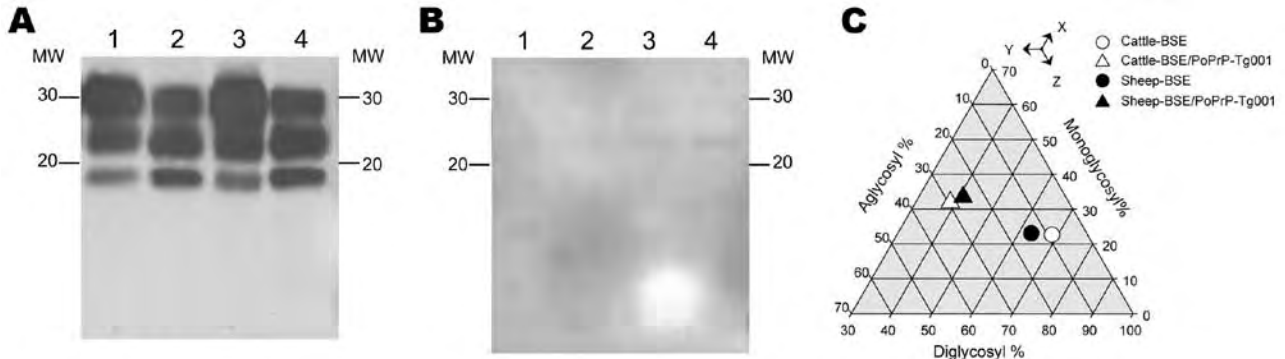


Figure 2. Brain atypical proteinase K-resistant prion protein (PrP<sup>res</sup>) of porcine PrP transgenic mice infected with cattle bovine spongiform encephalopathy (BSE) (lane 2) or sheep BSE agents (lane 4). Electrophoretic profiles and antibody labeling of PrP<sup>res</sup> detected with monoclonal antibodies Sha31 (A) or 12B2 (B). Profiles produced by cattle (lane 1) and sheep BSE (lane 3) before passage in the porcine mouse model are shown for comparison. MW, molecular mass in kilodaltons. C) Triangular plot of the glycosyl fractions of PrP<sup>res</sup> after proteinase K digestion and Western blotting using the Sha31 antibody. Data shown are the means of 5 or more measurements obtained from density scans in 2 or more Western blots. To interpret the plot, read the values for the diglycosyl, monoglycosyl, and aglycosyl fractions along the bottom, right and left axes of the triangle, respectively. For each point, the sum of the 3 values is 100.

passage in the porcine PrP mouse model (Figure 3). A 3-band PrP<sup>res</sup> pattern with an unglycosylated band of 19 kDa, which differed substantially from the molecular signature of atypical scrapie PrP<sup>res</sup>, was observed. Moreover, this porcine prion was indistinguishable from the porcine prion generated by inoculation of sheep BSE in terms of PrP<sup>res</sup> electrophoretic mobility (Figure 3, panel A), 12B2 MAb immunoreactivity (Figure 3, panel B), or its glycoprofile (Figure 3, panel C), characteristics that were maintained in subsequent passages in the same mouse model.

#### Lesion Profile and PrP<sup>Sc</sup> Deposition Pattern in Inoculated PoPrP-Tg001 Mice

Brain material from PoPrP-Tg001 mice inoculated with the BSE-infected brains of either cattle or sheep showed

consistent similarities in lesion profiles and PrP<sup>Sc</sup> deposition patterns in PET blots, although some differences could be observed, mainly in areas G7 and G9. These features persisted after a second passage in PoPrP-Tg001 mice (Figure 4). PrP<sup>Sc</sup> was also detected in the spleens of PoPrP-Tg001 mice inoculated with either cattle BSE or sheep BSE in first and second passages (data not shown). In mice inoculated with the different classical scrapie isolates, no typical brain lesions associated with prion infection were detected. We observed no differences between animals inoculated with classical scrapie isolates and those inoculated with brain tissue from healthy homozygous ARQ sheep or noninoculated PoPrP-Tg001 mice (data not shown).

Although some similarities were observed between the brains of PoPrP-Tg001 inoculated with SC-PS152 and the

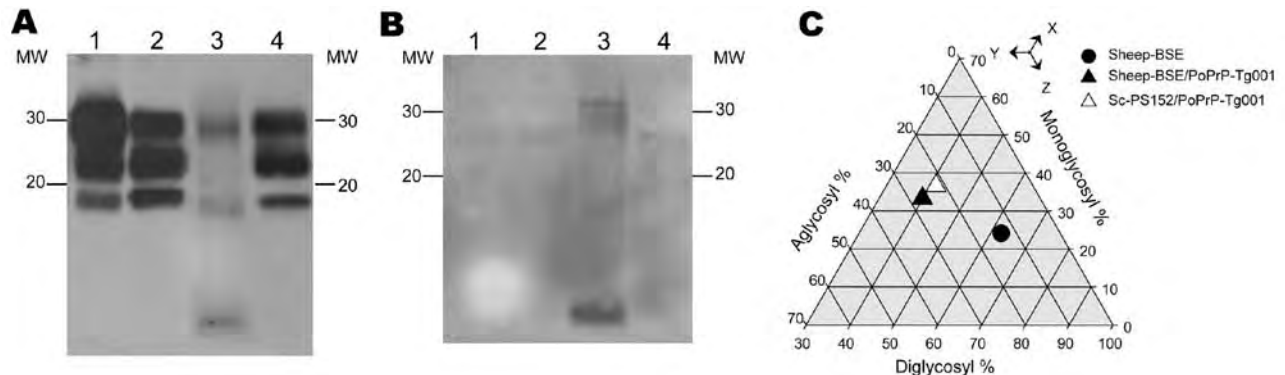


Figure 3. Brain atypical proteinase K-resistant prion protein (PrP<sup>res</sup>) of porcine PrP transgenic mice infected with an atypical scrapie (SC-PS152) agent (lane 4) versus sheep bovine spongiform encephalopathy (Sheep-BSE) agent (lane 2). Electrophoretic profiles and antibody labeling of PrP<sup>res</sup> detected with monoclonal antibodies Sha31 (A) or 12B2 (B). Profiles produced by atypical scrapie (SCPS152) (lane 3) and sheep-BSE (lane 1) before passage in the porcine mouse model are shown for comparison. MW, molecular mass in kilodaltons. C) Triangular plot of the glycosyl fractions of PrP<sup>res</sup> after proteinase K digestion and Western blotting using the Sha31 antibody. Data shown are the means of  $\geq 5$  measurements obtained from density scans in  $\geq 2$  Western blots. To interpret the plot, read the values for the diglycosyl, monoglycosyl, and aglycosyl fractions along the bottom, right and left axes of the triangle, respectively. For each point, the sum of the 3 values is 100.

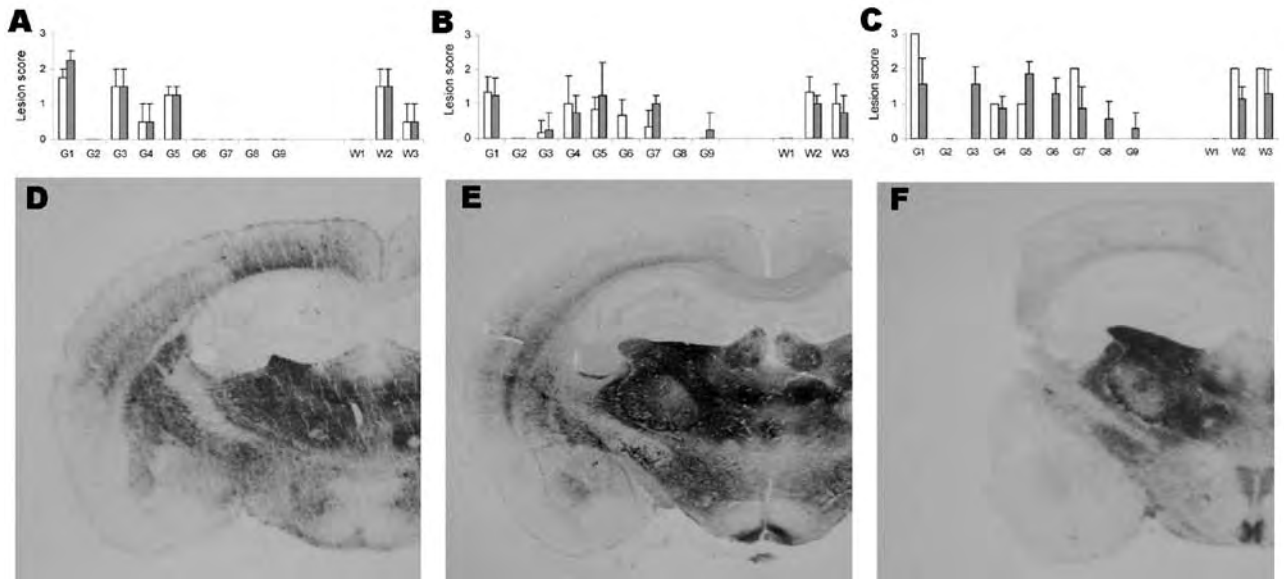


Figure 4. Lesion profiles and regional distributions of atypical proteinase K-resistant prion protein ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) in the brain of porcine PrP transgenic mice infected, either in 1st passage (white column) or in 2nd passage (black column) with cattle bovine spongiform encephalopathy (BSE) (panels A and D), sheep BSE (panels B and E), or atypical scrapie (panels C and F) agents. A–C) Lesion scoring of 9 areas of gray matter (G) and white matter (W) in mice brains: dorsal medulla (G1), cerebellar cortex (G2), superior colliculus (G3), hypothalamus (G4), medial thalamus (G5), hippocampus (G6), septum (G7), medial cerebral cortex at the level of the thalamus (G8) and at the level of the septum (G9), cerebellum (W1), mesencephalic tegmentum (W2) and pyramidal tract (W3). Error bars indicate SE. D–F) Histoblots of representative coronal sections at the level of the hippocampus.

brains of those inoculated with cattle BSE and sheep BSE, some differences could be observed mainly in region G6 and G8 (Figure 4, panels A–C). Moreover,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  distributions in the PET blots showed some differences when compared with those observed in samples from both cattle and sheep BSE-inoculated mice (Figure 4, panels D–F). These differences mainly appeared in the cortex, the medial prefrontal nucleus, the posterior commissure, the zona incerta and hypothalamic lateral area in which  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  deposition was more intense in cattle and sheep BSE-inoculated mice than in the SC-PS152-inoculated animals.

## Discussion

In this study, transgenic mice expressing porcine PrP (8) were used to assess the transmission capacity of a wide range of TSE agents from sheep. Our results indicated that none of the classical scrapie isolates tested was transmitted to our porcine PrP mouse model after intracerebral inoculation (Table), suggesting a highly (if not completely) resistance to the classical scrapie strains tested independently of their origin and biochemical signature. The absence of successful transmission of the SC-PS48 isolates with an unglycosylated bands of 19 kDa-like BSE suggests a BSE-unrelated origin for these BSE-like scrapie strains.

The atypical isolate SC-PS152 was the only scrapie isolate able to infect the Po-PrP mouse model after intrac-

erebral inoculation (Table), albeit with a low efficiency of infection in the first passage (attack rate 16%). These results suggest the potential ability of atypical scrapie prions to infect pigs, although with a strong transmission barrier. Given the increasing number of atypical scrapie cases found in Europe and in North America, the potential ability of atypical scrapie to adapt to the pig becoming more easily transmitted could raise concerns about the potential danger of feeding ruminant meat and bone meal to swine.

In our transmission experiments, an obviously shorter survival period ( $458 \pm 11$  dpi) and an increased attack rate (100%) were observed in PoPrP-Tg001 mice inoculated with sheep BSE (Table) compared with those inoculated with the original cattle BSE ( $>650$  dpi, 19%). These last figures correlate well with those reported for other cattle BSE isolates (Table). Differences in survival times were maintained after subsequent passages in this mouse model (Table), suggesting that the increased infectivity of sheep BSE cannot be linked to a higher infectious titer in the initial inoculum but must be the outcome of a modification in the pathogenicity of the agent. We can also rule out that the primary amino acid sequence of the ovine  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  leads to more efficient conversion of porcine  $\text{PrP}^{\text{C}}$  because scrapie isolates from sheep with the same ARQ-PrP genotype were not able to infect these mice (Table). Taken together, the increased infectivity of sheep BSE in the por-

cine PrP mouse model must be considered as increased pathogenicity of the agent attributable to its passage in sheep. These features support previous results indicating that the BSE agent modifies its biological properties after passage in sheep, with the result that its pathogenicity increases in transgenic mice expressing bovine PrP (24). An increased pathogenicity of ovine BSE was also reported in conventional RIII mice when compared with retrospective cattle BSE experiments (36). In other prion strains, passage through an intermediate species has also been noted to alter host susceptibility (37).

The enhanced infectivity of the BSE agent after its passage in ARQ sheep raises concern about its potential danger for other species, including humans. This question, as well as others related to the infectivity of the new porcine prion generated in this study, is currently being addressed in transmission experiments using transgenic mice expressing human PrP.

Upon passages in porcine PrP transgenic mice, the BSE agent retained most of its biochemical properties, except for its PrP<sup>res</sup> glycoprofile in which some differences were appreciable. Our comparative analysis of cattle BSE and sheep BSE upon transmission in porcine PrP transgenic mice showed that both agents exhibit similar molecular (Figure 2) and neuropathologic properties (Figure 4). These features were preserved after subsequent passages. These results suggest that, despite their modified pathogenicity, the 2 porcine prions generated share the same biochemical and neuropathologic properties, regardless of whether the BSE agent used to inoculate the mice was obtained from ARQ sheep or cows. In agreement with these results, the increased infectivity of sheep BSE previously observed upon transmission in bovine PrP transgenic mice was not reflected in its molecular or neuropathologic properties (24).

The atypical scrapie (SC-PS152) agent appeared to undergo a strain phenotype shift upon transmission to porcine PrP transgenic mice. Surprisingly, this novel strain phenotype was similar to that of sheep BSE propagated in the same mice in terms of several features: 1) survival times observed after stabilization in PoPrP-Tg001 mice (second passages) were similar (Table); 2) PrP<sup>res</sup> molecular profiles of the 2 agents in porcine PrP mice were indistinguishable (Figure 3); and 3) vacuolation profiles observed in second passages largely overlapped (Figure 4).

These findings could reflect the evolutionary potential of prion agents upon transmission to a foreign host able to promote strain shift and emergence of new properties (38,39). The converging molecular, neuropathologic, and biological properties of atypical scrapie and sheep BSE upon propagation in porcine transgenic mice could be the consequence of a restriction imposed by the porcine PrP<sup>C</sup>, which might only admit a few options as it changes its conformation to PrP<sup>SC</sup>.

Our results could also suggest a common origin for sheep BSE and atypical scrapie agents, which may exhibit different phenotypes depending on the host PrP<sup>C</sup> or other host factors. Although this last explanation seems to be less likely, so far we cannot draw any definitive conclusion on this issue. Whichever the case, the ability of an atypical scrapie to infect other species and its potential capacity to undergo a strain phenotype shift in the new host prompts new concerns about the possible spread of this uncommon TSE in other species as a masked prion undistinguishable from other strains.

### Acknowledgments

We thank J. Grassi for providing the Sha31 MAb, J. Langeveld for providing 12B2 MAb, and Bio-Rad for supplying the ELISA TeSeE and TeSeE CJD components.

This work was supported by National Spanish grants (RTA2006-00091 and AGL2005-03066) a grant from UK FSA (M03043) and grants from the European Union grants (QLRT-2001-01309, FP6-2004-FOOD3-023183, and CT2004-50657). D.P. was supported by a fellowship from the Aİşan Program, and M.E.H. holds a fellowship awarded by the Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria.

Dr Espinosa works in the Molecular and Cellular Biology of Prions Group of the Centro de Investigación en Sanidad Animal–Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria, Valdeolmos, Madrid, Spain. His primary research interest is the study of the elements modulating prion strain properties and interspecies prion transmission.

### References

- Pattison IH, Jones KM. The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec.* 1967;80:2–9.
- Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech.* 2003;22:121–43.
- Bruce ME. TSE strain variation. *Br Med Bull.* 2003;66:99–108. DOI: 10.1093/bmb/66.1.99
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003;153:202–8.
- Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, et al. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods.* 2004;117:27–36. DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.11.017
- Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec.* 1988;123:638–44.
- Ironside JW, Sutherland K, Bell JE, McCordle L, Barrie C, Estebeiro K, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1996;61:523–30.
- Castilla J, Gutierrez-Adan A, Brun A, Doyle D, Pintado B, Ramirez MA, et al. Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J Neurosci.* 2004;24:5063–9. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5400-03.2004

9. Wells GA, Hawkins SA, Austin AR, Ryder SJ, Done SH, Green RB, et al. Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J Gen Virol.* 2003;84:1021–31. DOI: 10.1099/vir.0.18788-0
10. Heath CA, Barker RA, Esmonde TF, Harvey P, Roberts R, Trend P, et al. Dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease: experience from surveillance in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:880–2.
11. Foster JD, Dickinson AG. The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec.* 1988;123:5–8.
12. Hope J, Wood SC, Birkett CR, Chong A, Bruce ME, Cairns D, et al. Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol.* 1999;80:1–4.
13. Baron T, Biacabe AG. Molecular behaviors of “CH1641-like” sheep scrapie isolates in ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *J Virol.* 2007;81:7230–7. DOI: 10.1128/JVI.02475-06
14. Baylis M, Goldmann W, Houston F, Cairns D, Chong A, Ross A, et al. Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *J Gen Virol.* 2002;83:2907–14.
15. Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, Gonzalez L, Foster J, et al. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature.* 2003;423:498. DOI: 10.1038/423498a
16. Hunter N. Prion protein (prnp) genotypes and natural scrapie in closed flocks of Cheviot and Suffolk sheep in Britain. In: Court LDB, editor. *Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases.* Paris: Elsevier; 1996. p. 47–50.
17. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel of the European Food Safety Authority on the biological hazards on the breeding programme for TSE resistance in sheep. *The EFSA Journal.* 2006;382:1–46.
18. Androletti O, Morel N, Lacroux C, Rouillon V, Barc C, Tabouret G, et al. Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *J Gen Virol.* 2006;87:1043–6. DOI: 10.1099/vir.0.81318-0
19. Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A, Luhken G, Mathey J, Eiden M, et al. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1201–7.
20. Le Dur A, Beringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, et al. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:16031–6.
21. European Union Directorate General for Health and Consumers. Preliminary report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2007 [cited 2009 May 10] Available from [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/preliminary\\_annual\\_report\\_tse2007\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/preliminary_annual_report_tse2007_en.pdf)
22. Eloit M, Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, et al. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec.* 2005;156:523–4.
23. The TSE community reference laboratory strain typing expert group (STEG). MEMO/06/113. 2006 9/3/2006 [cited 2009 May 10]. Available from <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/113>
24. Espinosa JC, Androletti O, Castilla J, Herva ME, Morales M, Alamillo E, et al. Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. *J Virol.* 2007;81:835–43. DOI: 10.1128/JVI.01356-06
25. Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, et al. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 1989;59:847–57. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90608-9
26. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol.* 1994;8:121–7. DOI: 10.1007/BF02780662
27. Féraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, Créminon C, et al. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP<sup>Sc</sup> replication in infected cells. *J Biol Chem.* 2005;280:11247–58.
28. Yull HM, Ritchie DL, Langeveld JP, van Zijderveld FG, Bruce ME, Ironside JW, et al. Detection of type 1 prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol.* 2006;168:151–7. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050766
29. Androletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, et al. 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.* 2002;83:2607–16.
30. Fraser H, Dickinson AG. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol.* 1968;78:301–11. DOI: 10.1016/0021-9975(68)90006-6
31. Androletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, et al. PrP(Sc) accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med.* 2004;10:591–3. DOI: 10.1038/nm1055
32. Thuring CM, Erkens JH, Jacobs JG, Bossers A, Van Keulen LJ, Garsen GJ, et al. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol.* 2004;42:972–80. DOI: 10.1128/JCM.42.3.972-980.2004
33. Saunders GC, Cawthraw S, Mountjoy SJ, Hope J, Windl O. PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J Gen Virol.* 2006;87:3141–9. DOI: 10.1099/vir.0.81779-0
34. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol.* 2005;86:231–5. DOI: 10.1099/vir.0.80437-0
35. Arzac JN, Androletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad SL, Baron T. Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:58–65.
36. Gonzalez L, Chianini F, Martin S, Siso S, Gibbard L, Reid HW, et al. Comparative titration of experimental ovine BSE infectivity in sheep and mice. *J Gen Virol.* 2007;88:714–7. DOI: 10.1099/vir.0.82426-0
37. Bartz JC, Marsh RF, McKenzie DI, Aiken JM. The host range of chronic wasting disease is altered on passage in ferrets. *Virology.* 1998;251:297–301. DOI: 10.1006/viro.1998.9427
38. Scott MR, Groth D, Tatzelt J, Torchia M, Tremblay P, DeArmond SJ, et al. Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *J Virol.* 1997;71:9032–44.
39. Bartz JC, Bessen RA, McKenzie D, Marsh RF, Aiken JM. Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 2000;74:5542–7. DOI: 10.1128/JVI.74.12.5542-5547.2000

Address for correspondence: Juan-María Torres, Centro de Investigación en Sanidad Animal, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain; email: [jmtorres@inia.es](mailto:jmtorres@inia.es)

Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the Public Health Service or by the U.S. Department of Health and Human Services.

All material published in *Emerging Infectious Diseases* is in the public domain and may be used and reprinted without special permission; proper citation, however, is required.

**Emergence of distinct TSE agents following transmission of an atypical scrapie isolate to transgenic mice expressing porcine or bovine prion protein.**

Hervé Cassard<sup>1</sup>, Caroline Lacroux<sup>1</sup>, Juan Maria Torres<sup>2</sup>, Juan Carlos Espinosa<sup>2</sup>,  
Sylvie Benestad<sup>3</sup>, Séverine Lugan<sup>1</sup>, Pierrette Costes<sup>1</sup> and Olivier Andréoletti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles 31076 Toulouse, France*

<sup>2</sup> *Centro de Investigacion en Sanidad Animal, 28130 Valdeolmos, Spain*

<sup>3</sup> *National Veterinary Institute, Oslo, Norway*

## Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are neurodegenerative disorders that naturally affect a wide range of mammalian species, including small ruminants (scrapie), cattle (bovine spongiform encephalopathy – BSE) and human beings (Creutzfeldt-Jakob disease). Though the mechanisms involved in the pathogenesis of TSE are not fully understood, the conversion of the cellular prion protein PrP<sup>c</sup>, encoded by the *PRNP* gene, into an abnormal isoform (PrP<sup>Sc</sup>) is considered to be a key event [1]. PrP<sup>Sc</sup> accumulates in the tissues of infected individuals, its presence seems to correlate with infectivity and, according to the protein only hypothesis, PrP<sup>Sc</sup> itself is the infectious agent in TSE [2]. Currently, PrP<sup>Sc</sup> is the only molecular marker available for the diagnosis of TSE and some of its biochemical properties such as solubility in detergents, resistance to digestion with proteinase K (PK) and electromobility in western blot can be used to distinguish between prion strains [3, 4].

Atypical scrapie was first identified in Norway in 1998. PrP<sup>Sc</sup> detected in the brain of the affected sheep displayed a multiple band WB pattern that strongly contrasted with the 3-band pattern usually observed in other TSE of ruminants [5]. Moreover, atypical scrapie could be distinguished histologically from classical scrapie or BSE thanks to the distribution of vacuolar lesions and PrP<sup>Sc</sup> deposits in the central nervous system. Following the implementation of an active surveillance programme of TSE in sheep in 2002, many similar cases have been detected in most countries of the European Union [6]. A few cases have also been reported outside Europe [7-9].

In sheep, susceptibility to TSE is tightly linked to polymorphisms at codons 136 (A/V), 154 (R/H) and 171 (R/H/Q) of the *PRNP* gene [10, 11]. Epidemiological studies have revealed that the distribution of PrP genotypes among atypical scrapie cases is different from that among classical scrapie cases. Atypical scrapie can notably affect sheep moderately



susceptible (ARQ or ARR allele carriers) and resistant (ARR/ARR) to classical scrapie [12-15]. Furthermore, an additional polymorphism at codon 141 (F/L) co-modulates susceptibility to atypical scrapie with the AFRQ allele conferring a high risk to develop the disease [15].

Cross-species transmission of a TSE agent generally results in a low attack rate (number of infected animals/number of inoculated animals) and a long incubation period. This limited efficiency can be explained by the existence of a transmission barrier, the exact determinants of which remain unclear. It has been proved that the variation in the PrP sequence between the host and the donor species is a major parameter involved in this phenomenon [16], which has led to the creation of several transgenic mouse lines expressing heterologous PrP [17]. Additionally, the prion strain can also have a major impact as illustrated by the capacity of the BSE agent to infect hosts from different species without alteration of its phenotype [18].

Atypical scrapie can easily be transmitted to sheep [19-21] and to transgenic mice expressing ovine PrP [13, 22, 23]. However, despite the potential exposure of other livestock species to the atypical scrapie agent, few data are available concerning its ability to cross transmission barriers. In a recent report, intracerebral inoculation of porcine PrP transgenic mice with an atypical scrapie isolate (PS152) has led to the propagation of a prion with a BSE-like phenotype [24].

Within this context, the aim of our study was to verify that the agent propagated in the porcine PrP transgenic mice was really the BSE agent and to assess the capacity of the atypical scrapie agent to cross other transmission barriers. For these purposes, we used ovine, bovine and murine PrP transgenic mice and we assessed the stability of the phenotype of the atypical scrapie agent with biochemical methods.

## **Materials and methods**

### **Scrapie isolates**

The PS152 isolate was obtained from a French AFRQ/AFRQ sheep naturally infected with atypical scrapie. In some transmission experiments, we also used a classical scrapie isolate obtained from a Romanov sheep born and bred in the Langlade flock where natural scrapie has been occurring at a high incidence since 1993 [10].

### **BSE isolates**

Two BSE isolates were used: a cattle BSE isolate obtained from a case detected in France through the active BSE surveillance programme (case number 237) and a sheep BSE isolate obtained from a ARQ/ARQ sheep experimentally infected with cattle BSE (graciously provided by Frédéric Lantier, INRA Nouzilly, France).

### **Porcine PrP transgenic mice-adapted isolates**

Isolates obtained from porcine PrP transgenic mice (Tg001) inoculated either with the PS152 isolate (first or second passage) or with a BSE isolate (second passage) were used in mouse bioassays. The biochemical features of these isolates had been previously described [24].

### **Brain homogenates preparation**

All brain tissues were collected and handled with disposable equipment. To avoid cross-contamination we used an instrument set for each sample.

For each isolate, a 10 % brain homogenate (weight/volume) in 5 % glucose was prepared in single use grinding microtubes using a high-speed homogenizer (TeSeE Precess 48 System).

The homogenates were then filtered through a 25 Gauge needle (single use syringe), aliquoted

in 2 mL tubes and stored at -20°C. Before inoculation, each homogenate was thawed and heated at 60°C for 10 minutes to reduce the risk of bacterial infection.

### **Sheep and mouse transmission assays**

Two AHQ/AHQ Cheviot ewes (12 month-old) were challenged intracerebrally with the PS152 atypical scrapie isolate. Each sheep received 300 µL of 10 % brain homogenate in the right frontal lobe under general anesthesia (Diazepam 4mg/kg – Ketamine 0.2 mg/kg intravenously).

Mouse bioassay experiments were carried out in three PrP transgenic mouse lines previously described. Tga20 mice express murine PrP (*Prnp*-a allele) at a level ten-fold higher than wild type mice [25]. The Tg338 line overexpresses ovine PrP (VRQ allele) at levels eight to ten-fold higher than sheep [26]. Tg110 mice express bovine PrP at a level eight-fold higher than in cattle brain [27]. For each isolate, at least six mice (6-12 week-old) were inoculated intracerebrally in the right parietal lobe with 20 µL of 10 % brain homogenate under general anesthesia.

Sheep and mice were monitored daily and were killed when they showed severe locomotor disorders or any impairment in their capacity to feed.

### **End-point titration experiment**

The cattle BSE isolate was endpoint titrated in Tg110 mice. Serial ten-fold dilutions of the original BSE homogenate (10 %) were prepared using negative brain homogenate and, for each dilution (neat,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ), 6 mice were inoculated intracerebrally (20 µL). The mice were killed when they showed severe nervous disorders or at 800 dpi if no clinical signs of TSE were observed.

## **Western blot**

A commercially available WB kit (TeSeE<sup>®</sup> western blot, Biorad) was used following the manufacturer's recommendations. For each sample, 200  $\mu$ L of 10 % brain homogenate were incubated for 10 min at 37°C with 200  $\mu$ L of buffer A containing proteinase K (120  $\mu$ g/mL). PrP<sup>res</sup> was recovered as a pellet after addition of 200  $\mu$ L of buffer B and centrifugation for 7 min at 15,000 g at 4°C. The supernatant was discarded and the tube was dried inverted over absorbent paper for 5 min. The pellet was solubilised in 20  $\mu$ L of Laemmli's buffer and heated at 100°C for 5 min. After a centrifugation step (15,000 g for 15 min at 4°C), the supernatant was recovered and heated at 100°C for 4 min before being loaded on a 12 % acrylamide gel. Proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked with a 2 % BSA blocking solution (30 min). PrP<sup>res</sup> immunodetection was performed using Sha31 monoclonal antibody which recognizes the amino acid sequence YEDRYRE (145-152). Peroxydase activity was revealed using ECL substrate (Pierce).

## **Lesion profiles and paraffin-embedded tissue blot (PET blot)**

Lesion profiles were established according to the standard method described by Fraser and Dickinson [28].

Pet Blots were performed using the protocol described by Schulz-Schaeffer *et al.* [29]. Briefly, sections (4  $\mu$ m) of paraffin-embedded tissue were collected on a prewetted nitrocellulose membrane and dried at 56°C. The membrane was deparaffinized before digestion with proteinase K. PrP<sup>res</sup> immunodetection was carried out using Sha31 (4  $\mu$ g/mL) followed by application of an alkaline phosphatase labeled secondary antibody (Dako

reference D0314 – 1/500 diluted). Enzymatic activity was revealed using NBT/BCIP substrate chromogen.

## Results

### **The PS152 agent has an atypical scrapie phenotype in sheep and ovine transgenic mice**

Two AHQ/AHQ sheep were challenged intracerebrally with an atypical/Nor98-like scrapie isolate (PS152) obtained from a naturally infected AFRQ/AFRQ case. They both displayed progressive ataxia with behavioural disorders and they were killed 665 and 884 days post inoculation (dpi) respectively. For each sheep, PrP<sup>res</sup> profile was determined in 3 brain areas (obex, cerebral cortex and cerebellum) and lymphoid organs by western blotting (WB). In all brain areas investigated, a PrP<sup>res</sup> banding pattern identical with that of the PS152 isolate was observed although the signal in the obex was low (Figure 1). No PrP<sup>res</sup> was detected in the lymphoid organs (data not shown).

Inoculation of the original PS152 isolate or brain homogenates from the two AHQ/AHQ sheep into Tg338 mice resulted in similar mean survival times ( $250\pm 19$ ,  $229\pm 11$  and  $237\pm 12$  dpi respectively). WB analysis of brain from these mice showed identical PrP<sup>res</sup> signatures characterized by a multibanding pattern with a low molecular mass band at  $\approx 11$  kDa (Figure 2A). Lesion profiles (Figure 2B) and PrP<sup>Sc</sup> distribution patterns in PET blots (data not shown) were also similar. These biochemical and biological features were undistinguishable from those of Norwegian, French and British atypical scrapie isolates previously transmitted to the same transgenic line [13, 22, 30].

Together, these data confirmed that the PS152 isolate was a bona fide atypical scrapie isolate.

## **Passage across the murine transmission barrier doesn't modify the properties of the PS152 agent**

The PS152 isolate induced a neurological disease in all inoculated transgenic mice overexpressing the murine *PRNP* gene (Tga20). On primary passage, the mean survival time was long ( $540\pm 70$  dpi) and was clearly reduced after a secondary subpassage ( $299\pm 11$  dpi), reflecting an adaptation of the agent to its new host. PrP<sup>res</sup> detected in the brain of Tga20 mice showed a WB profile similar to that obtained in sheep and in Tg338 mice although slight differences concerning the relative proportions and the electrophoretic mobility of the protein fragments could be observed (Figure 3A). Furthermore, the Tga20-passaged PS152 prion retained the biological and biochemical properties of the original PS152 agent as indicated by the survival time, the lesion profile (data not shown), the PET Blot profile (Figure 3B) and the PrP<sup>res</sup> WB pattern (Figure 3 A) obtained following transmission to Tg338 mice.

## **Emergence of the BSE agent in porcine transgenic mice**

It has been previously shown that mice expressing porcine PrP (Tg001) could be infected with the PS152 isolate despite a strong transmission barrier. Surprisingly, in these mice, the PS152 prion underwent a phenotype shift and became indistinguishable from sheep BSE using biochemical parameters (PrP<sup>res</sup> WB profile, glycoprofile) and biological criteria (survival time, lesion profile) classically used to differentiate between TSE strains [24]. As these results could be explained either by the emergence of the BSE agent or by a phenotypic convergence between the PS152 and the BSE agents, we examined the properties of the porcine-adapted PS152 isolate in Tg338 and Tg110 mice. In these transgenic mouse lines, it produced survival times (Table 1), PrP<sup>res</sup> signatures (Figure 4), vacuolar lesion profiles and PET blots patterns

(data not shown) similar to those obtained with a sheep BSE isolate or a Tg001-passaged sheep BSE isolate. These data unequivocally confirmed that the BSE agent had emerged upon transmission of the PS152 isolate to Tg001 mice.

### **The BSE agent did not pre-exist in the original PS152 isolate**

To determine if the emergence of the BSE agent in Tg001 mice was due to a mutation of the PS152 agent or if it pre-existed in the original PS152 isolate and was selected, we inoculated the PS152 isolate into Tg110 mice. On primary passage, the mean survival time almost reached their lifespan ( $804 \pm 52$  dpi) but it clearly decreased on second passage ( $319 \pm 86$  dpi). As in Tg001 mice, WB analysis of the brain from Tg110 mice showed a dramatic shift in the electrophoretic mobility of PrP<sup>res</sup> with the emergence of a three-banding pattern with a 19 kDa unglycosylated band (Figure 5A). However, lesion profiles and PrP<sup>res</sup> deposits distribution were different from those observed in mice inoculated with a sheep BSE isolate (Figure 5B-C). Additionally, we showed in an end-point titration experiment that the maximal survival time of Tg110 mice inoculated with a BSE isolate didn't exceed 500 dpi (Table 2). Therefore, if the BSE agent had been present in the PS152 isolate, it should have emerged on primary passage in this transgenic mouse line.

### **The properties of the PS152 agent are irreversibly altered following the passage across the bovine transmission barrier**

In order to find out if the PS152 agent maintained its original properties despite the passage across the bovine transmission barrier, we inoculated Tg338 mice with the Tg110-passaged PS152 isolate. The PrP<sup>res</sup> detected in the brain of these mice retained a three-banding WB



pattern with an unglycosylated band at 19 kDa (Figure 6A). These biochemical features were obviously different from those observed in Tg338 mice inoculated either directly with the original PS152 isolate (multibanding pattern) or with a classical scrapie isolate (unglycosylated band at 21 kDa). Moreover, the diglycosylated band was only slightly predominant when compared to a sheep BSE isolate. The bovine-adapted PS152 prion could also be distinguish from the original PS152 isolate by its biological phenotype in Tg338 mice as assessed by the survival times (Table 3), lesion profiles (Figure 6B) and PET blot analysis (data not shown).

Taken together, these results demonstrate that transmission of the PS152 isolate to Tg110 mice has resulted in the emergence of a new TSE agent.

## Discussion

In our study, transmission of an atypical scrapie isolate (PS152) to transgenic mice expressing either porcine or bovine PrP led to radical alterations of its properties. Espinosa *et al.* had previously shown that the agent recovered in the brain of mice overexpressing porcine PrP inoculated with this isolate had biochemical features undistinguishable from those of the BSE agent [24]. We confirmed here that this porcine-passaged prion was actually the BSE agent by comparing its phenotype to that of two BSE isolates in ovine (Tg338) and bovine (Tg110) transgenic mice.

The PS152 agent also lost its atypical PrP<sup>res</sup> signature when it was directly transmitted to Tg110 mice. This molecular shift was definitive as indicated by the absence of phenotype reversion observed when the bovine-adapted PS152 agent was inoculated into Tg338 mice. Interestingly, this prion had biological properties different from those of the original PS152 agent and could be easily distinguished from the BSE agent.

Several studies using rodent models have shown that the emergence of new TSE strains on experimental cross-species transmission is an unpredictable event. Although in some experiments this phenomenon could be explained by the presence of a mixture of strains in the initial inoculum [31, 32], it is clear that some strains are intrinsically unstable and can evolve in different ways, depending on the PrP sequence of the host [33, 34]. For instance, the cloned 139A murine scrapie strain conserves its original properties in mice after three intermediate passages in rats whereas two intermediate passages in hamsters before reinoculation into mice lead to the emergence of a new strain (139H/M) with properties different from 139A [34]. The atypical scrapie agent we used in our transmission experiments was not biologically cloned but it is unlikely that the agents that have emerged in porcine and bovine PrP transgenic mice preexisted in our original inoculum. Indeed, Tg110 mice

inoculated with the original PS152 isolate didn't develop any neurological disease within 700 dpi whereas, in an end-point titration experiment in the same transgenic mouse line, a BSE isolate produced a maximal survival time of 500 dpi. Similarly, direct transmission of the PS152 isolate to Tg338 mice led to a mean survival time (230 dpi) significantly longer than that observed with the bovine-passaged PS152 agent (140 dpi). Thus, our results rather suggest that the original atypical scrapie agent underwent sudden mutations while crossing the porcine and the bovine transmission barriers, leading to the *de novo* emergence of distinct TSE agents.

The origin of the BSE agent still remains unknown. It has been proposed that the BSE agent has originated from an endemic prion strain that would have evolved following a cross-species infection via the oral route [35, 36]. Our work supports this hypothesis by demonstrating that the BSE agent can emerge from an atypical scrapie agent under experimental conditions.

The data collected through the active TSE surveillance programme implemented in the European Union show that atypical scrapie is a widespread disease. In a study carried out in 11 countries that had reported at least one case of atypical scrapie between 2002 and 2007, its mean apparent prevalence was 5.5 (5.0-6.0) cases per ten thousand in sheep slaughtered for human consumption and 8.1 (7.3-9.0) cases per ten thousand in the fallen stock [37]. Furthermore, retrospective analyses suggest that this prevalence has remained stable over this period [38, 39]. Together, these epidemiological data indicate that the European sheep and goats populations have been and are still largely exposed to the atypical scrapie agent. The capacity of this common field scrapie agent to cross species barriers, as demonstrated here, may represent a threat for animal health. Nowadays, the possibilities of TSE cross-species infections are limited by the ban on the feeding of processed animal proteins (PAP) to farmed animals that was introduced in 2001 as a result of the BSE epidemic. However, the marked

decrease of the BSE incidence has called into question the interest of this drastic measure and a gradual relaxation of the feed ban leading to a future reuse of small ruminants PAP can't be excluded. Within such a context, other non-ruminants or ruminants species would inevitably be exposed to the atypical scrapie agent because of our limited ability to detect infected animals and to prevent their entry in the animal food chain. Indeed, the screening tests currently available for TSE detection in small ruminants have lower performance for identifying atypical scrapie cases than classical scrapie cases [5, 6, 12, 40, 41]. Moreover, it has been recently demonstrated that the peripheral tissues (lymphoid tissues, nerves, muscles) of atypical scrapie incubating sheep can be infectious despite the absence of detectable PrP<sup>Sc</sup> [40]. According to our results, this situation could potentially lead to the brutal emergence and the dissemination of multiple TSE agents in animal populations which may indirectly have a major impact on public health as illustrated by the emergence of the BSE agent in porcine PrP transgenic mice.

So far, a single PrP<sup>Sc</sup> biochemical signature has been described in sheep naturally or experimentally infected with atypical scrapie [19-21] and all field isolates that have been transmitted to ovine PrP transgenic mice (Tg338) shared the same phenotype.[13, 22, 42] Although this apparent homogeneity suggests that atypical scrapie is caused by a single TSE agent, the biological behavior of this agent in hosts expressing heterologous PrP has only been assessed with the isolate used in our work. It is therefore questionable whether the results reported here can be extrapolated to other isolates and supplementary studies with more atypical scrapie sources are needed before drawing any definitive conclusions.

## References

1. **McKinley, M.P., D.C. Bolton, and S.B. Prusiner** (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**(1): 57-62.
2. **Prusiner, S.B.** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**(4542): 136-144.
3. **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**(4): 2096-2101.
4. **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**(12): 7859-7868.
5. **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**(7): 202-208.
6. **Fediaevsky, A., S.C. Tongue, M. Noremark, D. Calavas, G. Ru, and P. Hopp** (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res* **4**: 19.
7. **Kittelberger, R., M.J. Chaplin, M.M. Simmons, A. Ramirez-Villaescusa, L. McIntyre, S.C. MacDiarmid, M.J. Hannah, J. Jenner, R. Bueno, D. Bayliss, H. Black, C.J. Pigott, and J.S. O'Keefe** (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest* **22**(6): 863-875.
8. **Mitchell, G.B., K.I. O'Rourke, N.P. Harrington, A. Soutyrine, M.M. Simmons, S. Dudas, D. Zhuang, H. Laude, and A. Balachandran** (2010). Identification of atypical scrapie in Canadian sheep. *J Vet Diagn Invest* **22**(3): 408-411.
9. **Loiacono, C.M., B.V. Thomsen, S.M. Hall, M. Kiupel, D. Sutton, K. O'Rourke, B. Barr, L. Anthenill, and D. Keane** (2009). Nor98 scrapie identified in the United States. *J Vet Diagn Invest* **21**(4): 454-463.
10. **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**(3): 431-445.
11. **Hunter, N., W. Goldmann, J.D. Foster, D. Cairns, and G. Smith** (1997). Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet Rec* **141**(6): 137-140.
12. **Benestad, S.L., J.N. Arzac, W. Goldmann, and M. Noremark** (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res* **39**(4): 19.

13. **Le Dur, A., V. Beringue, O. Andreoletti, F. Reine, T.L. Lai, T. Baron, B. Bratberg, J.L. Vilotte, P. Sarradin, S.L. Benestad, and H. Laude** (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 16031-16036.
14. **Luhken, G., A. Buschmann, H. Brandt, M. Eiden, M.H. Groschup, and G. Erhardt** (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res* **38**(1): 65-80.
15. **Moum, T., I. Olsaker, P. Hopp, T. Moldal, M. Valheim, and S.L. Benestad** (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol* **86**(Pt 1): 231-235.
16. **Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S.J. DeArmond, D. Westaway, and S.B. Prusiner** (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**(5): 847-857.
17. **Groschup, M.H. and A. Buschmann** (2008). Rodent models for prion diseases. *Vet Res* **39**(4): 32.
18. **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. *Nature* **383**(6602): 685-690.
19. **Simmons, M.M., T. Konold, H.A. Simmons, Y.I. Spencer, R. Lockey, J. Spiropoulos, S. Everitt, and D. Clifford** (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res* **3**: 20.
20. **Simmons, M.M., T. Konold, L. Thurston, S.J. Bellworthy, M.J. Chaplin, and S.J. Moore** (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res* **6**: 14.
21. **Simmons, M.M., S.J. Moore, T. Konold, L. Thurston, L.A. Terry, L. Thorne, R. Lockey, C. Vickery, S.A. Hawkins, M.J. Chaplin, and J. Spiropoulos** (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis* **17**(5): 848-854.
22. **Griffiths, P.C., J. Spiropoulos, R. Lockey, A.C. Tout, D. Jayasena, J.M. Plater, A. Chave, R.B. Green, S. Simonini, L. Thorne, I. Dexter, A. Balkema-Buschmann, M.H. Groschup, V. Beringue, A. Le Dur, H. Laude, and J. Hope** (2010). Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol* **91**(Pt 8): 2132-2138.
23. **Arsac, J.N., D. Betemps, E. Morignat, C. Feraudet, A. Bencsik, D. Aubert, J. Grassi, and T. Baron** (2009). Transmissibility of atypical scrapie in ovine transgenic mice: major effects of host prion protein expression and donor prion genotype. *PLoS One* **4**(10): e7300.

24. **Espinosa, J.C., M.E. Herva, O. Andreoletti, D. Padilla, C. Lacroux, H. Cassard, I. Lantier, J. Castilla, and J.M. Torres** (2009). Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie. *Emerg Infect Dis* **15**(8): 1214-1221.
25. **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**(6): 1255-1264.
26. **Laude, H., D. Vilette, A. Le Dur, F. Archer, S. Soulier, N. Besnard, R. Essalmani, and J.L. Vilotte** (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol* **325**(1): 49-57.
27. **Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. Brun, B. Pintado, M.A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F.J. Salguero, C. Sanchez, J.M. Sanchez-Vizcaino, and J.M. Torres** (2003). Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol* **148**(4): 677-691.
28. **Fraser, H. and A.G. Dickinson** (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* **83**(1): 29-40.
29. **Schulz-Schaeffer, W.J., S. Tschoke, N. Kranefuss, W. Drose, D. Hause-Reitner, A. Giese, M.H. Groschup, and H.A. Kretzschmar** (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* **156**(1): 51-56.
30. **Arsac, J.N., O. Andreoletti, J.M. Bilheude, C. Lacroux, S.L. Benestad, and T. Baron** (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis* **13**(1): 58-65.
31. **Kimberlin, R.H. and C.A. Walker** (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* **39**(3): 487-496.
32. **Pattison, I.H. and K.M. Jones** (1968). Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res Vet Sci* **9**(5): 408-410.
33. **Bartz, J.C., R.A. Bessen, D. McKenzie, R.F. Marsh, and J.M. Aiken** (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **74**(12): 5542-5547.
34. **Kimberlin, R.H., S. Cole, and C.A. Walker** (1987). Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* **68** ( Pt 7): 1875-1881.
35. **Wilesmith, J.W., J.B. Ryan, and M.J. Atkinson** (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* **128**(9): 199-203.
36. **Wilesmith, J.W., G.A. Wells, M.P. Cranwell, and J.B. Ryan** (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* **123**(25): 638-644.

37. **Fediaevsky, A., C. Maurella, M. Noremark, F. Ingravalle, S. Thorgeirsdottir, L. Orge, R. Poizat, M. Hautaniemi, B. Liam, D. Calavas, G. Ru, and P. Hopp** (2010). The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet Res* **6**(9).
38. **Del Rio Vilas, V.J., D. Bohning, and R. Kuhnert** (2008). A comparison of the active surveillance of scrapie in the European Union. *Vet Res* **39**(3): 37.
39. **McIntyre, K.M., V.J. del Rio Vilas, and S. Gubbins** (2008). No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006. *BMC Vet Res* **4**:13.
40. **Andreoletti, O., L. Orge, S.L. Benestad, V. Beringue, C. Litaize, 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**(2): e1001285.
41. **Nentwig, A., A. Oevermann, D. Heim, C. Botteron, K. Zellweger, C. Drogemuller, A. Zurbriggen, and T. Seuberlich** (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog* **3**(6): e82.
42. **Gotte, D.R., S.L. Benestad, H. Laude, A. Zurbriggen, A. Oevermann, and T. Seuberlich** (2011). Atypical scrapie isolates involve a uniform prion species with a complex molecular signature. *PLoS One* **6**(11): e27510.



**Table 1.**

Survival times of ovine (Tg338) and bovine (Tg110) PrP transgenic mice inoculated with the original PS152 atypical scrapie isolate or with a sheep BSE isolate before and after intermediate passages in porcine PrP transgenic mice (Tg001).

	<b>PS152</b>	<b>PS152/Tg001</b>	<b>PS152/Tg001×2</b>	<b>Sh-BSE</b>	<b>Sh-BSE/Tg001×2</b>
<b>Tg338</b>	250±19	731±77	732±92	663±78	848±101
<b>Tg110</b>	804±52	265±12	257±40	290±19	291±20

Each mean survival time ( $\pm$  SD) was calculated for a group of at least 6 mice and is expressed in days.

**Table 2.** Endpoint titration of a French cattle BSE isolate in bovine PrP transgenic mice (Tg110)

	<b>Positive mice</b>	<b>Survival time</b>
<b>neat</b>	6/6	316±6
<b>10<sup>-1</sup></b>	6/6	397±60
<b>10<sup>-2</sup></b>	6/6	444±82
<b>10<sup>-3</sup></b>	6/6	482±108
<b>10<sup>-4</sup></b>	2/7	480-498*
<b>10<sup>-5</sup></b>	2/7	480-498*
<b>10<sup>-6</sup></b>	0/7	>800

Survival times are expressed in days (mean  $\pm$  SD) except in cases where less than 3 mice were positive (\*)

**Table 3.** Survival times of ovine PrP transgenic mice (Tg338) inoculated with an atypical scrapie isolate before (PS152) or after one or two intermediate passages in bovine PrP transgenic mice (Tg110)

	<b>PS152</b>	<b>PS152/Tg110</b>	<b>PS152/Tg110×2</b>
<b>Tg338</b>	250±19	240±52	145±9
<b>Tg338×2</b>	232±5	141±4	143±4

Survival times are calculated for a group of at least 6 mice and are expressed in days (mean ± SD)

**Figure 1.**

WB detection of PrP<sup>res</sup> in the brain of two AHQ/AHQ sheep inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate (lanes 3-8). For each sheep, three brain areas (obex, cerebellum, cerebral cortex) were investigated. The original PS152 isolate (lane 2) and a classical scrapie isolate (Langlade, lane 1) were also analyzed for comparison (Sha 31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYYRE<sub>152</sub>).

**Figure 2.**

(A) WB detection of PrP<sup>res</sup> in the brain of ovine PrP transgenic mice (Tg338) inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate before (lane 1) or after (lanes 2-3) an intermediate passage in AHQ/AHQ sheep (Sha 31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYYRE<sub>152</sub>).

(B) Lesion profiles (vacuolar changes) in Tg338 mice inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate (PS152) before (open inverted triangles and dashed line) or after an intermediate passage in an AHQ/AHQ sheep (filled diamonds and solid line). For each isolate, the mean scores with SEM were calculated in 6 mice.

**Figure 3.**

(A) WB profiles of PrP<sup>res</sup> detected in the brain of transgenic mice overexpressing murine (Tga20; lanes 5-8) or ovine (Tg338; lanes 2-3) PrP inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate or with the Tga20-passaged PS152 isolate. The original PS152 sheep isolate was also analyzed for comparison (lane 10). Lanes 1, 4 and 9: molecular mass markers (Sha 31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYYRE<sub>152</sub>).

(B-C) PET Blots (Sha31 antibody – NBT/BCIP black deposits) of brain coronal section (thalamus level) from Tg338 mice inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate before (B) or after an intermediate passage in Tga20 mice (C).

**Figure 4.**

WB profiles of PrP<sup>res</sup> in transgenic mice overexpressing bovine (Tg110) or ovine (Tg338) PrP inoculated with a cattle BSE isolate (lanes 3 and 7), a Tg001-passaged sheep BSE isolate (lanes 1-2) or the PS152 isolate after one (lane 4) or two (lanes 5-6) intermediate passages in Tg001 mice (Sha 31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYYRE<sub>152</sub>).

**Figure 5.**

(A) WB profiles of PrP<sup>res</sup> detected in the brain of Tg110 mice inoculated with a sheep BSE isolate (lane 2), a Tg001-passaged sheep BSE isolate (lane 2), the PS152 atypical scrapie isolate (lane 3) and a Tg338-passaged sheep BSE isolate (lane 4). Lanes 1 and 6: molecular mass markers (Sha 31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYYRE<sub>152</sub>).

(B) PET blots (Sha31 antibody – NBT/BCIP black deposits) of brain coronal section (thalamus level) from Tg110 mice inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate (B) or a sheep BSE isolate (C).

**Figure 6.**

(A) WB profiles of PrP<sup>res</sup> detected in the brain of Tg338 mice inoculated with the PS152 atypical scrapie isolate (lane 1), a sheep BSE isolate (lane 2), the PS152 isolate after an intermediate passage in Tg110 mice (lane 3) or a classical scrapie isolate (Langlade, lane 4). Lane 5: molecular mass markers (Sha 31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYYRE<sub>152</sub>).

(B) Lesions profiles (vacuolar changes) in Tg338 mice inoculated with the PS152 isolate before (open inverted triangles and dashed line) or after two intermediate passages in Tg110 mice (filled diamonds and solid line).



**Figure 1**

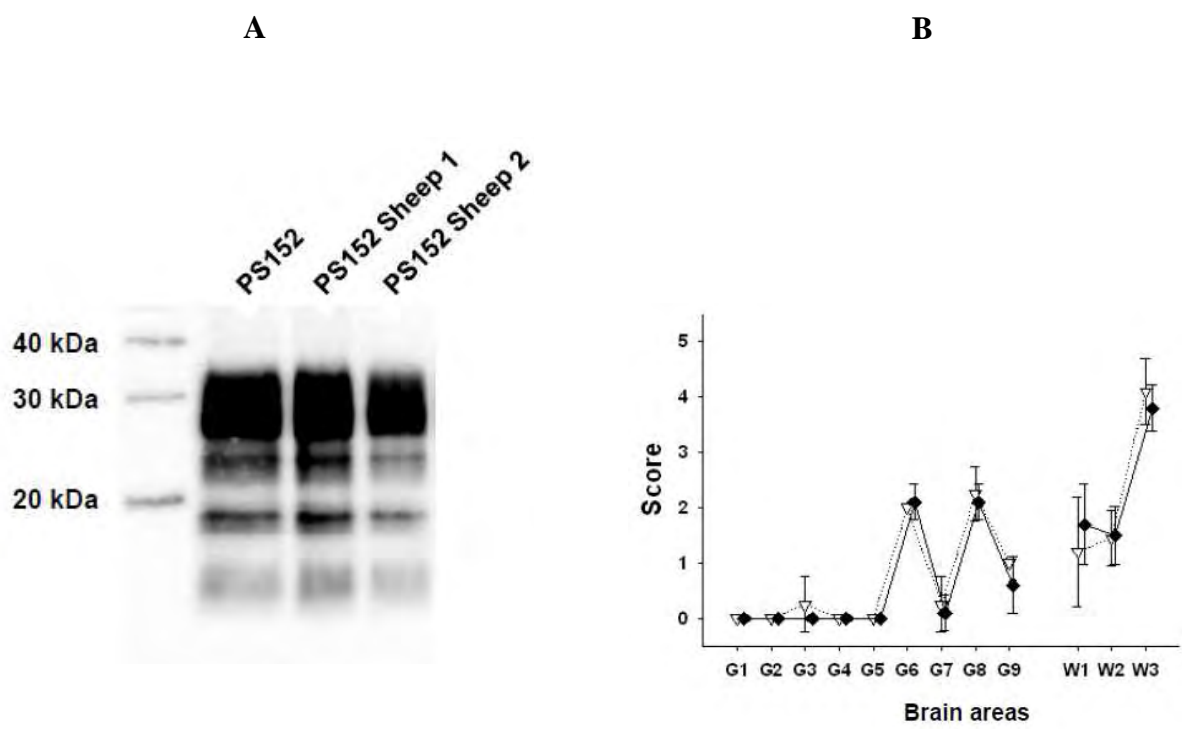
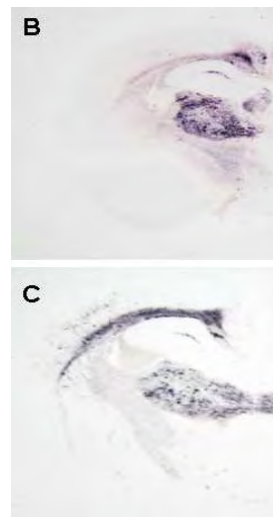
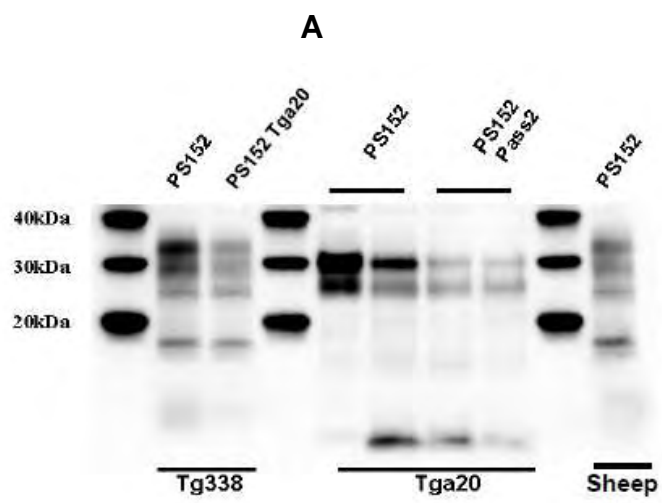


Figure 2



**Figure 3**

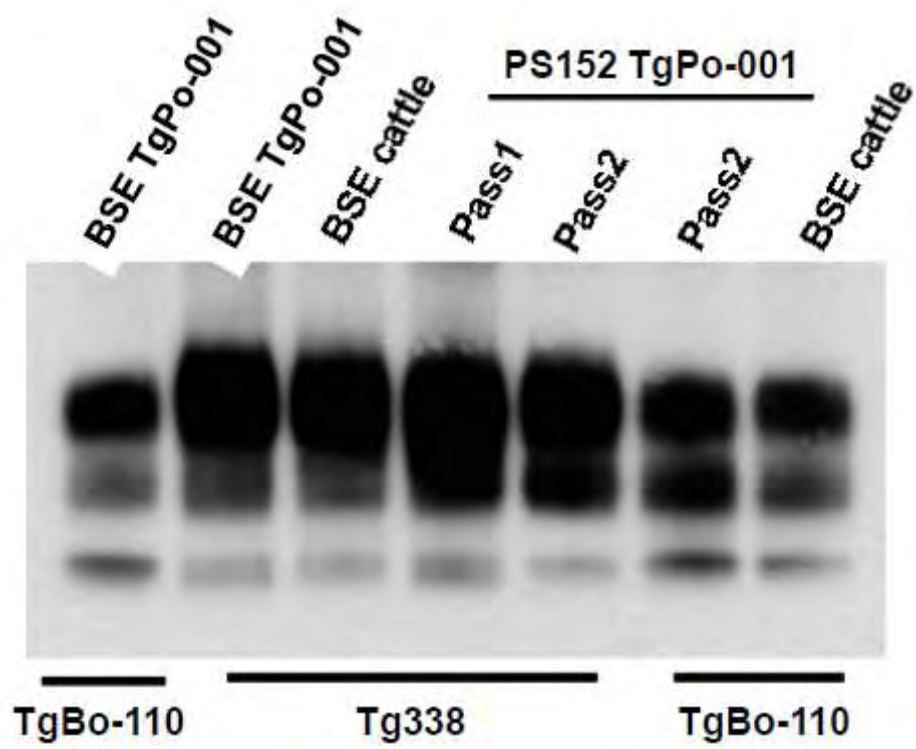
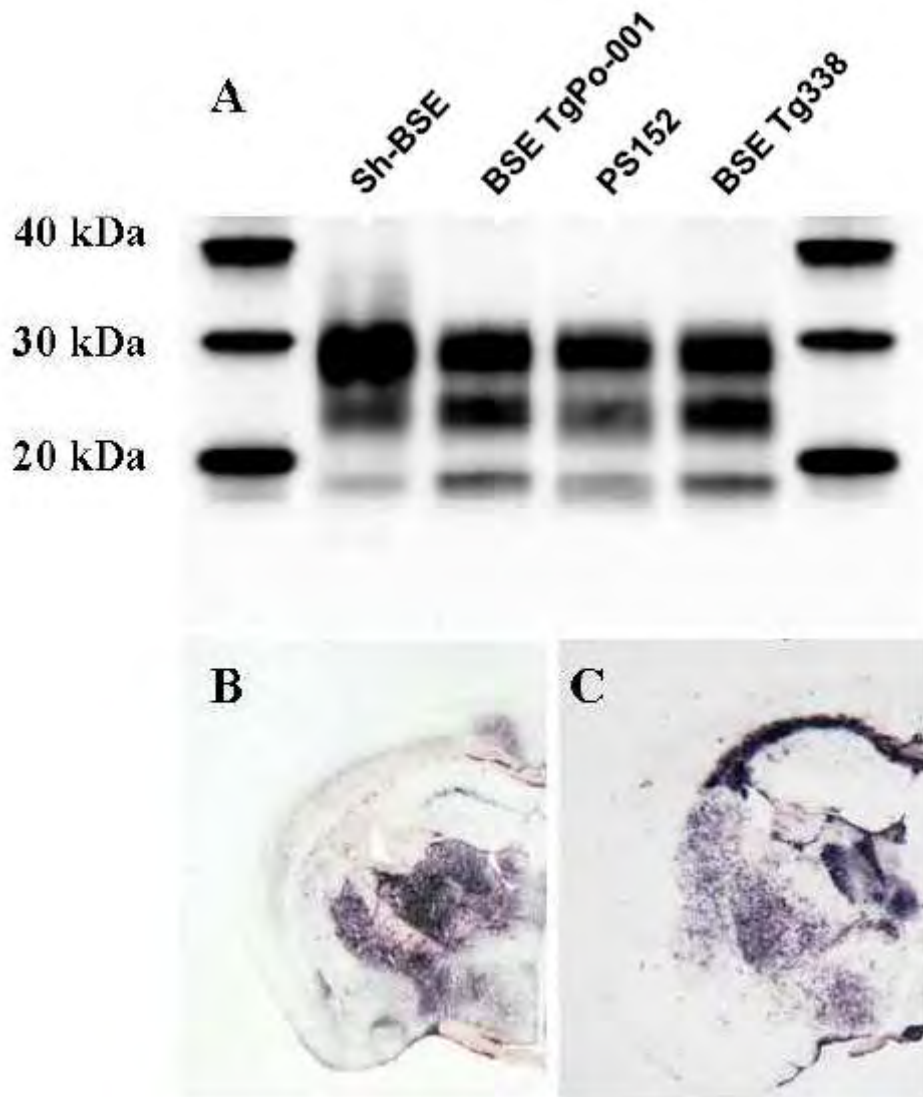


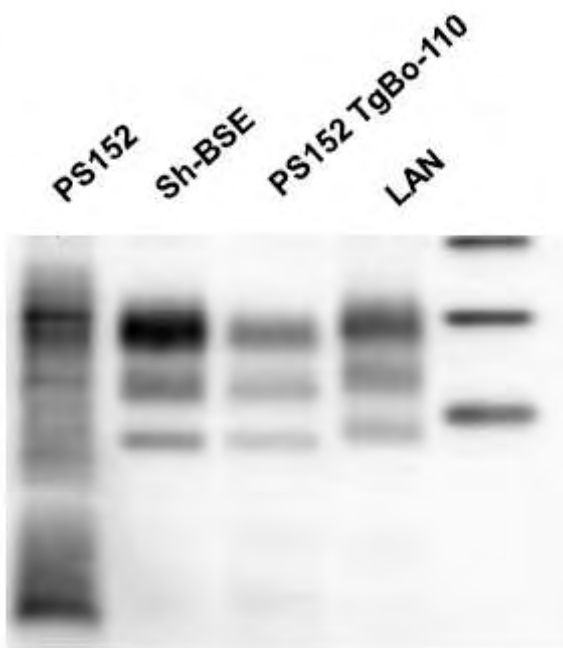
Figure 4



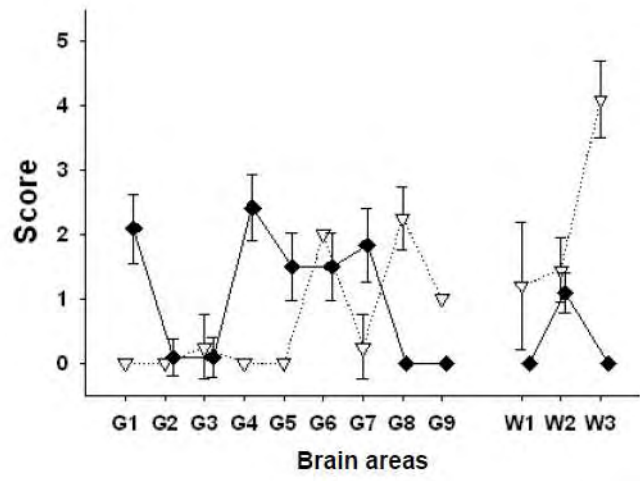


**Figure 5**

**A**



**B**



**Figure 6**

# Scrapie prions propagate in Human PrP expressing mice

Caroline Lacroux<sup>1\*</sup>, Juan Maria Torres<sup>2\*</sup>, Hervé Cassard<sup>1</sup>, Sylvie.Benestad<sup>3</sup>, Frédéric.Lantier<sup>4</sup>,  
Séverine Luga<sup>1</sup>, Isabelle Lantier<sup>4</sup>, Pierrette Costes<sup>1</sup>, Juan Carlos Espinosa<sup>2</sup> and Olivier  
Andréoletti<sup>1†</sup>

<sup>1</sup> *UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles 31076 Toulouse, France*

<sup>2</sup> *Centro de Invetigacion en Sanidad Animal, 28130 Valdeolmos, Spain*

<sup>3</sup> *National Veterinary Institute, Oslo, Norway*

<sup>4</sup> *INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, 37380 Nouzilly, France*

**Brevia are brief contributions (600 to 800 words including references, notes and captions) accompanied by one illustration or table that must be contained on one printed page. Authors should also submit an abstract of 100 words or less that will appear online only. Materials and methods should be included in [supplementary materials](#) (up to 500 words and one figure/table).**

\*: both authors contributed equally

†Corresponding author: O. Andreoletti

[o.andreoletti@envt.fr](mailto:o.andreoletti@envt.fr)

**Transgenic mice that express the methionine and/or valine 129 variant of the human PrP protein were intracerebrally challenged with four different sheep scrapie isolates. A low attack rate and/or abnormal prion protein accumulation was observed after first or second passage of these isolates. Scrapie positive human PrP expressing mice displayed a similar strain phenotype to those inoculated with certain sporadic Creutzfeldt Jakob disease isolates. These results indicate that scrapie could have a zoonotic potential. They also raise new questions about the potential link between animal and human prions.**

Dietary exposure to the bovine spongiform encephalopathy (BSE) agent is considered to be the cause of variant Creutzfeldt-Jakob (vCJD) disease in humans. While scrapie agents have been circulating for centuries in small ruminants, a limited number of epidemiological studies failed to demonstrate a link with human prion disease. This apparent lack of zoonotic transmission is considered to be a consequence of the species-barrier that naturally limits Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) agents' propagation from one species to another. It is now established that the host prion protein (PrP) amino-acid sequence is the major determinant of the species barrier phenomenon and mice genetically engineered to express human prion protein are considered to be a relevant source of information for gauging the relative permeability of the human species barrier (1, 2).

In this study, mice expressing the methionine (tgMet<sub>129</sub>) or the valine (tgVal<sub>129</sub>) variants at codon 129 of the human PrP, and their cross-bred (tgMet/Val<sub>129</sub>), were intracerebrally (IC) inoculated with a panel of human, cattle and sheep TSE isolates (see method and supplementary table).

On first passage, 100% of the mice inoculated with sporadic Creutzfeldt-Jakob (sCJD, n=3) brain homogenate from methionine homozygote patients developed a clinical TSE. Variant-CJD (n=1) propagated only in tgMet<sub>129</sub> and tgMet/Val<sub>129</sub> (figure 1a). No reduction of the

incubation period was observed on second passage of sCJD and vCJD isolates, indicating the absence of a measurable species barrier.

In tgMet<sub>129</sub> and tgMet/Val<sub>129</sub> mice challenged with cattle BSE isolates (n=2), a very low or null transmission was observed in first passage. The attack rate significantly increased on second passage (supplementary table). No transmission or PrP<sup>res</sup> accumulation was observed in tgVal<sub>129</sub>. These results concur with those previously reported in similar human PrP expressing mouse models (1, 2) and indicate the existence of a substantial species barrier that limits the cattle BSE transmission to human PrP expressing hosts.

In parallel, groups of the same human PrP expressing mice were inoculated with four different sheep scrapie isolates. On first passage, none of the inoculated mice challenged with the sheep isolates developed a clinical disease. However low but consistent level of PrP<sup>res</sup> was detected in the brain of three tgMet/Val<sub>129</sub> mice that were inoculated with two different scrapie isolates (figure 1b). Despite the lack of transmission, brains collected from first passage in tgMet<sub>129</sub> mice were re-inoculated into tgMet<sub>129</sub> (6 per isolate). These bioassays are still incomplete at the time of writing (550 days post inoculation), but some animals (n=3) challenged with two other scrapie isolates have already developed clinical TSE and PrP<sup>res</sup> was detected in their brain by Western Blot (WB) (figure 1c, d). Neither clinical TSE nor abnormal PrP (PrP<sup>res</sup>) were observed in mice inoculated with PBS or healthy controls' brain homogenates, which indicate that Human PrP transgenic mice do not develop spontaneous prion disease.

In positive scrapie challenged tgMet<sub>129</sub> mice, the PrP<sup>res</sup> WB banding pattern clearly differed from those observed in the original sheep isolates (figure 1e). In contrast sCJD and scrapie PrP<sup>res</sup> positive TgMet<sub>129</sub> mice shared similar WB banding patterns (figure 1c, d) and also displayed an identical abnormal PrP distribution pattern in the brain (figure 1f). Further

experiments will be necessary to confirm that the prion(s) which propagated in human PrP expressing mice following scrapie inoculation are biologically identical, or different, to sCJD agent(s). However, the results already obtained combined with previously reported scrapie transmission in Primates (3) support the contention that certain scrapie agents could have similar abilities to cattle BSE with regard to crossing the human species barrier

## References

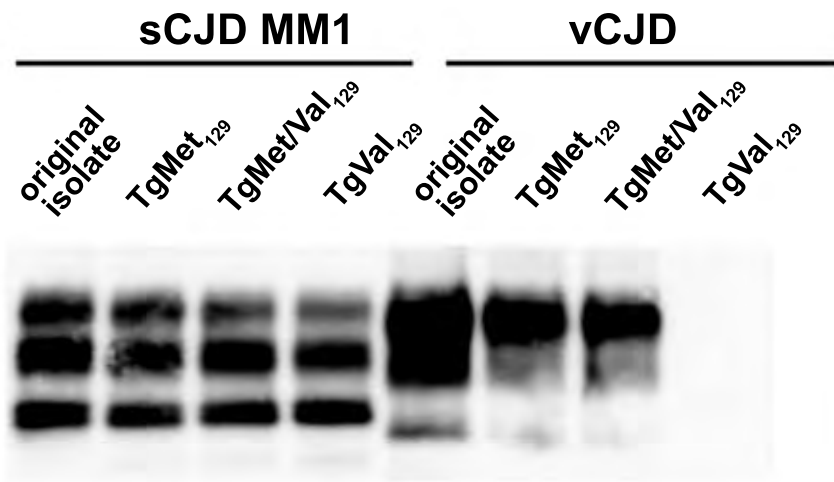
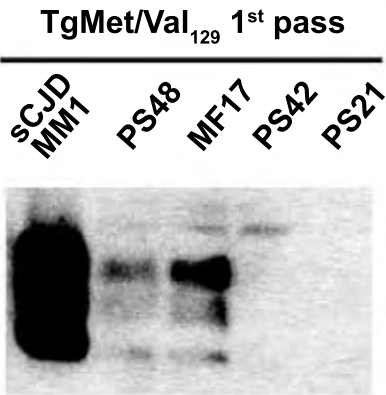
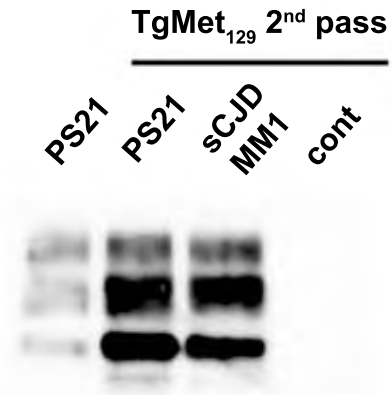
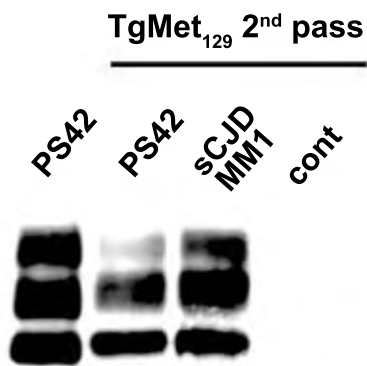
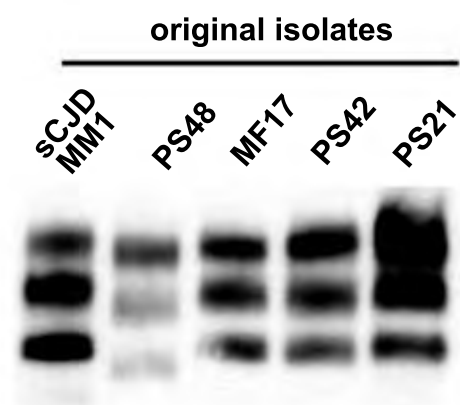
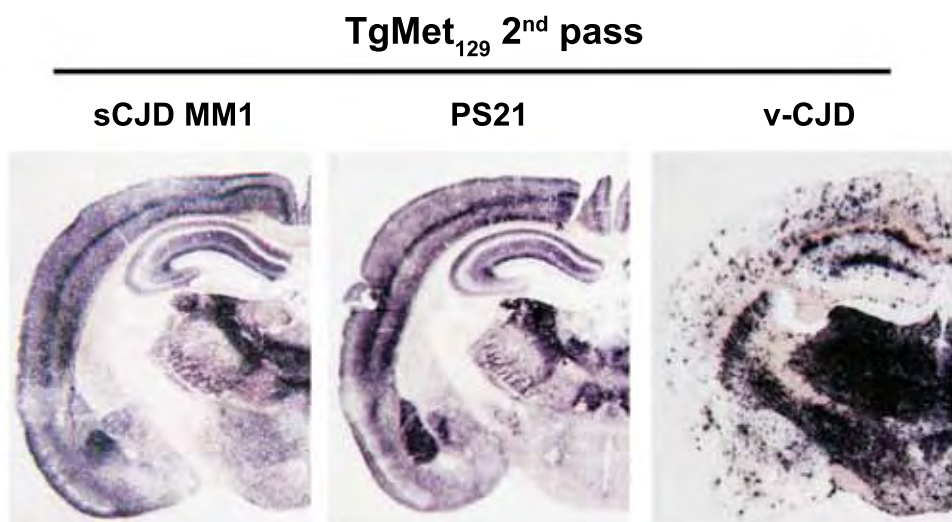
1. E. A. Asante *et al.*, Dissociation of pathological and molecular phenotype of variant Creutzfeldt-Jakob disease in transgenic human prion protein 129 heterozygous mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10759 (Jul 11, 2006).
2. D. Padilla *et al.*, Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog* **7**, e1001319 (Mar).
3. H. F. Baker, R. M. Ridley, G. A. Wells, Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec* **132**, 403 (Apr 17, 1993).

## Acknowledgments

*This work was funded by the EU FP7 project 'Priority' and the UK Food Standards Agency grant M03043.*

**figure 1. Western Blot detection and distribution of abnormal PrP in the brain of transgenic mice that express human PrP.**

Transgenic mice that over-express the methionine (tgMet<sub>129</sub>) or the valine (tgVal<sub>129</sub>) variants at codon 129 of the human PrP, and their cross-bred (tgMet/Val<sub>129</sub>) were inoculated with healthy human brain controls (cont), sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease (sCJD) and variant CJD (vCJD) isolates. The same mice lines were challenged with four different sheep scrapie isolates (MF17-PS21-PS42 and PS48). In clinically affected or found dead mice, abnormal PrP detection was carried out by Western Blot (**a-e**) and/or Paraffin Embedded Tissue Blot (**f**) of the brain (Sha31 antibody; epitope: <sub>145</sub>YEDRYYRE<sub>152</sub>).

**a****b****c****d****e****f**



## **Methods**

### **TSE isolates**

Human sCJD and variant CJD samples were obtained from the United-Kingdom National CJD surveillance unit (Edinburgh Scotland). According to United Kingdom regulation patients families' written consent was obtained for the use of this biological material. Cattle BSE and sheep scrapie isolates are field clinical cases that were collected in France between 1996 and 2001. The four scrapie isolates corresponded to sheep from four different breeds and flocks. Sheep harboured either ARQ/ARQ (MF17, PS21) or VRQ/VRQ (PS42, PS48) polymorphisms at codons 136, 154 and 171 of the *PrP* gene. They were aged between 2 and 6 years old when they developed clinical scrapie. They were selected for this experiment because they displayed different phenotypes after transmission in ovine PrP expressing transgenic mice (incubation period and vacuolar lesion profile) (to be published elsewhere).

### **Mouse bioassay**

Mouse bioassays were carried out in human PrP transgenic mice expressing either the methionine (TgMet<sub>129</sub>) or the valine (TgVal<sub>129</sub>) variants at codon 129 of the human *PrP* gene. Both lines were homozygote for the transgene, and heterozygote Methionie/Valine mice (TgMet/Val<sub>129</sub>) were obtained by cross breeding them. The tgMet<sub>129</sub> (Tg340) mouse line was already described by Padilla et al.(1). The TgVal<sub>129</sub> was obtained using the same construction. Both TgMet<sub>129</sub> and TgVal<sub>129</sub> lines express the same level of PrP<sup>C</sup> (as assessed by immunometric assay) in their brain. Groups of mice were intra-cerebrally inoculated with 10% brain homogenates (20µL). Mice were clinically monitored until the occurrence of TSE clinical signs, at which time they were culled. CNS was collected from each mouse and individually analyzed by Western blot (WB). In euthanized mice, half of the brain was

formalin fixed for conventional histology. In found dead animals all the brain tissue was frozen. Brain were collected and handled under strict TSE sterile conditions.

### **PrP<sup>Sc</sup> Western-blot detection (WB)**

A Western blot kit (TeSeE Western Blot, Bio-Rad) was used following the manufacturer's recommendations. Immunodetection was performed using Sha31 which recognizes the 145-152 sequence of PrP (YEDRYYYRE) (2), conjugated to horseradish peroxidase (at 0,06 µg per ml). Peroxidase activity was revealed using ECL substrate (Pierce).

### **Paraffin-embedded tissue blot (PET blot)**

PET blot was performed using a method previously described (3, 4). Immunodetection was carried out using Sha31 monoclonal antibody (4µg/ml), followed by application of an alkaline phosphatase labeled secondary antibody (Dako ref D0314 – 1/500 diluted). Enzymatic activity was revealed using NBT/BCIP substrate chromogen.

## **References**

1. D. Padilla *et al.*, Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog* **7**, e1001319 (Mar).
2. C. Feraudet *et al.*, Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP<sup>Sc</sup> replication in infected cells. *J Biol Chem* **280**, 11247 (Mar 25, 2005).
3. W. J. Schulz-Schaeffer *et al.*, The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* **156**, 51 (2000).
4. W. M. Wemheuer *et al.*, Similarities between forms of sheep scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease are encoded by distinct prion types. *Am J Pathol* **175**, 2566 (Dec, 2009).

**Supplementary table:** Intracerebral inoculation of transgenic mice that express the methionine (tgMet<sub>129</sub>) or valine (tgVal<sub>129</sub>) variants at codon 129 of the human PrP, and their cross-bred (tgMet/Val<sub>129</sub>) with a panel of human, bovine and ovine TSE isolates.

Isolate	origin	Tg Met <sub>129</sub>				TgMet/Val <sub>129</sub>		TgVal <sub>129</sub>	
		Passage 1		Passage 2		Passage 1		Passage 1	
		Positive mice	Incubation (dpi±SD)	Positive mice	Incubation (dpi±SD)	Positive mice	Incubation (dpi±SD)	Positive mice	Incubation (dpi±SD)
sCJD MM1	Hu	6/6	210±17	6/6	219±7	6/6	243±14	6/6	327±19
sCJD MM1	Hu	6/6	221±7	6/6	200±11	6/6	297±11	6/6	377±14
sCJD MM1	Hu	6/6	230±13	6/6	201±11	6/6	267±10	6/6	315±7
vCJD	Hu	6/6	595±25	6/6	581±45	6/6	615±65	0/6	>750
BSE	Bov	0/6	>750	3/6	572±64	0/6	>750	0/6	>750
BSE	Bov	1/6	739	6/6	633±32	0/6	>750	0/6	>750
MF17	Ov	0/6	>750	0/6 <sup>†</sup>	-	2/6	743 <sup>‡</sup> , 760 <sup>‡</sup>	0/6	>750
PS21	Ov	0/6	>750	2/6 <sup>†</sup>	369,579	0/6	>750	0/6	>750
PS48	Ov	0/6	>750	0/6 <sup>†</sup>		1/6	708 <sup>‡</sup>	0/6	>750
PS42	Ov	0/6	>750	1/6 <sup>†</sup>	475	0/6	>750	0/6	>750
Control brain	Hu	0/12	>750	0/12	>750	0/12	>750	0/12	>750
	Ov	0/12	>750	0/12	>750	0/12	>750	0/12	>750
PBS control		0/18	>800	ND		0/12	>750	0/12	>750

Mice groups (n=6) from each of the three human PrP transgenic mice were intra-cerebrally (20µL per mouse) challenged with 10% brain homogenate from (i) sporadic Creutzfeldt-Jakob (sCJD) variant Creutzfeldt Jakob (vCJD) methionine homozygous patients, (ii) bovine (Bov) spongiform encephalopathy-affected cattle, (iii) ovine (Ov) scrapie cases (MF17, PS21, PS48 and PS42). After first passage, clinically affected TgMet<sub>129</sub> or asymptomatic mice that had lived for more than 500 days post inoculation were pooled and used for second passage in tgMet<sub>129</sub>. (†) indicate still ongoing second passage (over 500 days post inoculation). Mice were considered positive when abnormal PrP deposition was detected in the brain. (‡) indicate abnormal PrP animals found dead animals without symptoms. Incubation periods are shown as mean±SD except when less than 50% of mice were found positive. In that case incubation period of the positive mice are individually presented.



## **DISCUSSION**



## **1 PrP<sup>Sc</sup> ET DIVERSITE DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES: UN MIROIR AUX ALOUETTES ?**

La diversité des tableaux cliniques et lésionnels associés aux EST a rapidement conduit à l'élaboration de « classifications » des cas, reposant sur ces critères phénotypiques. En l'absence de connaissances précises sur l'étiologie de ces maladies, l'idée sous-jacente était que la variabilité des phénotypes clinico-lésionnels observés chez les individus atteints d'EST pouvait refléter la diversité des agents responsables. Pendant près de cinquante ans, une large part des travaux consacrés aux EST a ainsi consisté à explorer cette diversité de manière indirecte, en répertoriant les différents phénotypes biologiques naturels ou obtenus lors de bio-essais sur rongeurs conventionnels.

L'avènement du concept de prion et la découverte de la PrP ont bouleversé cette situation. La corrélation entre le phénotype biologique de certains isolats de prion et les propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> associée, a suggéré que cette protéine était le support de l'information de « souche » et de la diversité biologique des agents des EST<sup>48</sup>.

Toutefois, comme l'illustrent nos travaux sur les propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> dans les cas de MCJ sporadique (Uro-Coste et *al.*, 2008), il n'est pas toujours possible d'établir une relation cohérente entre les divers critères phénotypiques utilisés pour caractériser les agents d'EST.

Actuellement, la classification des cas de MCJ sporadique repose (i) sur le génotype *PRNP* au codon 129 des patients atteints (M/V) et (ii) sur la mobilité électrophorétique de la forme non glycosylée de la PrP anormale après digestion par la protéinase K et western blot (PrP<sup>res</sup> de type 1 ou 2)<sup>445</sup>. La concordance entre les groupes définis selon ces deux critères et les divers profils clinico-lésionnels des patients suggère de distinguer des agents différents sur la base de la dichotomie PrP<sup>res</sup> de type 1/PrP<sup>res</sup> de type 2. Cependant, comme nous avons contribué à le démontrer, la diversité biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> ne semble pas se résumer à cette simple dichotomie.

Le premier argument est l'hétérogénéité des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> parmi les isolats de MCJ sporadique contenant un seul type de PrP<sup>res</sup>. Nous avons ainsi pu distinguer deux sous-groupes biochimiques parmi les isolats classés « type 1 » (sous-groupe 1 : MM1/MV1 et sous-groupe 3 : VV1) ou « type 2 » (sous-groupe 2 : MV2/VV2 et sous-groupe 4 : MM2). En outre, l'étude des cas de MCJ iatrogène démontre sans ambiguïté que le profil de migration de la PrP<sup>res</sup> n'est pas corrélé à la résistance à la digestion par la PK de la partie

N-terminale de la PrP<sup>Sc</sup>. A titre d'exemple, dans notre panel, les quatre sous-groupes de PrP<sup>Sc</sup> que nous avons définis étaient représentés parmi les isolats contenant uniquement de la PrP<sup>res</sup> de type 1.

Le second argument sur l'insuffisance de la dichotomie PrP<sup>res</sup> de type 1/PrP<sup>res</sup> de type 2 repose sur l'uniformité des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> extraite de l'encéphale d'individus porteurs des deux types de PrP<sup>res</sup>, dans une ou plusieurs zones de leur encéphale. Ce phénomène a été également décrit par une autre équipe, lors de travaux visant à évaluer la résistance de la PrP<sup>Sc</sup> (issues de cas MM) à la dégradation par la PK après dénaturation par le GdnHCl (*conformation stability immunoassay*)<sup>103, 201</sup>. Dans cette étude, les propriétés de PrP<sup>Sc</sup> issue d'isolats « mixtes » étaient intermédiaires entre celles de la PrP<sup>Sc</sup> provenant d'isolats de « type 1 » et de la PrP<sup>Sc</sup> provenant d'isolats de « type 2 », suggérant l'intervention de trois agents différents.

## **2 QUELLE DIVERSITE BIOLOGIQUE POUR LES AGENTS RESPONSABLES DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB SPORADIQUE?**

Même si ces résultats suggèrent de s'interroger sur la pertinence des critères biochimiques utilisés actuellement pour classer les cas de MCJ sporadique, faut-il pour autant rejeter en bloc les conclusions de Parchi sur la diversité des agents responsables de MCJ sporadique?

Depuis les travaux de Dickinson au NPU (*Neuropathogenesis Unit*)<sup>163</sup>, la transmission d'isolats d'EST à des souris conventionnelles s'est imposée comme la méthode de référence pour caractériser les prions et leurs propriétés biologiques. Toutefois, l'incapacité à propager de manière efficace la plupart des isolats de MCJ sporadique dans ces modèles est apparue comme un handicap insurmontable pour l'exploration de la diversité biologique des agents responsables. Bien que la MCJ sporadique soit transmissible aux primates non humains, les contraintes lourdes liées à ces modèles n'ont pas permis d'utiliser ces animaux à une échelle suffisante (nombre d'individus, nombre d'isolats) pour en tirer des résultats significatifs<sup>209</sup>.

Les lignées murines transgéniques pour le gène *PRNP* humain<sup>17, 44, 45, 313, 438, 558</sup> ont permis de surmonter ces difficultés (abaissement/abolition de la barrière d'espèce). L'inoculation à des souris transgéniques pour le gène *PRNP* humain de huit isolats de MCJ sporadique appartenant aux différentes catégories établies par Parchi, a permis de mettre en évidence des



similitudes entre les phénotypes biologiques (durée d'incubation, profil lésionnel, répartition anatomique de la PrP<sup>Sc</sup>) et biochimiques (type de PrP<sup>res</sup>) des isolats MM1 et MV1 d'une part et des isolats MV2 et VV2 d'autre part <sup>56</sup>. En outre, pour un isolat VV1, des caractères distincts de souche ont été observés ; la propagation dans ces modèles de deux isolats MM2 « corticaux » s'est avérée difficile, à la différence d'un isolat MM2 « thalamique » <sup>56, 405</sup>. De la même façon, des isolats MM1/MV1, VV2/MV2 et MM2 « cortical » ont pu être distingués sur la base de leurs propriétés biologiques respectives chez le singe écureuil et le campagnol<sup>426, 448</sup>.

Ces résultats suggèrent l'existence d'au moins cinq souches de MCJ sporadique, associées respectivement aux cas MM1/MV1, MV2/VV2, MM2 « corticaux », MM2 « thalamiques » et VV1. Ainsi malgré ses incohérences sur le plan biochimique, la classification clinico-lésionnelle de Parchi pourrait refléter, au moins en partie, la diversité des agents impliqués. Le faible nombre d'isolats et les limites intrinsèques des modèles animaux (souris *knock in* dont la durée de vie pourrait être potentiellement inférieure à la durée d'incubation de la maladie) nous incitent cependant à ne pas tirer de conclusions définitives à partir de ces données. Des travaux supplémentaires, à l'aide de souris transgéniques sur-exprimant différents variants du gène *PRNP* humain <sup>44, 45, 438</sup> devraient permettre de dépasser ces limites et d'améliorer notre perception de la diversité biologique des agents responsables de la MCJ.

Par ailleurs, la même approche pourrait être utilisée pour déterminer la nature du ou des agents présents chez les cas porteurs à la fois de PrP<sup>res</sup> de types 1 et 2. Les phénotypes clinico-lésionnels de ces patients sont, la plupart du temps, intermédiaires entre ceux observés chez les patients de même génotype *PRNP* et porteurs uniquement de PrP<sup>res</sup> de type 1 ou de PrP<sup>res</sup> de type 2 <sup>103, 447, 449</sup>. Ces observations pourraient être attribuées à un phénomène d'interférence entre deux souches co-infectantes. Pourtant, l'inoculation d'isolats MM1+2 (n=4) à des singes écureuil a permis d'obtenir un seul phénotype (profil lésionnel, répartition anatomique de la PrP<sup>Sc</sup>), similaire à celui observé avec des isolats MM1 ou MV1 <sup>448</sup>.

### 3 BARRIERES DE TRANSMISSION ET EVOLUTION DES AGENTS DES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES : DU CONCEPT A LA REALITE SANITAIRE

L'évolution des agents des EST lors de transmission interspécifique a été largement démontrée chez les rongeurs conventionnels. Certaines souches « murinisées » de prion acquièrent, lors de transmission interspécifique, un phénotype radicalement différent de celui de la souche originelle. Ainsi, le passage en série de la souche murine 22C sur le hamster, puis sa ré-inoculation à la souris entraîne l'émergence d'une nouvelle souche (22H/M), identifiable par sa durée d'incubation et son profil lésionnel <sup>304</sup>.

Ce phénomène dépend à la fois de la nature de la souche considérée mais également de la séquence PrP de l'hôte récepteur. Par exemple, la souche 139A (stable chez la souris), est modifiée lors d'un passage en série sur le hamster, tandis qu'elle demeure stable lors d'un passage en série sur le rat <sup>297</sup>. En revanche, la souche ME7 conserve un phénotype extrêmement stable chez la souris, même après plusieurs passages intermédiaires chez le hamster <sup>304</sup>.

Les mécanismes moléculaires expliquant l'évolution des propriétés des agents d'EST ne sont pas connus avec précision. Un modèle dit « de sélection conformationnelle », calqué sur le concept de quasi-espèce virale et cohérent avec la théorie de la « protéine seule », a été proposé pour expliquer les observations réalisées *in vivo* et *in vitro* <sup>135, 137</sup>.

Dans ce contexte, l'émergence de nouveaux prions chez des souris transgéniques pour le gène *PRNP* porcine ou bovine, inoculées avec un isolat de tremblante atypique ovine (Espinosa et *al.*, 2009), paraît peu originale. Toutefois, dans notre travail, c'est la nature du prion utilisé et des agents ayant émergé de ces expériences de transmission, qui se révèle intéressante.

La tremblante atypique a été identifiée pour la première fois en Norvège en 1998 <sup>40</sup>. Suite à la démonstration de la transmissibilité de l'ESB aux petits ruminants, un programme européen de dépistage des EST ovines et caprines a été instauré dès 2002. Ce programme a permis de mettre en évidence la présence de la tremblante atypique dans la plupart des états membres de l'UE <sup>181, 182</sup>, y compris dans des pays où aucun cas n'avait été suspecté auparavant <sup>152, 203, 434, 435</sup>. La prévalence apparente (nombre d'animaux positifs/nombre d'animaux testés) de la

tremblante atypique en Europe a ainsi été estimée entre 0.5 et 1 ‰ et semble relativement stable, quel que soit le pays considéré <sup>154, 181</sup>.

La mise en place de dispositifs similaires de surveillance a permis de détecter cette EST dans des pays extra-européens, tels que les Etats-Unis <sup>357</sup>, le Canada <sup>400</sup> ou les îles Malouines <sup>178</sup>. En outre, deux cas de tremblante atypique ont été récemment rapportés dans des pays jusqu'alors considérés par l'OIE comme indemnes d'EST : l'Australie et la Nouvelle-Zélande<sup>305</sup>. Le cas néo-zélandais a été identifié *post-mortem* chez un ovin alors que le cas australien a été confirmé suite à une suspicion clinique.

Ces données épidémiologiques suggèrent fortement que la tremblante atypique est présente dans tous les pays détenant une population significative de petits ruminants.

L'existence de cas de tremblante atypique antérieurs à la mise en place des mesures de maîtrise des risques de diffusion des agents des EST animales (dépistage, interdiction de l'utilisation des farines de viande et d'os dans l'alimentation des animaux destinés à la consommation humaine, retrait systématique des matériels à risque spécifié) est longtemps restée hypothétique. L'examen rétrospectif de banques de tissus a permis de démontrer que cette maladie était présente au Royaume-Uni dès les années 1980 <sup>88, 582</sup>. Cette observation, même si elle demeure isolée et ne permet pas de proposer une estimation de la prévalence passée de la tremblante atypique, suggère que les populations humaines et animales ont probablement été exposées à l'agent responsable de cette EST depuis de nombreuses années. Dès lors, il semblait pertinent d'évaluer la capacité de transmission interspécifique de cet agent.

Lors de nos travaux, la transmission d'un isolat de tremblante atypique à des hôtes exprimant une PrP bovine ou porcine a conduit à l'émergence d'au moins deux souches de prion.

Le prion obtenu chez les souris transgéniques pour le gène *PRNP* porcine est, selon toute vraisemblance, l'agent de l'ESB. Alors que l'éradication de cette EST est considérée comme proche en Europe, la possibilité de voir émerger l'agent responsable à partir d'un prion *a priori* sans caractère commun avec celui-ci et présent à l'état naturel dans les populations de petits ruminants, est relativement préoccupante. Dans le contexte actuel, où, sous la pression des acteurs économiques et des filières de productions, les mesures de maîtrise des risques de transmission des prions entre espèces animales sont progressivement levées (réintroduction progressive des protéines animales dans la chaîne alimentaire animale), nos résultats

soulèvent la question de notre capacité à anticiper ou à détecter dans le futur une possible réémergence de cette maladie.

L'échec de transmission d'isolats de tremblante atypique à des souris exprimant la PrP humaine à des niveaux physiologiques a récemment été rapporté <sup>604</sup>. Bien que rassurantes, ces données doivent pourtant être considérées avec une certaine circonspection. En effet les modèles de souris utilisés (*knock-in*) dans ces travaux sont relativement peu efficaces pour propager des prions humains <sup>56</sup>, ce qui limite sans doute leur pertinence pour l'évaluation de la capacité des prions animaux à se transmettre à l'Homme. Au-delà de ces incertitudes, nos résultats indiquent que l'agent de la tremblante atypique pourrait acquérir un potentiel zoonotique à l'occasion de la transmission au porc. Toutefois, cette hypothèse ne pourra être renforcée qu'avec la démonstration de la transmissibilité de l'agent de la tremblante atypique adapté à l'espèce porcine à des souris transgéniques surexprimant le gène *PRNP* humain.

#### **4 POTENTIEL ZONOTIQUE DES PRIONS RESPONSABLES DE TREMBLANTE CLASSIQUE ET RISQUES SANITAIRES ASSOCIES**

A ce jour, l'ESB classique est la seule EST animale dont le caractère zoonotique est définitivement établi. L'exposition alimentaire massive des populations humaines à l'agent responsable de cette maladie a conduit, dès 1996, à l'émergence du vMCJ chez l'Homme. Si un lien entre l'épidémie d'ESB et l'apparition du vMCJ a rapidement été suspecté, la démonstration formelle d'une cause commune à ces deux EST s'est avérée longue et complexe. Dans un premier temps, la transmission expérimentale, d'isolats d'ESB classique et de vMCJ à des souris conventionnelles a permis d'identifier des signatures biologiques similaires (durée d'incubation, profil lésionnel) chez les animaux inoculés, indiquant une probable identité des agents responsables de ces deux maladies <sup>85</sup>. Ces résultats ont été complétés par les données issues d'enquêtes épidémiologiques mais ce n'est qu'au début des années 2000 que cette hypothèse a été définitivement validée grâce à des bio-essais réalisés sur macaques (*Macaca fascicularis*) <sup>332</sup> et sur souris transgéniques pour le gène *PRNP* bovin <sup>511</sup> ou humain <sup>17</sup>

Les difficultés rencontrées pour confirmer que l'agent de l'ESB classique était bien responsable d'une forme humaine d'EST amènent à s'interroger sur notre capacité à suspecter

et à identifier un risque zoonotique, qui pourrait être associé à une forme endémique ou bien émergente d'EST dans les populations animales.

L'EST humaine la plus fréquente, la MCJ sporadique, survient principalement chez des individus âgés avec une incidence relativement faible (environ 1 cas/million d'individus dans la population générale)<sup>323</sup>. La cause de cette EST demeure jusqu'à présent inconnue. Aucun facteur de risque environnemental majeur n'a pu être associé à la MCJ sporadique lors d'études cas-témoins<sup>595</sup>. Toutefois, étant donné l'âge tardif d'apparition de cette maladie il semble difficile d'exclure avec certitude certains facteurs de risque tels que la consommation de produits d'origine animale (vecteurs potentiels d'exposition à des agents d'EST)<sup>121, 175, 384, 571</sup>. La prévalence apparente de la MCJ sporadique est comparable dans les pays où les EST animales sont endémiques et dans ceux où ces maladies semblent rares. Cette observation a conduit à considérer que tout lien entre MCJ sporadique et prions animaux pouvait être écarté<sup>205, 323, 442, 599</sup>. La démonstration récente de la présence de la tremblante atypique en Nouvelle Zélande et en Australie, malgré leur statut indemne d'EST, démontre clairement les limites de ce type d'argument.

Au-delà de ces aspects épidémiologiques le potentiel zoonotique des agents des EST animales autres que l'ESB classique a d'abord été évalué à l'aide de primates, animaux considérés comme des modèles pertinents pour la transmission à l'Homme. En effet, historiquement, après de nombreuses tentatives infructueuses de transmission à divers modèles animaux, la transmissibilité du kuru a été démontrée par l'équipe de Gajdusek suite à l'inoculation d'homogénats de cerveaux issus de patients humains à des chimpanzés puis à différentes autres espèces de singes<sup>198, 199</sup>.

La réceptivité/sensibilité des primates non-humains à la tremblante classique a ainsi été testée par inoculation soit (i) de matériel cérébral provenant directement de petits ruminants, soit (ii) d'isolats de tremblante propagés au préalable et de manière itérative à un ou plusieurs hôtes intermédiaires.

L'isolat ovin *Compton*, passé 9 fois chez la chèvre puis 8 fois chez la souris, a induit une EST clinique chez le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) après 5 ans d'incubation<sup>206</sup>. D'autres espèces telles que le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le singe vert (*Clorocebus sabaues*) et le chimpanzé (*Pan troglodytes*) ont semblé moins permissives. Après 3 passages supplémentaires chez le hamster, ce même isolat a été également transmis par voie

intracérébrale et par voie orale au singe écureuil (*Saimiri sciureus*) avec des durées respectives d'incubation de 14 et 25-32 mois<sup>209</sup>. Dans cette espèce, des durées d'incubation similaires ont été observées avec des isolats de MCJ sporadique inoculés par les mêmes voies<sup>207</sup>. Ces résultats sont toutefois difficiles à interpréter dans la mesure où les passages intermédiaires chez les rongeurs pourraient avoir altéré les propriétés de l'isolat de départ. Par ailleurs, l'isolat *Compton* passé uniquement chez la chèvre et un isolat ovin américain n'ont pas provoqué de maladie chez le chimpanzé ou le macaque (rhésus et cynomolgus) après 4 ans d'observation, alors qu'un isolat de tremblante ovine provenant du Royaume-Uni (PG 85/02) a pu être transmis directement par voie intra-cérébrale au ouistiti commun (*Callithrix jacchus*), avec une période d'incubation plus courte que celle de l'ESB<sup>23</sup>.

Face à ces données parcellaires, nos résultats chez les souris transgéniques exprimant la PrP humaine (M/M<sub>129</sub> ou M/V<sub>129</sub>) permettent d'enrichir la discussion sur les risques zoonotiques potentiels des prions d'origine ovine. Nous avons en effet démontré sans ambiguïté la capacité d'un panel d'isolats de tremblante classique à se propager dans ces modèles animaux. La faible efficacité de transmission (nombre d'animaux cliniquement atteints ou chez lesquels de la PrP<sup>res</sup> a pu être détectée) que nous avons observée lors de deux passages successifs indique néanmoins l'existence d'une forte barrière de transmission, pouvant expliquer qu'aucune autre équipe de recherche n'ait à ce jour rapporté de résultats équivalents. Toutefois, le fait que la transmission ait été observée pour au moins quatre isolats différents suggère que cette propriété biologique ne peut être considérée comme exceptionnelle.

Est-il réellement possible d'extrapoler les résultats obtenus chez des souris transgéniques surexprimant le gène *PRNP* humain et inoculées par voie intracérébrale avec un isolat contenant un titre infectieux élevé, à des humains exposés par voie orale à une ou plusieurs doses infectieuses probablement moindres ?

L'inoculation en parallèle de plusieurs isolats bovins d'ESB à ces souris permet d'atténuer ces doutes. En effet, la consommation de produits bovins contaminés par l'agent de l'ESB étant considérée comme la cause du vMCJ, il semble cohérent d'utiliser cet agent comme témoin de la capacité d'un prion animal à contaminer l'Homme. Toutefois, ce témoin ne permet pas de lever toutes les interrogations sur la pertinence des résultats obtenus. La capacité relative d'un prion à se propager par voie intracérébrale ou par voie périphérique chez un hôte donné est très variable en fonction des souches. A titre d'exemple chez le hamster, 40000 DL<sub>50</sub> par voie

intracérébrale (IC) de la souche 263K sont équivalents à 1 DL<sub>50</sub> par voie intrapéritonéale (IP) alors que, chez la souris CW, 1 DL<sub>50</sub> IP de la souche 139A équivaut en moyenne à 430 DL50 par voie IC<sup>297, 300</sup>. Il semble donc impossible, à partir de nos seuls résultats, d'estimer le risque de contamination humaine associés à une exposition orale aux agents de la tremblante classique.

L'un des aspects les plus troublants de nos résultats est la similitude entre le phénotype observé chez les souris inoculées avec les isolats de tremblante classique et le phénotype obtenu chez les souris inoculées avec des isolats de MCJ. A l'instar de ce que nous avons observé avec la tremblante atypique chez les souris transgéniques pour le gène *PRNP* porcine (émergence de l'ESB, seul agent apparemment transmissible à l'espèce porcine), le passage de la barrière de transmission humaine entraînerait l'émergence d'un agent particulièrement adapté à son nouvel hôte. Même s'il est tentant d'en déduire que la MCJ sporadique pourrait être due à une contamination par des prions ovins, les éléments dont nous disposons actuellement sont encore insuffisants pour l'affirmer avec certitude. En effet les similitudes observées pourraient être le fruit d'une simple convergence phénotypique des agents de la MCJ sporadique et de la tremblante classique dans les modèles murins utilisés. D'autres expériences telles qu'un troisième passage dans les mêmes modèles ou chez des souris transgéniques surexprimant la PrP ovine (ex : Tg338) ou murine (Tga20) ou encore chez le campagnol sont donc indispensables pour trancher entre ces deux hypothèses.

Dans l'attente de ces nouveaux essais, nos données apportent la preuve du concept qu'une propagation zoonotique d'un agent d'EST animale autre que celui de l'ESB est possible. Cet état de fait contraste avec la volonté politique affichée par les autorités sanitaires européennes de lever progressivement les mesures mises en place après l'épidémie d'ESB et visant à limiter l'exposition des populations humaines aux prions d'origine animale.





## **ANNEXE**



**Tableau 1 :** Modèles murins transgéniques pour le gène *PRNP* (d'après [236] et [175])

Espèce dont la PrP est exprimée	Dénomination de la lignée	Transgène	Vecteur	Niveau d'expression de la PrP	Références
Souris	Tga20	MoPrP-A	phgPrP	10	184
Souris	TG 94	MoPrP-B	CosSHa.Tet	4	265
Souris	TG 117	MoPrP-B	CosSHa.Tet	4	265
Souris	Tg4053/FVB	MoPrP-A	CosSHa.Tet	8	109
Souris	Tg46 MloxP	MloxP Prnp a	CosSHa.Tet	1	370, 371
Souris	Tg37 MloxP	MloxP Prnp a	CosSHa.Tet	3	370, 371
Hamster	Tg7	HaPrP	CosHaPrP	1	265
Hamster	Tg10	HaPrP	CosSHa.Tet	ND	479
Hamster	Tg81	HaPrP	CosHaPrP	1	509
Hamster	Tg71	HaPrP	CosHaPrP	1	509
Hamster	Tg52NSE	HaPrP	promoteur NSE	ND	479
Homme	Tg152	HuPrPV	CosSHa.Tet	4-8	558
Homme	Tg650	HuPrPM	human DNA PAC	5-6	44, 45
Homme	Tg340	HuPrPM	MoPrP.Xho	4	438
Homme	Tg110	HuPrPV	CosSHa.Tet	4-8	557
Homme	Tg440	HuPrPM	CosSHa.Tet	2	558
Homme	Tg35	HuPrPM	CosSHa.Tet	2	17
Homme	Tg45	HuPrPM	CosSHa.Tet	4	17

Homme	Tg1	HuPrPM	phgPrP	2	313
Homme	Tg40	HuPrPM	phgPrP	1	313
Ovin/Caprin	TgshpXI	OvPrP allèle ARQ	phgPrP	2-4	320
Ovin/Caprin	TgshpIX	OvPrP allèle ARQ	phgPrP	4-8	320
Ovin/Caprin	Tg301	OvPrP allèle VRQ	sheep DNA BAC	8	575
Ovin/Caprin	Tg335	OvPrP allèle VRQ	BAC insert	1	575
Ovin/Caprin	Tg338	OvPrP allèle VRQ	sheep DNA BAC	8	335, 338
Ovin/Caprin	Tg(ShePrP) 1855	OvPrP allèle ARQ	CosSHa.Tet		591
Ovin/Caprin	Tg(ShePrP) 83669	OvPrP allèle ARQ	CosSHa.Tet		591
Ovin/Caprin	TgovPrP4	OvPrP allèle ARQ	promoteur NSE	3	144
Ovin/Caprin	TgovPrP59	OvPrP allèle ARQ	promoteur NSE	3	141
Porcine	PoTg001	PrP porcin	phgPrP	4	112
Porcine	PoTg027	PrP porcin	phgPrP	16	112
Bovine	TgbovXV	PrP bovin (6 OR)	phgPrP	8	96
Bovine	BoPrP4125	PrP bovin (6 OR)	CosSHa.Tet	8-16	510
Bovine	BoPrP4092	PrP bovin (6 OR)	CosSHa.Tet	8-16	510
Bovine	Tg540	PrP bovin (6 OR)	Promoteur CMV	8-10	43
Bovine	boTg110	PrP bovin (6 OR)	phgPrP	8	111
Bovine	boTg035	PrP bovin (6 OR)	phgPrP	6	111
Bovine	boTg078	PrP bovin (6 OR)	phgPrP	2	111
Bovine	boTg022	PrP bovin (6 OR)	phgPrP	0.5	89
Bovine	boTg004	PrP bovin (5 OR)	phgPrP	0.5	89

Bovine	boTg008	PrP bovin (5 OR)	phgPrP	1	89
Bovine	boTg007	PrP bovin (7 OR)	phgPrP	4	113
Bovine	boTg006	PrP bovin (7 OR)	phgPrP	6	113
Bovine	boTg012	PrP bovin (10 OR)	phgPrP	1	114
Vison	Mk7	PrP vison	CosSHa.Tet	2	605
Vison	Mk45	PrP vison	CosSHa.Tet	1	605
Cervidés	TgCerPrP1536	Cervid PrP	CosSHa.Tet	5	80
Cervidés	TgCerPrP1534	Cervid PrP	CosSHa.Tet	3	80
Cervidés (wapiti)	TgElk	Elk PrP	CosSHa.Tet	2.5	324
Cervidés (wapiti)	TgElkPrP 12577	Elk PrP	CosSHa.Tet	2	544
Cervidés (wapiti)	TgElkPrP 12580	Elk PrP	CosSHa.Tet	2	544
Cervidés (wapiti)	TgElkPrP 3934	Elk PrP	CosSHa.Tet	1.5	544
Cervidés (wapiti)	TgElkPrP 12584	Elk PrP	CosSHa.Tet	3	544
Cervidés (cerf)	TgDePrP 10945	Deer PrP E226K	CosSHa.Tet	1	544
Cervidés (cerf)	TgDePrP 10969	Deer PrP E226K	CosSHa.Tet	1	544
Cervidés (cerf)	Tg line 33	Deer PrP G96	phgPrP	1	389
Cervidés (cerf)	Tg line 60	Deer PrP S96	phgPrP	0.7	389
Cervidés (cerf)	Tg line 15	Deer PrP G96	phgPrP	0.5	389
Cervidés (wapiti)	Tg12	El-PrP-132M	phgPrP	2	313



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





1. **Adams, J.M. and S. Cory** (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**(5381): 1322-1326.
2. **Agrimi, U., G. Ru, F. Cardone, M. Pocchiari, and M. Caramelli** (1999). Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet* **353**(9152): 560-561.
3. **Aguzzi, A. and M. Polymenidou** (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* **116**(2): 313-327.
4. **Aigle, M. and F. Lacroute** (1975). Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet* **136**(4): 327-335.
5. **Akowitz, A., T. Sklaviadis, E.E. Manuelidis, and L. Manuelidis** (1990). Nuclease-resistant polyadenylated RNAs of significant size are detected by PCR in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. *Microb Pathog* **9**(1): 33-45.
6. **Alper, T., D.A. Haig, and M.C. Clarke** (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**(3): 278-284.
7. **Alper, T., W.A. Cramp, D.A. Haig, and M.C. Clarke** (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**(5090): 764-766.
8. **Alper, T. and D.A. Haig** (1968). Protection by anoxia of the scrapie agent and some DNA and RNA viruses irradiated as dry preparations. *J Gen Virol* **3**(2): 157-166.
9. **Alpers, M. and L. Rail** (1971). Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: clinical and aetiological aspects. *Proc Aust Assoc Neurol* **8**(7-15).
10. **Anantharam, V., A. Kanthasamy, C.J. Choi, D.P. Martin, C. Latchoumycandane, J.A. Richt, and A.G. Kanthasamy** (2008). Opposing roles of prion protein in oxidative stress- and ER stress-induced apoptotic signaling. *Free Radic Biol Med* **45**(11): 1530-1541.
11. **Andreoletti, O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. van Keulen, F. Schelcher, J.M. Elsen, and F. Lantier** (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* **81**(Pt 12): 3115-3126.
12. **Andreoletti, O., P. Berthon, E. Levavasseur, D. Marc, F. Lantier, E. Monks, J.M. Elsen, and F. Schelcher** (2002). Phenotyping of protein-prion (PrPsc)-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **50**(10): 1357-1370.
13. **Angers, R.C., H.E. Kang, D. Napier, S. Browning, T. Seward, C. Mathiason, A. Balachandran, D. McKenzie, J. Castilla, C. Soto, J. Jewell, C. Graham, E.A. Hoover, and G.C. Telling** (2010). Prion strain mutation determined by prion protein conformational compatibility and primary structure. *Science* **328**(5982): 1154-1158.
14. **Antoine, N., J.Y. Cesbron, B. Coumans, O. Jolais, W. Zorzi, and E. Heinen** (2000). Differential expression of cellular prion protein on human blood and tonsil lymphocytes. *Haematologica* **85**(5): 475-480.

15. **Arjona, A., L. Simarro, F. Islinger, N. Nishida, and L. Manuelidis** (2004). Two Creutzfeldt-Jakob disease agents reproduce prion protein-independent identities in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8768-8773.
16. **Arsac, J.N., D. Betemps, E. Morignat, C. Feraudet, A. Bencsik, D. Aubert, J. Grassi, and T. Baron** (2009). Transmissibility of atypical scrapie in ovine transgenic mice: major effects of host prion protein expression and donor prion genotype. *PLoS One* **4**(10): e7300.
17. **Asante, E.A., J.M. Linehan, M. Desbruslais, S. Joiner, I. Gowland, A.L. Wood, J. Welch, A.F. Hill, S.E. Lloyd, J.D. Wadsworth, and J. Collinge** (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J* **21**(23): 6358-6366.
18. **Asher, D.M., K.L. Pomeroy, L. Murphy, R.G. Rohwer, C.J. Gibbs, and D.C. Gajdusek**, *Practical inactivation of scrapie agent on surfaces*, in *Abstracts of the IXth International Congress of Infectious and Parasitic Diseases*. 1986: Munich, 20-26 July.
19. **Asher, D.M., K.L. Pomeroy, L. Murphy, C.J. Gibbs, and D.C. Gajdusek**, *Attempts to disinfect surfaces contaminated with etiological agents of the spongiform encephalopathies*, in *Abstracts of the VIIth International Congress of Virology*. 1987: Edmonton, 9-14 August. p. 147.
20. **Atarashi, R., J.M. Wilham, L. Christensen, A.G. Hughson, R.A. Moore, L.M. Johnson, H.A. Onwubiko, S.A. Priola, and B. Caughey** (2008). Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* **5**(3): 211-212.
21. **Bailly, Y., A.M. Haerberle, F. Blanquet-Grossard, S. Chasserot-Golaz, N. Grant, T. Schulze, G. Bombarde, J. Grassi, J.Y. Cesbron, and C. Lemaire-Vieille** (2004). Prion protein (PrP<sup>C</sup>) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain. *J Comp Neurol* **473**(2): 244-269.
22. **Baker, C.A., D. Martin, and L. Manuelidis** (2002). Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J Virol* **76**(21): 10905-10913.
23. **Baker, H.F., R.M. Ridley, and G.A. Wells** (1993). Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec* **132**(16): 403-406.
24. **Balducci, C., M. Beeg, M. Stravalaci, A. Bastone, A. Scip, E. Biasini, L. Tapella, L. Colombo, C. Manzoni, T. Borsello, R. Chiesa, M. Gobbi, M. Salmona, and G. Forloni** (2010). Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(5): 2295-2300.
25. **Balkema-Buschmann, A., U. Ziegler, L. McIntyre, M. Keller, C. Hoffmann, R. Rogers, B. Hills, and M.H. Groschup** (2011). Experimental challenge of cattle with German atypical bovine spongiform encephalopathy (BSE) isolates. *J Toxicol Environ Health A* **74**(2-4): 103-109.
26. **Barclay, G.R., J. Hope, C.R. Birkett, and M.L. Turner** (1999). Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *Br J Haematol* **107**(4): 804-814.

27. **Baron, T., A. Bencsik, A.G. Biacabe, E. Morignat, and R.A. Bessen** (2007). Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model. *Emerg Infect Dis* **13**(12): 1887-1894.
28. **Baron, T., J. Vulin, A.G. Biacabe, L. Lakhdar, J. Verchere, J.M. Torres, and A. Bencsik** (2011). Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice. *PLoS One* **6**(1): e15839.
29. **Baron, T.G., J.Y. Madec, and D. Calavas** (1999). Similar signature of the prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy-linked diseases. *J Clin Microbiol* **37**(11): 3701-3704.
30. **Baron, T.G., J.Y. Madec, D. Calavas, Y. Richard, and F. Barillet** (2000). Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep. *Neurosci Lett* **284**(3): 175-178.
31. **Baron, T.G. and A.G. Biacabe** (2001). Molecular analysis of the abnormal prion protein during coinfection of mice by bovine spongiform encephalopathy and a scrapie agent. *J Virol* **75**(1): 107-114.
32. **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**(5): e1000421.
33. **Barron, R.M., V. Thomson, E. Jamieson, D.W. Melton, J. Ironside, R. Will, and J.C. Manson** (2001). Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers. *EMBO J* **20**(18): 5070-5078.
34. **Baskakov, I.V., G. Legname, M.A. Baldwin, S.B. Prusiner, and F.E. Cohen** (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem* **277**(24): 21140-21148.
35. **Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D.F. Groth, M.P. McKinley, S.B. Prusiner, and C. Weissmann** (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**(3): 417-428.
36. **Beck, K.E., M. Chaplin, M. Stack, R.E. Sallis, S. Simonini, R. Lockey, and J. Spiropoulos** (2010). Lesion profiling at primary isolation in RIII mice is insufficient in distinguishing BSE from classical scrapie. *Brain Pathol* **20**(2): 313-322.
37. **Begara-McGorum, I., L. Gonzalez, M. Simmons, N. Hunter, F. Houston, and M. Jeffrey** (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol* **127**(1): 59-68.
38. **Belt, P.B., I.H. Muileman, B.E. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A.L. Gielkens, and M.A. Smits** (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* **76** ( Pt 3)(509-517).
39. **Bencsik, A., S. Debeer, T. Petit, and T. Baron** (2009). Possible case of maternal transmission of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah. *PLoS One* **4**(9): e6929.
40. **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**(7): 202-208.

41. **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**(4): 19.
42. **Berciano, J., M.T. Berciano, J.M. Polo, J. Figols, J. Ciudad, and M. Lafarga** (1990). Creutzfeldt-Jakob disease with severe involvement of cerebral white matter and cerebellum. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **417**(6): 533-538.
43. **Beringue, V., A. Bencsik, A. Le Dur, F. Reine, T.L. Lai, N. Chenais, G. Tilly, A.G. Biacabe, T. Baron, J.L. Vilotte, and H. Laude** (2006). Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog* **2**(10): e112.
44. **Beringue, V., O. Andreoletti, A. Le Dur, R. Essalmani, J.L. Vilotte, C. Lacroux, F. Reine, L. Herzog, A.G. Biacabe, T. Baron, M. Caramelli, C. Casalone, and H. Laude** (2007). A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci* **27**(26): 6965-6971.
45. **Beringue, V., L. Herzog, F. Reine, A. Le Dur, C. Casalone, J.L. Vilotte, and H. Laude** (2008). Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg Infect Dis* **14**(12): 1898-1901.
46. **Beringue, V., J.L. Vilotte, and H. Laude** (2008). Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res* **39**(4): 47.
47. **Bernoulli, C., J. Siegfried, G. Baumgartner, F. Regli, T. Rabinowicz, D.C. Gajdusek, and C.J. Gibbs, Jr.** (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* **1**(8009): 478-479.
48. **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**(4): 2096-2101.
49. **Bessen, R.A. and R.F. Marsh** (1992). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol* **73** ( Pt 2)(329-334).
50. **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**(12): 7859-7868.
51. **Bessen, R.A., D.A. Kocisko, G.J. Raymond, S. Nandan, P.T. Lansbury, and B. Caughey** (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**(6533): 698-700.
52. **Biacabe, A.G., J.L. Laplanche, S. Ryder, and T. Baron** (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* **5**(1): 110-115.
53. **Billeter, M., R. Riek, G. Wider, S. Hornemann, R. Glockshuber, and K. Wuthrich** (1997). Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7281-7285.
54. **Billette de Villemeur, T., J.P. Deslys, A. Pradel, C. Soubrie, A. Alperovitch, M. Tardieu, J.L. Chaussain, J.J. Hauw, D. Dormont, M. Ruberg, and Y. Agid** (1996). Creutzfeldt-Jakob disease from contaminated growth hormone extracts in France. *Neurology* **47**(3): 690-695.
55. **Billinis, C., V. Psychas, L. Leontides, V. Spyrou, S. Argyroudis, I. Vlemmas, S. Leontides, T. Sklaviadis, and O. Papadopoulos** (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol* **85**(Pt 2): 547-554.

56. **Bishop, M.T., R.G. Will, and J.C. Manson** (2010). Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(26): 12005-12010.
57. **Bolton, D.C., M.P. McKinley, and S.B. Prusiner** (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**(4579): 1309-1311.
58. **Bons, N., N. Mestre-Frances, P. Belli, F. Cathala, D.C. Gajdusek, and P. Brown** (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 4046-4051.
59. **Borchelt, D.R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl, and S.B. Prusiner** (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* **110**(3): 743-752.
60. **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**(23): 16188-16199.
61. **Bossers, A., B.E. Schreuder, I.H. Muileman, P.B. Belt, and M.A. Smits** (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* **77** ( Pt 10)(2669-2673).
62. **Bossers, A., P. Belt, G.J. Raymond, B. Caughey, R. de Vries, and M.A. Smits** (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 4931-4936.
63. **Bounhar, Y., Y. Zhang, C.G. Goodyer, and A. LeBlanc** (2001). Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276**(42): 39145-39149.
64. **Brandel, J.P., M. Preece, P. Brown, E. Croes, J.L. Laplanche, Y. Agid, R. Will, and A. Alperovitch** (2003). Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK. *Lancet* **362**(9378): 128-130.
65. **Brandel, J.P., C.A. Heath, M.W. Head, E. Levavasseur, R. Knight, J.L. Laplanche, J.P. Langeveld, J.W. Ironside, J.J. Hauw, J. Mackenzie, A. Alperovitch, R.G. Will, and S. Haik** (2009). Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain. *Ann Neurol* **65**(3): 249-256.
66. **Brandel, J.P., D. Galanaud, L. Freeman, J.L. Laplanche, and S. Haik** (2010). Variant or sporadic Creutzfeldt-Jakob disease? *Lancet* **375**(9718): 889; author reply 889-890.
67. **Brown, D.R., W.J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar** (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**(1): 104-112.
68. **Brown, D.R., B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar** (1998). Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem* **70**(4): 1686-1693.
69. **Brown, D.R., B.S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S.J. Haswell, and I.M. Jones** (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* **344** Pt 1(1-5).
70. **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**(11): 1308-1312.

71. **Brown, L.R. and D.A. Harris** (2003). Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem* **87**(2): 353-363.
72. **Brown, P., R.G. Rohwer, and D.C. Gajdusek** (1986). Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J Infect Dis* **153**(6): 1145-1148.
73. **Brown, P., P.P. Liberski, A. Wolff, and D.C. Gajdusek** (1990). Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *J Infect Dis* **161**(3): 467-472.
74. **Brown, P., L.G. Goldfarb, F. Cathala, A. Vrbovska, M. Sulima, A. Nieto, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (1991). The molecular genetics of familial Creutzfeldt-Jakob disease in France. *J Neurol Sci* **105**(2): 240-246.
75. **Brown, P., L.G. Goldfarb, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (1991). The phenotypic expression of different mutations in transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur J Epidemiol* **7**(5): 469-476.
76. **Brown, P., E.H. Rau, B.K. Johnson, A.E. Bacote, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (2000). New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3418-3421.
77. **Brown, P.**, Kuru and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, in *Decontamination of Prions*, D. Riesner, et al., Editors. 2012, Düsseldorf university press: Düsseldorf. p. 39-52.
78. **Brown, P., J.P. Brandel, T. Sato, Y. Nakamura, J. MacKenzie, R.G. Will, A. Ladogana, M. Pocchiari, E.W. Leschek, and L.B. Schonberger** (2012). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* **18**(6): 901-907.
79. **Brownell, B. and D.R. Oppenheimer** (1965). An Ataxic Form of Subacute Presenile Polioencephalopathy (Creutzfeldt-Jakob Disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **28**(350-361).
80. **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**(23): 13345-13350.
81. **Bruce, M., A. Chree, I. McConnell, J. Foster, G. Pearson, and H. Fraser** (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **343**(1306): 405-411.
82. **Bruce, M.E. and A.G. Dickinson** (1987). Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol* **68** ( Pt 1)(79-89).
83. **Bruce, M.E., I. McConnell, H. Fraser, and A.G. Dickinson** (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol* **72** ( Pt 3)(595-603).
84. **Bruce, M.E.** (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* **49**(4): 822-838.

85. **Bruce, M.E., R.G. Will, J.W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C.J. Bostock** (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**(6650): 498-501.
86. **Bruce, M.E., A. Boyle, S. Cousens, I. McConnell, J. Foster, W. Goldmann, and H. Fraser** (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol* **83**(Pt 3): 695-704.
87. **Bruce, M.E.** (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull* **66**(99-108).
88. **Bruce, M.E., R. Nonno, J. Foster, W. Goldmann, M. Di Bari, E. Esposito, S.L. Benestad, N. Hunter, and U. Agrimi** (2007). Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. *Vet Rec* **160**(19): 665-666.
89. **Brun, A., A. Gutierrez-Adan, J. Castilla, B. Pintado, F. Diaz-San Segundo, M.J. Cano, E. Alamillo, J.C. Espinosa, and J.M. Torres** (2007). Reduced susceptibility to bovine spongiform encephalopathy prions in transgenic mice expressing a bovine PrP with five octapeptide repeats. *J Gen Virol* **88**(Pt 6): 1842-1849.
90. **Bueler, 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**(6370): 577-582.
91. **Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann** (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**(7): 1339-1347.
92. **Bueler, H., A. Raeber, A. Sailer, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann** (1994). High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* **1**(1): 19-30.
93. **Burger, D. and G.R. Hartsough** (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis* **115**(4): 393-399.
94. **Burns, C.S., E. Aronoff-Spencer, G. Legname, S.B. Prusiner, W.E. Antholine, G.J. Gerfen, J. Peisach, and G.L. Millhauser** (2003). Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* **42**(22): 6794-6803.
95. **Burthem, J., B. Urban, A. Pain, and D.J. Roberts** (2001). The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* **98**(13): 3733-3738.
96. **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.
97. **Buschmann, A., A.G. Biacabe, U. Ziegler, A. Bencsik, J.Y. Madec, G. Erhardt, G. Luhken, T. Baron, and M.H. Groschup** (2004). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* **117**(1): 27-36.
98. **Buschmann, A. and M.H. Groschup** (2005). Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* **192**(5): 934-942.

99. **Buschmann, A., A. Gretzschel, A.G. Biacabe, K. Schiebel, C. Corona, C. Hoffmann, M. Eiden, T. Baron, C. Casalone, and M.H. Groschup** (2006). Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol* **117**(2-4): 103-116.
100. **Cabral, A.L., K.S. Lee, and V.R. Martins** (2002). Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J Biol Chem* **277**(7): 5675-5682.
101. **Caetano, F.A., M.H. Lopes, G.N. Hajj, C.F. Machado, C. Pinto Arantes, A.C. Magalhaes, P. Vieira Mde, T.A. Americo, A.R. Massensini, S.A. Priola, I. Vorberg, M.V. Gomez, R. Linden, V.F. Prado, V.R. Martins, and M.A. Prado** (2008). Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J Neurosci* **28**(26): 6691-6702.
102. **Calella, A.M., M. Farinelli, M. Nuvolone, O. Mirante, R. Moos, J. Falsig, I.M. Mansuy, and A. Aguzzi** (2010). Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* **2**(8): 306-314.
103. **Cali, I., R. Castellani, A. Alsheklee, Y. Cohen, J. Blevins, J. Yuan, J.P. Langeveld, P. Parchi, J.G. Safar, W.Q. Zou, and P. Gambetti** (2009). Co-existence of scrapie prion protein types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: its effect on the phenotype and prion-type characteristics. *Brain* **132**(Pt 10): 2643-2658.
104. **Calzolari, L., D.A. Lysek, D.R. Perez, P. Guntert, and K. Wuthrich** (2005). Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 651-655.
105. **Campana, V., D. Sarnataro, and C. Zurzolo** (2005). The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* **15**(2): 102-111.
106. **Capobianco, R., C. Casalone, S. Suardi, M. Mangieri, C. Miccolo, L. Limido, M. Catania, G. Rossi, G. Di Fede, G. Giaccone, M.G. Bruzzone, L. Minati, C. Corona, P. Acutis, D. Gelmetti, G. Lombardi, M.H. Groschup, A. Buschmann, G. Zanusso, S. Monaco, M. Caramelli, and F. Tagliavini** (2007). Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog* **3**(3): e31.
107. **Capucchio, M.T., F. Guarda, N. Pozzato, S. Coppolino, S. Caracappa, and V. Di Marco** (2001). Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **48**(1): 23-31.
108. **Caramelli, M., G. Ru, C. Casalone, E. Bozzetta, P.L. Acutis, A. Calella, and G. Forloni** (2001). Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Rec* **148**(17): 531-536.
109. **Carlson, G.A., C. Ebeling, S.L. Yang, G. Telling, M. Torchia, D. Groth, D. Westaway, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (1994). Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5690-5694.
110. **Casalone, C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco, and M. Caramelli** (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3065-3070.



111. **Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. Brun, B. Pintado, M.A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F.J. Salguero, C. Sanchez, J.M. Sanchez-Vizcaino, and J.M. Torres** (2003). Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol* **148**(4): 677-691.
112. **Castilla, J., A. Gutierrez-Adan, A. Brun, D. Doyle, B. Pintado, M.A. Ramirez, F.J. Salguero, B. Parra, F.D. Segundo, J.M. Sanchez-Vizcaino, M. Rogers, and J.M. Torres** (2004). Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J Neurosci* **24**(21): 5063-5069.
113. **Castilla, J., A. Gutierrez-Adan, A. Brun, B. Pintado, B. Parra, M.A. Ramirez, F.J. Salguero, F. Diaz San Segundo, A. Rabano, M.J. Cano, and J.M. Torres** (2004). Different behavior toward bovine spongiform encephalopathy infection of bovine prion protein transgenic mice with one extra repeat octapeptide insert mutation. *J Neurosci* **24**(9): 2156-2164.
114. **Castilla, J., A. Gutierrez-Adan, A. Brun, B. Pintado, F.J. Salguero, B. Parra, F.D. Segundo, M.A. Ramirez, A. Rabano, M.J. Cano, and J.M. Torres** (2005). Transgenic mice expressing bovine PrP with a four extra repeat octapeptide insert mutation show a spontaneous, non-transmissible, neurodegenerative disease and an expedited course of BSE infection. *FEBS Lett* **579**(27): 6237-6246.
115. **Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto** (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**(2): 195-206.
116. **Castilla, J., D. Gonzalez-Romero, P. Saa, R. Morales, J. De Castro, and C. Soto** (2008). Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell* **134**(5): 757-768.
117. **Castilla, J., R. Morales, P. Saa, M. Barria, P. Gambetti, and C. Soto** (2008). Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J* **27**(19): 2557-2566.
118. **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**(48): 32230-32235.
119. **Chandler, R.L.** (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**(7191): 1378-1379.
120. **Chandler, R.L. and J. Fisher** (1963). Experimental Transmission of Scrapie to Rats. *Lancet* **2**(7318): 1165.
121. **Chatelain, J., F. Cathala, P. Brown, S. Raharison, L. Court, and D.C. Gajdusek** (1981). Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979. *J Neurol Sci* **51**(3): 329-337.
122. **Chianini, F., N. Fernandez-Borges, E. Vidal, L. Gibbard, B. Pintado, J. de Castro, S.A. Priola, S. Hamilton, S.L. Eaton, J. Finlayson, Y. Pang, P. Steele, H.W. Reid, M.P. Dagleish, and J. Castilla** (2012). Rabbits are not resistant to prion infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(13): 5080-5085.
123. **Chiarini, L.B., A.R. Freitas, S.M. Zanata, R.R. Brentani, V.R. Martins, and R. Linden** (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* **21**(13): 3317-3326.

124. **Chiesa, R., P. Piccardo, B. Ghetti, and D.A. Harris** (1998). Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* **21**(6): 1339-1351.
125. **Chou, S.M. and J.D. Martin** (1971). Kuru-plaques in a case of Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* **17**(2): 150-155.
126. **Clark, A.M. and J.A. Moar** (1992). Scrapie: a clinical assessment. *Vet Rec* **130**(17): 377-378.
127. **Clark, W.W.** (1980). Clinical signs of scrapie in sheep and goats. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* **84**(479-482).
128. **Cloucard, C., P. Beaudry, J.M. Elsen, D. Milan, M. Dussaucy, C. Bounneau, F. Schelcher, J. Chatelain, J.M. Launay, and J.L. Laplanche** (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* **76** ( Pt 8)(2097-2101).
129. **Cohen, F.E., K.M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R.J. Fletterick, and S.B. Prusiner** (1994). Structural clues to prion replication. *Science* **264**(5158): 530-531.
130. **Colby, D.W. and S.B. Prusiner** (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(1): a006833.
131. **Colling, S.B., J. Collinge, and J.G. Jefferys** (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci Lett* **209**(1): 49-52.
132. **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**(6487): 295-297.
133. **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. *Nature* **383**(6602): 685-690.
134. **Collinge, J., J. Whitfield, E. McKintosh, J. Beck, S. Mead, D.J. Thomas, and M.P. Alpers** (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**(9528): 2068-2074.
135. **Collinge, J. and A.R. Clarke** (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**(5852): 930-936.
136. **Collinge, J., J. Whitfield, E. McKintosh, A. Frosh, S. Mead, A.F. Hill, S. Brandner, D. Thomas, and M.P. Alpers** (2008). A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**(1510): 3725-3739.
137. **Collinge, J.** (2010). Medicine. Prion strain mutation and selection. *Science* **328**(5982): 1111-1112.
138. **Collins, S., C.A. McLean, and C.L. Masters** (2001). Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* **8**(5): 387-397.
139. **Comoy, E., V. Durand, N. Lescoutra-Etcheagaray, S. Freire, E. Correia, M.M. Ruchoux, P. Brown, C.I. Lasmezas, and J.P. Deslys** (2008). vCJD in primate: new insights for blood risk assessment. in *Proceedings Prion 2008*. Madrid: 21.

140. **Comoy, E.E., C. Casalone, N. Lescoutra-Etchegaray, G. Zanusso, S. Freire, D. Marce, F. Auvre, M.M. Ruchoux, S. Ferrari, S. Monaco, N. Sales, M. Caramelli, P. Leboulch, P. Brown, C.I. Lasmezas, and J.P. Deslys** (2008). Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS One* **3**(8): e3017.
141. **Cordier, C., A. Bencsik, S. Philippe, D. Betemps, F. Ronzon, D. Calavas, C. Crozet, and T. Baron** (2006). Transmission and characterization of bovine spongiform encephalopathy sources in two ovine transgenic mouse lines (TgOvPrP4 and TgOvPrP59). *J Gen Virol* **87**(Pt 12): 3763-3771.
142. **Cox, B.** (1965).  $\psi$ , a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity* **20**(505-521).
143. **Criado, J.R., M. Sanchez-Alavez, B. Conti, J.L. Giacchino, D.N. Wills, S.J. Henriksen, R. Race, J.C. Manson, B. Chesebro, and M.B. Oldstone** (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* **19**(1-2): 255-265.
144. **Crozet, 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**(11): 5328-5334.
145. **Cruz-Sanchez, F., J. Lafuente, H.J. Gertz, and G. Stoltenburg-Didinger** (1987). Spongiform encephalopathy with extensive involvement of white matter. *J Neurol Sci* **82**(1-3): 81-87.
146. **Cuillé, J. and P.-L. Chelle** (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* **203**(1552-1554).
147. **Cuillé, J. and P.-L. Chelle** (1938). La tremblante du mouton est-elle déterminée par un virus filtrable? *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* **206**(1687-1688).
148. **Cuillé, J. and P.-L. Chelle** (1939). Transmission expérimentale de la tremblante à la chèvre. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* **208**(1058-1060).
149. **Cutlip, R.C., J.M. Miller, R.E. Race, A.L. Jenny, J.B. Katz, H.D. Lehmkuhl, B.M. DeBey, and M.M. Robinson** (1994). Intracerebral transmission of scrapie to cattle. *J Infect Dis* **169**(4): 814-820.
150. **Cutlip, R.C., J.M. Miller, and H.D. Lehmkuhl** (1997). Second passage of a US scrapie agent in cattle. *J Comp Pathol* **117**(3): 271-275.
151. **Dagleish, M.P., S. Martin, P. Steele, J. Finlayson, S. Siso, S. Hamilton, F. Chianini, H.W. Reid, L. Gonzalez, and M. Jeffrey** (2008). Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy to European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *BMC Vet Res* **4**(17).
152. **De Bosschere, H., S. Roels, S.L. Benestad, and E. Vanopdenbosch** (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec* **155**(22): 707-708.
153. **De Fea, K.A., D.H. Nakahara, M.C. Calayag, C.S. Yost, L.F. Mirels, S.B. Prusiner, and V.R. Lingappa** (1994). Determinants of carboxyl-terminal domain translocation during prion protein biogenesis. *J Biol Chem* **269**(24): 16810-16820.

154. **Del Rio Vilas, V.J., D. Bohning, and R. Kuhnert** (2008). A comparison of the active surveillance of scrapie in the European Union. *Vet Res* **39**(3): 37.
155. **Deleault, N.R., J.C. Geoghegan, K. Nishina, R. Kasczak, R.A. Williamson, and S. Supattapone** (2005). Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* **280**(29): 26873-26879.
156. **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**(23): 9741-9746.
157. **Dell'Omo, G., E. Vannoni, A.L. Vyssotski, M.A. Di Bari, R. Nonno, U. Agrimi, and H.P. Lipp** (2002). Early behavioural changes in mice infected with BSE and scrapie: automated home cage monitoring reveals prion strain differences. *Eur J Neurosci* **16**(4): 735-742.
158. **DeSilva, U., X. Guo, D.M. Kupfer, S.C. Fernando, A.T. Pillai, F.Z. Najjar, S. So, G.Q. Fitch, and B.A. Roe** (2003). Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet Genome Res* **102**(1-4): 89-94.
159. **Deslys, J.P., D. Marce, and D. Dormont** (1994). Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Gen Virol* **75** ( Pt 1)(23-27).
160. **Detwiler, L.A.** (1992). Scrapie. *Rev Sci Tech* **11**(2): 491-537.
161. **Diarra-Mehrpour, M., S. Arrabal, A. Jalil, X. Pinson, C. Gaudin, G. Pietu, A. Pitaval, H. Ripoche, 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**(2): 719-727.
162. **Dickinson, A.G., H. Fraser, and G.W. Outram** (1975). Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature* **256**(5520): 732-733.
163. **Dickinson, A.G.** (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* **44**(209-241).
164. **Dickinson, A.G. and D.M. Taylor** (1978). Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med* **299**(25): 1413-1414.
165. **Dickinson, A.G. and G.W. Outram** (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp* **135**(63-83).
166. **Dickson, D.W. and P. Brown** (1999). Multiple prion types in the same brain: is a molecular diagnosis of CJD possible? *Neurology* **53**(9): 1903-1904.
167. **Diringer, H., H. Gelderblom, H. Hilmert, M. Ozel, C. Edelbluth, and R.H. Kimberlin** (1983). Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* **306**(5942): 476-478.
168. **Dodelet, V.C. and N.R. Cashman** (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* **91**(5): 1556-1561.
169. **Donne, D.G., J.H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, P.E. Wright, and H.J. Dyson** (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13452-13457.

170. **Dossena, S., L. Imeri, M. Mangieri, A. Garofoli, L. Ferrari, A. Senatore, E. Restelli, C. Balducci, F. Fiordaliso, M. Salio, S. Bianchi, L. Fioriti, M. Morbin, A. Pincherle, G. Marcon, F. Villani, M. Carli, F. Tagliavini, G. Forloni, and R. Chiesa** (2008). Mutant prion protein expression causes motor and memory deficits and abnormal sleep patterns in a transgenic mouse model. *Neuron* **60**(4): 598-609.
171. **Drisaldi, B., R.S. Stewart, C. Adles, L.R. Stewart, E. Quaglio, E. Biasini, L. Fioriti, R. Chiesa, and D.A. Harris** (2003). Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol Chem* **278**(24): 21732-21743.
172. **Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A.G. DeVoe, B. Streeten, and D. Cowen** (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **290**(12): 692-693.
173. **EFSA** (2010). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on the results of the EU survey for Chronic Wasting Disease (CWD) in cervids. *EFSA Journal* **8**(10): 1861-1889.
174. **EFSA** (2010). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on BSE/TSE infectivity in small ruminant tissues. *EFSA Journal* **8**(12): 1875-1966.
175. **EFSA** (2011). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Joint scientific opinion on any possible epidemiological or molecular association between TSEs in animals and humans. *EFSA Journal* **9**(1): 1945-2055.
176. **Eigen, M.** (1996). On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol* **4**(6): 216-218.
177. **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**(3): 431-445.
178. **Epstein, V., S. Pointing, and S. Halfacre** (2005). Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet Rec* **157**(21): 667-668.
179. **Espinosa, J.C., O. Andreoletti, J. Castilla, M.E. Herva, M. Morales, E. Alamillo, F.D. San-Segundo, C. Lacroux, S. Lugan, F.J. Salguero, J. Langeveld, and J.M. Torres** (2007). Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. *J Virol* **81**(2): 835-843.
180. **Espinosa, J.C., M.E. Herva, O. Andreoletti, D. Padilla, C. Lacroux, H. Cassard, I. Lantier, J. Castilla, and J.M. Torres** (2009). Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie. *Emerg Infect Dis* **15**(8): 1214-1221.
181. **Fediaevsky, A., S.C. Tongue, M. Noremark, D. Calavas, G. Ru, and P. Hopp** (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res* **4**(19).
182. **Fediaevsky, A., C. Maurella, M. Noremark, F. Ingravalle, S. Thorgeirsdottir, L. Orge, R. Poizat, M. Hautaniemi, B. Liam, D. Calavas, G. Ru, and P. Hopp** (2010). The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet Res* **6**(9).

183. **Fernie, K., P.J. Steele, D.M. Taylor, and R.A. Somerville** (2007). Comparative studies on the thermostability of five strains of transmissible-spongiform-encephalopathy agent. *Biotechnol Appl Biochem* **47**(Pt 4): 175-183.
184. **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**(6): 1255-1264.
185. **Foncin, J., J. Gaches, and F. Cathala** (1980). Transmission iatrogène interhumaine possible de maladie de Creutzfeldt-Jakob avec atteinte des grains du cervelet. *Rev Neurol* **136**(280).
186. **Ford, M.J., L.J. Burton, H. Li, C.H. Graham, Y. Frobert, J. Grassi, S.M. Hall, and R.J. Morris** (2002). A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* **111**(3): 533-551.
187. **Foster, J.D. and A.G. Dickinson** (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec* **123**(1): 5-8.
188. **Foster, J.D., J. Hope, and H. Fraser** (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec* **133**(14): 339-341.
189. **Fraser, H. and A.G. Dickinson** (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* **78**(3): 301-311.
190. **Fraser, H. and A.G. Dickinson** (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* **83**(1): 29-40.
191. **Fraser, H., G.R. Pearson, I. McConnell, M.E. Bruce, J.M. Wyatt, and T.J. Gruffydd-Jones** (1994). Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* **134**(17): 449.
192. **Freir, D.B., A.J. Nicoll, I. Klyubin, S. Panico, J.M. Mc Donald, E. Risse, E.A. Asante, M.A. Farrow, R.B. Sessions, H.R. Saibil, A.R. Clarke, M.J. Rowan, D.M. Walsh, and J. Collinge** (2011). Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun* **2**(336).
193. **Friedman-Levi, Y., Z. Meiner, T. Canello, K. Frid, G.G. Kovacs, H. Budka, D. Avrahami, and R. Gabizon** (2011). Fatal prion disease in a mouse model of genetic E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog* **7**(11): e1002350.
194. **Fuhrmann, M., T. Bittner, G. Mitteregger, N. Haider, S. Moosmang, H. Kretzschmar, and J. Herms** (2006). Loss of the cellular prion protein affects the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem* **98**(6): 1876-1885.
195. **Fukuda, S., Y. Iwamaru, M. Imamura, K. Masujin, Y. Shimizu, Y. Matsuura, Y. Shu, M. Kurachi, K. Kasai, Y. Murayama, S. Onoe, K. Hagiwara, T. Sata, S. Mohri, T. Yokoyama, and H. Okada** (2009). Intraspecies transmission of L-type-like Bovine Spongiform Encephalopathy detected in Japan. *Microbiol Immunol* **53**(12): 704-707.
196. **Gabriel, J.M., B. Oesch, H. Kretzschmar, M. Scott, and S.B. Prusiner** (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 9097-9101.

197. **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**(20): 974-978.
198. **Gajdusek, D.C., C.J. Gibbs, and M. Alpers** (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**(5025): 794-796.
199. **Gajdusek, D.C. and C.J. Gibbs** (1971). Transmission of 2 subacute spongiform encephalopathies of man (Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to the new world monkeys. *Nature* **230**(5296): 588-589.
200. **Gambetti, P., P. Parchi, R.B. Petersen, S.G. Chen, and E. Lugaresi** (1995). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol* **5**(1): 43-51.
201. **Gambetti, P., I. Cali, S. Notari, Q. Kong, W.Q. Zou, and W.K. Surewicz** (2011). Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases. *Acta Neuropathol* **121**(1): 79-90.
202. **Gauczynski, S., J.M. Peyrin, S. Haik, C. Leucht, C. Hundt, R. Rieger, S. Krasemann, J.P. Deslys, D. Dormont, C.I. Lasmezas, and S. Weiss** (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* **20**(21): 5863-5875.
203. **Gavier-Widen, D., M. Noremark, S. Benestad, M. Simmons, L. Renstrom, B. Bratberg, M. Elvander, and C.H. af Segerstad** (2004). Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J Vet Diagn Invest* **16**(6): 562-567.
204. **Geoghegan, J.C., P.A. Valdes, N.R. Orem, N.R. Deleault, R.A. Williamson, B.T. Harris, and S. Supattapone** (2007). Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions. *J Biol Chem* **282**(50): 36341-36353.
205. **Georgsson, G., E. Olafsson, and G. Gudmundsson** (2008). Scrapie of sheep and Creutzfeldt-Jakob disease in Iceland. *Laeknabladid* **94**(7-8): 541-548.
206. **Gibbs, C.J. and D.C. Gajdusek** (1972). Transmission of Scrapie to Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Nature* **236**(5341): 73-74.
207. **Gibbs, C.J., H.L. Amyx, A.E. Bacote, C.L. Masters, and D.C. Gajdusek** (1980). Oral transmission of Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Scrapie to nonhuman primates. *J Infect Dis* **142**(2): 205-208.
208. **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**(3839): 388-389.
209. **Gibbs, C.J., Jr. and D.C. Gajdusek** (1973). Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science* **182**(4107): 67-68.
210. **Gibbs, C.J., Jr., D.C. Gajdusek, and R. Latarjet** (1978). Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(12): 6268-6270.

211. **Giese, A., D.R. Brown, M.H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist, and H.A. Kretzschmar** (1998). Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* **8**(3): 449-457.
212. **Giles, K., D.V. Glidden, R. Beckwith, R. Seoanes, D. Peretz, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (2008). Resistance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to inactivation. *PLoS Pathog* **4**(11): e1000206.
213. **Gimbel, D.A., H.B. Nygaard, E.E. Coffey, E.C. Gunther, J. Lauren, Z.A. Gimbel, and S.M. Strittmatter** (2010). Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* **30**(18): 6367-6374.
214. **Glatzel, M., E. Abela, M. Maissen, and A. Aguzzi** (2003). Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **349**(19): 1812-1820.
215. **Goldfarb, L.G., P. Brown, W.R. McCombie, D. Goldgaber, G.D. Swergold, P.R. Wills, L. Cervenakova, H. Baron, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (1991). Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10926-10930.
216. **Goldfarb, L.G., R.B. Petersen, M. Tabaton, P. Brown, A.C. LeBlanc, P. Montagna, P. Cortelli, J. Julien, C. Vital, W.W. Pendelbury, and et al.** (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* **258**(5083): 806-808.
217. **Goldgaber, D., L.G. Goldfarb, P. Brown, D.M. Asher, W.T. Brown, S. Lin, J.W. Teener, S.M. Feinstone, R. Rubenstein, R.J. Kascsak, and et al.** (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol* **106**(2): 204-206.
218. **Goldmann, W., N. Hunter, J.D. Foster, J.M. Salbaum, K. Beyreuther, and J. Hope** (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(7): 2476-2480.
219. **Goldmann, W., G. O'Neill, F. Cheung, F. Charleson, P. Ford, and N. Hunter** (1999). PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J Gen Virol* **80** ( Pt 8)(2275-2283).
220. **Goldmann, W., F. Houston, P. Stewart, M. Perucchini, J. Foster, and N. Hunter** (2006). Ovine prion protein variant A(136)R(154)L(168)Q(171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *J Gen Virol* **87**(Pt 12): 3741-3745.
221. **Gombojav, A., N. Ishiguro, M. Horiuchi, D. Serjmyadag, B. Byambaa, and M. Shinagawa** (2003). Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J Vet Med Sci* **65**(1): 75-81.
222. **Gomori, A.J., M.J. Partnow, D.S. Horoupian, and A. Hirano** (1973). The ataxic form of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **29**(5): 318-323.
223. **Gonzalez, L., S. Martin, I. Begara-McGorum, N. Hunter, F. Houston, M. Simmons, and M. Jeffrey** (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol* **126**(1): 17-29.



224. **Gonzalez, L., S. Siso, E. Monleon, C. Casalone, L.J. van Keulen, A. Balkema-Buschmann, A. Ortiz-Pelaez, B. Iulini, J.P. Langeveld, C. Hoffmann, J.J. Badiola, M. Jeffrey, and C. Acin** (2010). Variability in disease phenotypes within a single PRNP genotype suggests the existence of multiple natural sheep scrapie strains within Europe. *J Gen Virol* **91**(Pt 10): 2630-2641.
225. **Gordon, W.S.** (1946). Advances in veterinary research. *Vet Rec* **58**(47): 516-525.
226. **Gorodinsky, A. and D.A. Harris** (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J Cell Biol* **129**(3): 619-627.
227. **Gossert, A.D., S. Bonjour, D.A. Lysek, F. Fiorito, and K. Wuthrich** (2005). Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 646-650.
228. **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**(22): 8342-8347.
229. **Graner, E., A.F. Mercadante, S.M. Zanata, O.V. Forlenza, A.L. Cabral, S.S. Veiga, M.A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V.R. Martins, and R.R. Brentani** (2000). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* **76**(1): 85-92.
230. **Graner, E., A.F. Mercadante, S.M. Zanata, V.R. Martins, D.G. Jay, and R.R. Brentani** (2000). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* **482**(3): 257-260.
231. **Green, K.M., J. Castilla, T.S. Seward, D.L. Napier, J.E. Jewell, C. Soto, and G.C. Telling** (2008). Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog* **4**(8): e1000139.
232. **Green, R., C. Horrocks, A. Wilkinson, S.A. Hawkins, and S.J. Ryder** (2005). Primary isolation of the bovine spongiform encephalopathy agent in mice: agent definition based on a review of 150 transmissions. *J Comp Pathol* **132**(2-3): 117-131.
233. **Griffith, J.S.** (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* **215**(5105): 1043-1044.
234. **Griffiths, H.H., I.J. Whitehouse, H. Baybutt, D. Brown, K.A. Kellett, C.D. Jackson, A.J. Turner, P. Piccardo, J.C. Manson, and N.M. Hooper** (2011). Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **286**(38): 33489-33500.
235. **Griffiths, P.C., J. Spiropoulos, R. Lockey, A.C. Tout, D. Jayasena, J.M. Plater, A. Chave, R.B. Green, S. Simonini, L. Thorne, I. Dexter, A. Balkema-Buschmann, M.H. Groschup, V. Beringue, A. Le Dur, H. Laude, and J. Hope** (2010). Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol* **91**(Pt 8): 2132-2138.
236. **Groschup, M.H. and A. Buschmann** (2008). Rodent models for prion diseases. *Vet Res* **39**(4): 32.
237. **Guo, X., D.M. Kupfer, G.Q. Fitch, B.A. Roe, and U. DeSilva** (2003). Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *Anim Genet* **34**(4): 303-305.
238. **Hadlow, W.J.** (1959). Scrapie and kuru. *Lancet* **274**(289-290).

239. **Hadlow, W.J., S.B. Prusiner, R.C. Kennedy, and R.E. Race** (1980). Brain tissue from persons dying of Creutzfeldt-Jakob disease causes scrapie-like encephalopathy in goats. *Ann Neurol* **8**(6): 628-632.
240. **Hainfellner, J.A., S. Brantner-Inthaler, L. Cervenakova, P. Brown, T. Kitamoto, J. Tateishi, H. Diringer, P.P. Liberski, H. Regele, M. Feucht, and et al.** (1995). The original Gerstmann-Straussler-Scheinker family of Austria: divergent clinicopathological phenotypes but constant PrP genotype. *Brain Pathol* **5**(3): 201-211.
241. **Halfmann, R., S. Alberti, and S. Lindquist** (2010). Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends Cell Biol* **20**(3): 125-133.
242. **Hamir, A.N., T. Gidlewski, T.R. Spraker, J.M. Miller, L. Creekmore, M. Crocheck, T. Cline, and K.I. O'Rourke** (2006). Preliminary observations of genetic susceptibility of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) to chronic wasting disease by experimental oral inoculation. *J Vet Diagn Invest* **18**(1): 110-114.
243. **Haraguchi, T., S. Fisher, S. Olofsson, T. Endo, D. Groth, A. Tarentino, D.R. Borchelt, D. Teplow, L. Hood, A. Burlingame, and et al.** (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* **274**(1): 1-13.
244. **Harris, D.A., M.T. Huber, P. van Dijken, S.L. Shyng, B.T. Chait, and R. Wang** (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* **32**(4): 1009-1016.
245. **Harris, D.A., A. Gorodinsky, S. Lehmann, K. Moulder, and S.L. Shyng** (1996). Cell biology of the prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* **207**(77-93).
246. **Harris, D.A.** (2003). Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* **66**(71-85).
247. **Hartsough, G.R. and D. Burger** (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115**(4): 387-392.
248. **Hauw, J.J., V. Sazdovitch, J.L. Laplanche, K. Peoc'h, N. Kopp, J. Kemeny, N. Privat, N. Delasnerie-Laupretre, J.P. Brandel, J.P. Deslys, D. Dormont, and A. Alperovitch** (2000). Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology* **54**(8): 1641-1646.
249. **Hayward, P.A., J.E. Bell, and J.W. Ironside** (1994). Prion protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **20**(4): 375-383.
250. **Heath, C.A., R.A. Barker, T.F. Esmonde, P. Harvey, R. Roberts, P. Trend, M.W. Head, C. Smith, J.E. Bell, J.W. Ironside, R.G. Will, and R.S. Knight** (2006). Dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease: experience from surveillance in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**(7): 880-882.
251. **Heaton, M.P., K.A. Leymaster, B.A. Freking, D.A. Hawk, T.P. Smith, J.W. Keele, W.M. Snelling, J.M. Fox, C.G. Chitko-McKown, and W.W. Laegreid** (2003). Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome* **14**(11): 765-777.

252. **Hegde, R.S., J.A. Mastrianni, M.R. Scott, K.A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, and V.R. Lingappa** (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**(5352): 827-834.
253. **Heidenhain, A.** (1929). Klinische und anatomische Untersuchungen über eine eigenartige organische Erkrankung des Zentralnervensystems im Praesenum. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **118**(49-114).
254. **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**(6650): 448-450, 526.
255. **Hill, A.F., M. Antoniou, and J. Collinge** (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* **80** ( Pt 1)(11-14).
256. **Hill, A.F., S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P.L. Lantos, and J. Collinge** (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10248-10253.
257. **Hill, A.F. and J. Collinge** (2003). Subclinical prion infection in humans and animals. *Br Med Bull* **66**(161-170).
258. **Hill, A.F., S. Joiner, J.D. Wadsworth, K.C. Sidle, J.E. Bell, H. Budka, J.W. Ironside, and J. Collinge** (2003). Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **126**(Pt 6): 1333-1346.
259. **Holscher, C., U.C. Bach, and B. Dobberstein** (2001). Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *J Biol Chem* **276**(16): 13388-13394.
260. **Hope, J., S.C. Wood, C.R. Birkett, A. Chong, M.E. Bruce, D. Cairns, W. Goldmann, N. Hunter, and C.J. Bostock** (1999). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol* **80** ( Pt 1)(1-4).
261. **Horiuchi, M., T. Nemoto, N. Ishiguro, H. Furuoka, S. Mohri, and M. Shinagawa** (2002). Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *J Clin Microbiol* **40**(9): 3421-3426.
262. **Hornemann, S., C. Schorn, and K. Wuthrich** (2004). NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep* **5**(12): 1159-1164.
263. **Hsiao, K., H.F. Baker, T.J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J.D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott, and S.B. Prusiner** (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* **338**(6213): 342-345.
264. **Hsiao, K., Z. Meiner, E. Kahana, C. Cass, I. Kahana, D. Avrahami, G. Scarlato, O. Abramsky, S.B. Prusiner, and R. Gabizon** (1991). Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **324**(16): 1091-1097.
265. **Hsiao, K.K., M. Scott, D. Foster, D.F. Groth, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* **250**(4987): 1587-1590.

266. **Hsiao, K.K., D. Groth, M. Scott, S.L. Yang, H. Serban, D. Rapp, D. Foster, M. Torchia, S.J. Dearmond, and S.B. Prusiner** (1994). Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 9126-9130.
267. **Hsich, G., K. Kenney, C.J. Gibbs, K.H. Lee, and M.G. Harrington** (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* **335**(13): 924-930.
268. **Huillard d'Aignaux, J., D. Costagliola, J. Maccario, T. Billette de Villemeur, J.P. Brandel, J.P. Deslys, J.J. Hauw, J.L. Chaussain, Y. Agid, D. Dormont, and A. Alperovitch** (1999). Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France. *Neurology* **53**(6): 1197-1201.
269. **Hunter, N., J.D. Foster, W. Goldmann, M.J. Stear, J. Hope, and C. Bostock** (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol* **141**(5): 809-824.
270. **Hunter, N., W. Goldmann, J.D. Foster, D. Cairns, and G. Smith** (1997). Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet Rec* **141**(6): 137-140.
271. **Hutter, G., F.L. Heppner, and A. Aguzzi** (2003). No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem* **384**(9): 1279-1285.
272. **Ironside, J.W.** (2000). Pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Virol Suppl* **16**: 143-151.
273. **Jackson, G.S., I. Murray, L.L. Hosszu, N. Gibbs, J.P. Waltho, A.R. Clarke, and J. Collinge** (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8531-8535.
274. **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**(4): 438-450.
275. **Jarrett, J.T. and P.T. Lansbury, Jr.** (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**(6): 1055-1058.
276. **Jeffrey, M. and J.R. Fraser** (2000). Tubulovesicular particles occur early in the incubation period of murine scrapie. *Acta Neuropathol* **99**(5): 525-528.
277. **Jeffrey, M. and L. Gonzalez** (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**(4): 373-394.
278. **Jewell, J.E., M.M. Conner, L.L. Wolfe, M.W. Miller, and E.S. Williams** (2005). Low frequency of PrP genotype 225SF among free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol* **86**(Pt 8): 2127-2134.
279. **Johnson, C., J. Johnson, M. Clayton, D. McKenzie, and J. Aiken** (2003). Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *J Wildl Dis* **39**(3): 576-581.

280. **Jones, S., M. Batchelor, D. Bhelt, A.R. Clarke, J. Collinge, and G.S. Jackson** (2005). Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem J* **392**(Pt 2): 309-312.
281. **Joubert, L., M. Lapras, J. Gastellu, M. Prave, and D. Laurent** (1972). Un foyer de tremblante du mouton en Provence. *Bull Soc Vet Med Comp Lyon* **74**(165-184).
282. **Kahn, S., C. Dube, L. Bates, and A. Balachandran** (2004). Chronic wasting disease in Canada: Part 1. *Can Vet J* **45**(5): 397-404.
283. **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**(5): 1373-1386.
284. **Kaneko, K., D. Peretz, K.M. Pan, T.C. Blochberger, H. Wille, R. Gabizon, O.H. Griffith, F.E. Cohen, M.A. Baldwin, and S.B. Prusiner** (1995). Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11160-11164.
285. **Kaneko, K., M. Vey, M. Scott, S. Pilkuhn, F.E. Cohen, and S.B. Prusiner** (1997). COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2333-2338.
286. **Kascsak, R.J., R. Rubenstein, P.A. Merz, R.I. Carp, H.M. Wisniewski, and H. Diringer** (1985). Biochemical differences among scrapie-associated fibrils support the biological diversity of scrapie agents. *J Gen Virol* **66** ( Pt 8)(1715-1722).
287. **Kascsak, R.J., R. Rubenstein, P.A. Merz, R.I. Carp, N.K. Robakis, H.M. Wisniewski, and H. Diringer** (1986). Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol* **59**(3): 676-683.
288. **Kaski, D., S. Mead, H. Hyare, S. Cooper, R. Jampana, J. Overell, R. Knight, J. Collinge, and P. Rudge** (2009). Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. *Lancet* **374**(9707): 2128.
289. **Katamine, S., N. Nishida, T. Sugimoto, T. Noda, S. Sakaguchi, K. Shigematsu, Y. Kataoka, A. Nakatani, S. Hasegawa, R. Moriuchi, and T. Miyamoto** (1998). Impaired motor coordination in mice lacking prion protein. *Cell Mol Neurobiol* **18**(6): 731-742.
290. **Katscher, F.** (1998). It's Jakob's disease, not Creutzfeldt's. *Nature* **393**(6680): 11.
291. **Kawauchi, Y., T. Kamitani, S. Yagishita, T. Kitamoto, and H. Kishida** (2006). Autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with Met/Val heterozygosity at codon 129 and type 1 protease-resistant prion protein presenting some florid-type plaques and many Kuru plaques in the cerebellum. *Neuropathology* **26**(4): 313-317.
292. **Kellings, K., N. Meyer, C. Mirenda, S.B. Prusiner, and D. Riesner** (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J Gen Virol* **73** ( Pt 4)(1025-1029).
293. **Kellings, K., N. Meyer, C. Mirenda, S.B. Prusiner, and D. Riesner** (1993). Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch Virol Suppl* **7**(215-225).

294. **Kellings, K., S.B. Prusiner, and D. Riesner** (1994). Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **343**(1306): 425-430.
295. **Kim, B.H., H.G. Lee, J.K. Choi, J.I. Kim, E.K. Choi, R.I. Carp, and Y.S. Kim** (2004). The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res* **124**(1): 40-50.
296. **Kim, T.Y., H.J. Shon, Y.S. Joo, U.K. Mun, K.S. Kang, and Y.S. Lee** (2005). Additional cases of Chronic Wasting Disease in imported deer in Korea. *J Vet Med Sci* **67**(8): 753-759.
297. **Kimberlin, R.H. and C. Walker** (1977). Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol* **34**(2): 295-304.
298. **Kimberlin, R.H. and C.A. Walker** (1978). Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J Comp Pathol* **88**(1): 39-47.
299. **Kimberlin, R.H. and C.A. Walker** (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* **39**(3): 487-496.
300. **Kimberlin, R.H., H.J. Field, and C.A. Walker** (1983). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol* **64 Pt 3**(713-716).
301. **Kimberlin, R.H., C.A. Walker, G.C. Millson, D.M. Taylor, P.A. Robertson, A.H. Tomlinson, and A.G. Dickinson** (1983). Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci* **59**(3): 355-369.
302. **Kimberlin, R.H., S. Cole, and C.A. Walker** (1987). Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* **68 ( Pt 7)**(1875-1881).
303. **Kimberlin, R.H. and C.A. Walker** (1988). Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie depend mainly on the dynamics of agent replication within the nervous system and not the lymphoreticular system. *J Gen Virol* **69 ( Pt 12)**(2953-2960).
304. **Kimberlin, R.H., C.A. Walker, and H. Fraser** (1989). The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol* **70 ( Pt 8)**(2017-2025).
305. **Kittelberger, R., M.J. Chaplin, M.M. Simmons, A. Ramirez-Villaescusa, L. McIntyre, S.C. MacDiarmid, M.J. Hannah, J. Jenner, R. Bueno, D. Bayliss, H. Black, C.J. Pigott, and J.S. O'Keefe** (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest* **22**(6): 863-875.
306. **Klatzo, I., D.C. Gajdusek, and V. Zigas** (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest* **8**(4): 799-847.
307. **Kobayashi, A., K. Arima, M. Ogawa, M. Murata, T. Fukuda, and T. Kitamoto** (2008). Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta Neuropathol* **116**(5): 561-566.

308. **Kobayashi, A., N. Sakuma, Y. Matsuura, S. Mohri, A. Aguzzi, and T. Kitamoto** (2010). Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *J Virol* **84**(7): 3230-3238.
309. **Kobayashi, A., K. Mizukoshi, Y. Iwasaki, H. Miyata, Y. Yoshida, and T. Kitamoto** (2011). Co-occurrence of types 1 and 2 PrP(res) in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1. *Am J Pathol* **178**(3): 1309-1315.
310. **Kocisko, D.A., J.H. Come, S.A. Priola, B. Chesebro, G.J. Raymond, P.T. Lansbury, and B. Caughey** (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**(6489): 471-474.
311. **Kocisko, D.A., S.A. Priola, G.J. Raymond, B. Chesebro, P.T. Lansbury, Jr., and B. Caughey** (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9): 3923-3927.
312. **Kong, Q., W.K. Surewicz, R.B. Petersen, W. Zou, S.G. Chen, and P. Gambetti**, Inherited prion diseases, in *Prion Biology and Diseases*, S.B. Prusiner, Editor. 2004, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 673-775.
313. **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**(35): 7944-7949.
314. **Kong, Q., M. Zheng, C. Casalone, L. Qing, S. Huang, B. Chakraborty, P. Wang, F. Chen, I. Cali, C. Corona, F. Martucci, B. Iulini, P. Acutis, L. Wang, J. Liang, M. Wang, X. Li, S. Monaco, G. Zanusso, W.Q. Zou, M. Caramelli, and P. Gambetti** (2008). Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *J Virol* **82**(7): 3697-3701.
315. **Konold, T., Y.H. Lee, M.J. Stack, C. Horrocks, R.B. Green, M. Chaplin, M.M. Simmons, S.A. Hawkins, R. Lockey, J. Spiropoulos, J.W. Wilesmith, and G.A. Wells** (2006). Different prion disease phenotypes result from inoculation of cattle with two temporally separated sources of sheep scrapie from Great Britain. *BMC Vet Res* **2**(31).
316. **Konold, T., G. Bone, A. Vidal-Diez, R. Tortosa, A. Davis, G. Dexter, P. Hill, M. Jeffrey, M.M. Simmons, M.J. Chaplin, S.J. Bellworthy, and C. Berthelin-Baker** (2008). Pruritus is a common feature in sheep infected with the BSE agent. *BMC Vet Res* **4**(16).
317. **Konold, T., G.E. Bone, L.J. Phelan, M.M. Simmons, L. Gonzalez, S. Siso, W. Goldmann, S. Cawthraw, and S.A. Hawkins** (2010). Monitoring of clinical signs in goats with transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Vet Res* **6**(13).
318. **Konold, T., G.E. Bone, D. Clifford, M.J. Chaplin, S. Cawthraw, M.J. Stack, and M.M. Simmons** (2012). Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. *BMC Vet Res* **8**(22).
319. **Kuczius, T. and M.H. Groschup** (1999). Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* **5**(6): 406-418.

320. **Kupfer, L., M. Eiden, A. Buschmann, and M.H. Groschup** (2007). Amino acid sequence and prion strain specific effects on the in vitro and in vivo convertibility of ovine/murine and bovine/murine prion protein chimeras. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 704-713.
321. **Kuwahara, C., A.M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, T. Yokoyama, S. Itohara, and T. Onodera** (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**(6741): 225-226.
322. **Lacroute, F.** (1971). Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J Bacteriol* **106**(2): 519-522.
323. **Ladogana, A., M. Puopolo, E.A. Croes, H. Budka, C. Jarius, S. Collins, G.M. Klug, T. Sutcliffe, A. Giulivi, A. Alperovitch, N. Delasnerie-Laupretre, J.P. Brandel, S. Poser, H. Kretzschmar, I. Rietveld, E. Mitrova, P. Cuesta Jde, P. Martinez-Martin, M. Glatzel, A. Aguzzi, R. Knight, H. Ward, M. Pocchiari, C.M. van Duijn, R.G. Will, and I. Zerr** (2005). Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* **64**(9): 1586-1591.
324. **LaFauci, G., R.I. Carp, H.C. Meeker, X. Ye, J.I. Kim, M. Natelli, M. Cedenio, R.B. Petersen, R. Kasczak, and R. Rubenstein** (2006). Passage of chronic wasting disease prion into transgenic mice expressing Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) PrPC. *J Gen Virol* **87**(Pt 12): 3773-3780.
325. **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**(1): 47-56.
326. **Lang, C.J., J.G. Heckmann, and B. Neundorfer** (1998). Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. *J Neurol Sci* **160**(2): 128-139.
327. **Langeveld, J.P., J.G. Jacobs, J.H. Erkens, A. Bossers, F.G. van Zijderveld, and L.J. van Keulen** (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res* **2**(19).
328. **Laplanche, J.L., J. Chatelain, D. Westaway, S. Thomas, M. Dussaucy, J. Brugere-Picoux, and J.M. Launay** (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* **15**(1): 30-37.
329. **Laroche-Pierre, S., J. Jodoin, and A.C. LeBlanc** (2009). Helix 3 is necessary and sufficient for prion protein's anti-Bax function. *J Neurochem* **108**(4): 1019-1031.
330. **Lasmezas, C.I., J.P. Deslys, R. Demaimay, K.T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside, and J.J. Hauw** (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* **381**(6585): 743-744.
331. **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**(5298): 402-405.
332. **Lasmezas, C.I., J.G. Fournier, V. Nouvel, H. Boe, D. Marce, F. Lamoury, N. Kopp, J.J. Hauw, J. Ironside, M. Bruce, D. Dormont, and J.P. Deslys** (2001). Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 4142-4147.



333. **Lasmezas, C.I., E. Comoy, S. Hawkins, C. Herzog, F. Mouthon, T. Konold, F. Auvre, E. Correia, N. Lescoutra-Etchegaray, N. Sales, G. Wells, P. Brown, and J.P. Deslys** (2005). Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* **365**(9461): 781-783.
334. **Latarjet, R.**, Inactivation of the agents of scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease and kuru by radiations, in *Slow transmissible diseases of the central nervous system*, S.B. Prusiner and W.J. Hadlow, Editors. 1979, Academic Press: New York. p. 387-407.
335. **Laude, H., D. Vilette, A. Le Dur, F. Archer, S. Soulier, N. Besnard, R. Essalmani, and J.L. Vilotte** (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol* **325**(1): 49-57.
336. **Lauren, J., D.A. Gimbel, H.B. Nygaard, J.W. Gilbert, and S.M. Strittmatter** (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**(7233): 1128-1132.
337. **Laurent, M.** (1997). Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases. *FEBS Lett* **407**(1): 1-6.
338. **Le Dur, A., V. Beringue, O. Andreatti, F. Reine, T.L. Lai, T. Baron, B. Bratberg, J.L. Vilotte, P. Sarradin, S.L. Benestad, and H. Laude** (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 16031-16036.
339. **Lee, K.S., A.C. Magalhaes, S.M. Zanata, R.R. Brentani, V.R. Martins, and M.A. Prado** (2001). Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* **79**(1): 79-87.
340. **Lee, Y.H., H.J. Sohn, M.J. Kim, H.J. Kim, W.Y. Lee, E.I. Yun, D.S. Tark, I.S. Cho, and A. Balachandran** (2012). Strain Characterization of the Korean CWD Cases in 2001 and 2004. *J Vet Med Sci*:
341. **Lee, Y.J. and I.V. Baskakov** (2010). Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *J Neurochem* **114**(2): 362-373.
342. **Legname, G., I.V. Baskakov, H.O. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* **305**(5684): 673-676.
343. **Levavasseur, E., I. Laffont-Proust, E. Morain, B.A. Faucheux, N. Privat, K. Peoc'h, V. Sazdovitch, J.P. Brandel, J.J. Hauw, and S. Haik** (2008). Regulating factors of PrP glycosylation in Creutzfeldt-Jakob disease--implications for the dissemination and the diagnosis of human prion strains. *PLoS One* **3**(7): e2786.
344. **Li, A., S. Sakaguchi, R. Atarashi, B.C. Roy, R. Nakaoka, K. Arima, N. Okimura, J. Kopacek, and K. Shigematsu** (2000). Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol* **20**(5): 553-567.
345. **Li, J., S.P. Mahal, C.A. Demczyk, and C. Weissmann** (2011). Mutability of prions. *EMBO Rep* **12**(12): 1243-1250.

346. **Li, R., D. Liu, G. Zanusso, T. Liu, J.D. Fayen, J.H. Huang, R.B. Petersen, P. Gambetti, and M.S. Sy** (2001). The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol* **207**(1): 49-58.
347. **Liberski, P.P., R. Yanagihara, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (1988). Tubulovesicular structures in experimental Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Intervirology* **29**(2): 115-119.
348. **Liberski, P.P., R. Yanagihara, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (1990). Appearance of tubulovesicular structures in experimental Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie precedes the onset of clinical disease. *Acta Neuropathol* **79**(4): 349-354.
349. **Liberski, P.P. and H. Budka** (2004). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. I. Human diseases. *Folia Neuropathol* **42 Suppl B**(120-140).
350. **Ligos, C., M. Jeffrey, S.J. Ryder, S.J. Bellworthy, and M.M. Simmons** (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol* **127**(1): 45-57.
351. **Lin, D.T., J. Jodoin, M. Baril, C.G. Goodyer, and A.C. Leblanc** (2008). Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function. *Biochim Biophys Acta* **1783**(10): 2001-2012.
352. **Linden, R., V.R. Martins, M.A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo, and R.R. Brentani** (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* **88**(2): 673-728.
353. **Liu, T., R. Li, B.S. Wong, D. Liu, T. Pan, R.B. Petersen, P. Gambetti, and M.S. Sy** (2001). Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J Immunol* **166**(6): 3733-3742.
354. **Llewelyn, C.A., P.E. Hewitt, R.S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, and R.G. Will** (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**(9407): 417-421.
355. **Lloyd, S.E., J.M. Linehan, M. Desbruslais, S. Joiner, J. Buckell, S. Brandner, J.D. Wadsworth, and J. Collinge** (2004). Characterization of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice. *J Gen Virol* **85**(Pt 8): 2471-2478.
356. **Lo, R.Y., W.C. Shyu, and H. Li** (2006). Long-duration sCJD with PRNP codon 129 methionine homozygosity and cerebral cortical plaques. *Neurology* **66**(12): 1944-1945.
357. **Loiacono, C.M., B.V. Thomsen, S.M. Hall, M. Kiupel, D. Sutton, K. O'Rourke, B. Barr, L. Anthenill, and D. Keane** (2009). Nor98 scrapie identified in the United States. *J Vet Diagn Invest* **21**(4): 454-463.
358. **Lombardi, G., C. Casalone, D.A. A, D. Gelmetti, G. Torcoli, I. Barbieri, C. Corona, E. Fasoli, A. Farinazzo, M. Fiorini, M. Gelati, B. Iulini, F. Tagliavini, S. Ferrari, M. Caramelli, S. Monaco, L. Capucci, and G. Zanusso** (2008). Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathog* **4**(5): e1000075.

359. **Lopes, M.H., G.N. Hajj, A.G. Muras, G.L. Mancini, R.M. Castro, K.C. Ribeiro, R.R. Brentani, R. Linden, and V.R. Martins** (2005). Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* **25**(49): 11330-11339.
360. **Lopez Garcia, F., R. Zahn, R. Riek, and K. Wuthrich** (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8334-8339.
361. **Lugaresi, E., R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi, and P. Gambetti** (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**(16): 997-1003.
362. **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**(3): 640-645.
363. **Ma, J. and S. Lindquist** (2002). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science* **298**(5599): 1785-1788.
364. **Mabbott, N.A., F. Mackay, F. Minns, and M.E. Bruce** (2000). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* **6**(7): 719-720.
365. **Magalhaes, A.C., J.A. Silva, K.S. Lee, V.R. Martins, V.F. Prado, S.S. Ferguson, M.V. Gomez, R.R. Brentani, and M.A. Prado** (2002). Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**(36): 33311-33318.
366. **Mahal, S.P., E.A. Asante, M. Antoniou, and J. Collinge** (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* **268**(1-2): 105-114.
367. **Mahal, S.P., S. Browning, J. Li, I. Suponitsky-Kroyter, and C. Weissmann** (2010). Transfer of a prion strain to different hosts leads to emergence of strain variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(52): 22653-22658.
368. **Makarava, N. and I.V. Baskakov** (2008). The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J Biol Chem* **283**(23): 15988-15996.
369. **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**(2): 177-187.
370. **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**(5646): 871-874.
371. **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**(3): 202-210.
372. **Manson, J., J.D. West, V. Thomson, P. McBride, M.H. Kaufman, and J. Hope** (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* **115**(1): 117-122.

373. **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**(2-3): 121-127.
374. **Manson, J.C., A.R. Clarke, P.A. McBride, I. McConnell, and J. Hope** (1994). PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* **3**(4): 331-340.
375. **Manson, J.C., E. Jamieson, H. Baybutt, N.L. Tuzi, R. Barron, I. McConnell, R. Somerville, J. Ironside, R. Will, M.S. Sy, D.W. Melton, J. Hope, and C. Bostock** (1999). A single amino acid alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy. *EMBO J* **18**(23): 6855-6864.
376. **Manuelidis, L., T. Sklaviadis, A. Akowitz, and W. Fritch** (1995). Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5124-5128.
377. **Manuelidis, L., W. Fritch, and Y.G. Xi** (1997). Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* **277**(5322): 94-98.
378. **Manuelidis, L.** (2007). A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem* **100**(4): 897-915.
379. **Manuelidis, L., Z.X. Yu, N. Barquero, and B. Mullins** (2007). Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6): 1965-1970.
380. **Manuelidis, L.** (2011). Nuclease resistant circular DNAs copurify with infectivity in scrapie and CJD. *J Neurovirol* **17**(2): 131-145.
381. **Marsh, R.F., R.A. Bessen, S. Lehmann, and G.R. Hartsough** (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol* **72** (Pt 3): 589-594.
382. **Martin, S., L. Gonzalez, A. Chong, F.E. Houston, N. Hunter, and M. Jeffrey** (2005). Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* **86**(Pt 3): 839-848.
383. **Martinez-Lage, J.F., M. Poza, J. Sola, J.G. Tortosa, P. Brown, L. Cervenakova, J.A. Esteban, and A. Mendoza** (1994). Accidental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by dural cadaveric grafts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**(9): 1091-1094.
384. **Masters, C.L., J.O. Harris, D.C. Gajdusek, C.J. Gibbs, Jr., C. Bernoulli, and D.M. Asher** (1979). Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* **5**(2): 177-188.
385. **Matthews, D. and B.C. Cooke** (2003). The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish. *Rev Sci Tech* **22**(1): 283-296.
386. **McBride, P.A., P. Eikelenboom, G. Kraal, H. Fraser, and M.E. Bruce** (1992). PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol* **168**(4): 413-418.

387. **McKinley, M.P., D.C. Bolton, and S.B. Prusiner** (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**(1): 57-62.
388. **McMahon, H.E., A. Mange, N. Nishida, C. Creminon, D. Casanova, and S. Lehmann** (2001). Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J Biol Chem* **276**(3): 2286-2291.
389. **Meade-White, K., B. Race, M. Trifilo, A. Bossers, C. Favara, R. Lacasse, M. Miller, E. Williams, M. Oldstone, R. Race, and B. Chesebro** (2007). Resistance to chronic wasting disease in transgenic mice expressing a naturally occurring allelic variant of deer prion protein. *J Virol* **81**(9): 4533-4539.
390. **Meldrum, K.C.** (1990). Transmission of BSE to a pig. *Vet Rec* **127**(14): 362.
391. **Merz, P.A., R.A. Somerville, H.M. Wisniewski, and K. Iqbal** (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**(1): 63-74.
392. **Merz, P.A., R.A. Somerville, H.M. Wisniewski, L. Manuelidis, and E.E. Manuelidis** (1983). Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **306**(5942): 474-476.
393. **Merz, P.A., H.M. Wisniewski, R.A. Somerville, S.A. Bobin, C.L. Masters, and K. Iqbal** (1983). Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathol* **60**(1-2): 113-124.
394. **Merz, P.A., R.G. Rohwer, R. Kasczak, H.M. Wisniewski, R.A. Somerville, C.J. Gibbs, Jr., and D.C. Gajdusek** (1984). Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* **225**(4660): 437-440.
395. **Merz, P.A., R.J. Kasczak, R. Rubenstein, R.I. Carp, and H.M. Wisniewski** (1987). Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie-associated fibrils. *J Virol* **61**(1): 42-49.
396. **Meyer, A., D. Leigh, and C.E. Bagg** (1954). A rare presenile dementia associated with cortical blindness (Heidenhain's syndrome). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **17**(2): 129-133.
397. **Meyer, N., V. Rosenbaum, B. Schmidt, K. Gilles, C. Mirenda, D. Groth, S.B. Prusiner, and D. Riesner** (1991). Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J Gen Virol* **72** ( Pt 1)(37-49).
398. **Miele, G., A.R. Alejo Blanco, H. Baybutt, S. Horvat, J. Manson, and M. Clinton** (2003). Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr* **11**(1): 1-12.
399. **Millson, G.C., G.D. Hunter, and R.H. Kimberlin** (1976). The physico-chemical nature of the scrapie agent. *Front Biol* **44**(243-266).
400. **Mitchell, G.B., K.I. O'Rourke, N.P. Harrington, A. Soutyrine, M.M. Simmons, S. Dudas, D. Zhuang, H. Laude, and A. Balachandran** (2010). Identification of atypical scrapie in Canadian sheep. *J Vet Diagn Invest* **22**(3): 408-411.
401. **Mitchell, G.B., C.J. Sigurdson, K.I. O'Rourke, J. Algire, N.P. Harrington, I. Walther, T.R. Spraker, and A. Balachandran** (2012). Experimental oral transmission of chronic wasting disease to reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *PLoS One* **7**(6): e39055.

402. **Miura, T., A. Hori-i, and H. Takeuchi** (1996). Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* **396**(2-3): 248-252.
403. **Miura, T., S. Sasaki, A. Toyama, and H. Takeuchi** (2005). Copper reduction by the octapeptide repeat region of prion protein: pH dependence and implications in cellular copper uptake. *Biochemistry* **44**(24): 8712-8720.
404. **Mizutani, T., A. Okumura, M. Oda, and H. Shiraki** (1981). Panencephalopathic type of Creutzfeldt-Jakob disease: primary involvement of the cerebral white matter. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **44**(2): 103-115.
405. **Moda, F., S. Suardi, G. Di Fede, A. Indaco, L. Limido, C. Vimercati, M. Ruggerone, I. Campagnani, J. Langeveld, A. Terruzzi, A. Brambilla, P. Zerbi, P. Fociani, M.T. Bishop, R.G. Will, J.C. Manson, G. Giaccone, and F. Tagliavini** (2012). MM2-Thalamic Creutzfeldt-Jakob Disease: Neuropathological, Biochemical and Transmission Studies Identify a Distinctive Prion Strain. *Brain Pathol* **22**(5): 662-669.
406. **Monari, L., S.G. Chen, P. Brown, P. Parchi, R.B. Petersen, J. Mikol, F. Gray, P. Cortelli, P. Montagna, B. Ghetti, and et al.** (1994). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7): 2839-2842.
407. **Montagna, P., P. Cortelli, P. Avoni, P. Tinuper, G. Plazzi, R. Gallassi, F. Portaluppi, J. Julien, C. Vital, M.B. Delisle, P. Gambetti, and E. Lugaresi** (1998). Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol* **8**(3): 515-520.
408. **Moore, R.C., I.Y. Lee, G.L. Silverman, P.M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S.H. Pasternak, M.A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A.F. Smit, S. Katamine, G.A. Carlson, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.W. Melton, P. Tremblay, L.E. Hood, and D. Westaway** (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* **292**(4): 797-817.
409. **Morales, R., K. Abid, and C. Soto** (2007). The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 681-691.
410. **Moser, M., R.J. Colello, U. Pott, and B. Oesch** (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**(3): 509-517.
411. **Moudjou, M., Y. Frobert, J. Grassi, and C. La Bonnardiere** (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol* **82**(Pt 8): 2017-2024.
412. **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**(5486): 1925-1928.
413. **Mouillet-Richard, S., B. Schneider, E. Pradines, M. Pietri, M. Ermonval, J. Grassi, J.G. Richards, V. Mutel, J.M. Launay, and O. Kellermann** (2007). Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* **1096**(106-119).
414. **Mould, D.L., A.M. Dawson, and W. Smith** (1965). Scrapie in Mice. The Stability of the Agent to Various Suspending Media, Ph and Solvent Extraction. *Res Vet Sci* **6**(151-154).

415. **Nadal, R.C., S.R. Abdelraheim, M.W. Brazier, S.E. Rigby, D.R. Brown, and J.H. Viles** (2007). Prion protein does not redox-silence Cu<sup>2+</sup>, but is a sacrificial quencher of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* **42**(1): 79-89.
416. **Narang, H.K.** (1988). A chronological study of experimental scrapie in mice. *Virus Res* **9**(4): 293-305.
417. **Narang, H.K., D.M. Asher, and D.C. Gajdusek** (1988). Evidence that DNA is present in abnormal tubulofilamentous structures found in scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(10): 3575-3579.
418. **Naslavsky, N., R. Stein, A. Yanai, G. Friedlander, and A. Taraboulos** (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* **272**(10): 6324-6331.
419. **Nazor, K.E., F. Kuhn, T. Seward, M. Green, D. Zwald, M. Purro, J. Schmid, K. Biffiger, A.M. Power, B. Oesch, A.J. Raeber, and G.C. Telling** (2005). Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* **24**(13): 2472-2480.
420. **Neumann, M.A., D.C. Gajdusek, and V. Zigas** (1964). Neuropathologic Findings in Exotic Neurologic Disorders among Natives of the Highlands of New Guinea. *J Neuropathol Exp Neurol* **23**(4): 486-507.
421. **Nicolas, O., R. Gavin, and J.A. del Rio** (2009). New insights into cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* **61**(2): 170-184.
422. **Nicot, S. and T. Baron** (2011). Strain-specific barriers against bovine prions in hamsters. *J Virol* **85**(4): 1906-1908.
423. **Nishida, N., P. Tremblay, T. Sugimoto, K. Shigematsu, S. Shirabe, C. Petromilli, S.P. Erpel, R. Nakaoke, R. Atarashi, T. Houtani, M. Torchia, S. Sakaguchi, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, and S. Katamine** (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**(6): 689-697.
424. **Nishimura, T., A. Sakudo, Y. Hashiyama, A. Yachi, K. Saeki, Y. Matsumoto, M. Ogawa, S. Sakaguchi, S. Itohara, and T. Onodera** (2007). Serum withdrawal-induced apoptosis in ZrchI prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. *Microbiol Immunol* **51**(4): 457-466.
425. **Noinville, S., J.F. Chich, and H. Rezaei** (2008). Misfolding of the prion protein: linking biophysical and biological approaches. *Vet Res* **39**(4): 48.
426. **Nonno, R., M.A. Di Bari, F. Cardone, G. Vaccari, P. Fazzi, G. Dell'Omo, C. Cartoni, L. Ingrosso, A. Boyle, R. Galeno, M. Sbriccoli, H.P. Lipp, M. Bruce, M. Pocchiari, and U. Agrimi** (2006). Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* **2**(2): e12.
427. **O'Rourke, K.I., T.V. Baszler, J.M. Miller, T.R. Spraker, I. Sadler-Riggleman, and D.P. Knowles** (1998). Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J Clin Microbiol* **36**(6): 1750-1755.

428. **O'Rourke, K.I., T.E. Besser, M.W. Miller, T.F. Cline, T.R. Spraker, A.L. Jenny, M.A. Wild, G.L. Zebarth, and E.S. Williams** (1999). PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol* **80** ( Pt 10)(2765-2769).
429. **O'Rourke, K.I., T.V. Baszler, T.E. Besser, J.M. Miller, R.C. Cutlip, G.A. Wells, S.J. Ryder, S.M. Parish, A.N. Hamir, N.E. Cockett, A. Jenny, and D.P. Knowles** (2000). Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* **38**(9): 3254-3259.
430. **O'Rourke, K.I., T.R. Spraker, L.K. Hamburg, T.E. Besser, K.A. Brayton, and D.P. Knowles** (2004). Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1339-1346.
431. **O'Rourke, K.I., T.R. Spraker, D. Zhuang, J.J. Greenlee, T.E. Gidlewski, and A.N. Hamir** (2007). Elk with a long incubation prion disease phenotype have a unique PrPd profile. *Neuroreport* **18**(18): 1935-1938.
432. **Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M.P. McKinley, S.B. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood, and et al.** (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**(4): 735-746.
433. **Okada, H., Y. Iwamaru, M. Kakizaki, K. Masujin, M. Imamura, S. Fukuda, Y. Matsuura, Y. Shimizu, K. Kasai, S. Mohri, and T. Yokoyama** (2011). Properties of L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy in Intraspecies Passages. *Vet Pathol*:
434. **Onnasch, H., H.M. Gunn, B.J. Bradshaw, S.L. Benestad, and H.F. Bassett** (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec* **155**(20): 636-637.
435. **Orge, L., A. Galo, C. Machado, C. Lima, C. Ochoa, J. Silva, M. Ramos, and J.P. Simas** (2004). Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol* **85**(Pt 11): 3487-3491.
436. **Ott, C.M. and V.R. Lingappa** (2004). Signal sequences influence membrane integration of the prion protein. *Biochemistry* **43**(38): 11973-11982.
437. **Owen, J.P., H.C. Rees, B.C. Maddison, L.A. Terry, L. Thorne, R. Jackman, G.C. Whitlam, and K.C. Gough** (2007). Molecular profiling of ovine prion diseases by using thermolysin-resistant PrP<sup>Sc</sup> and endogenous C2 PrP fragments. *J Virol* **81**(19): 10532-10539.
438. **Padilla, D., V. Beringue, J.C. Espinosa, O. Androletti, E. Jaumain, F. Reine, L. Herzog, A. Gutierrez-Adan, B. Pintado, H. Laude, and J.M. Torres** (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog* **7**(3): e1001319.
439. **Pan, K.M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, 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**(23): 10962-10966.



440. **Pan, T., M. Colucci, B.S. Wong, R. Li, T. Liu, R.B. Petersen, S. Chen, P. Gambetti, and M.S. Sy** (2001). Novel differences between two human prion strains revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* **276**(40): 37284-37288.
441. **Pan, T., R. Li, S.C. Kang, M. Pastore, B.S. Wong, J. Ironside, P. Gambetti, and M.S. Sy** (2005). Biochemical fingerprints of prion diseases: scrapie prion protein in human prion diseases that share prion genotype and type. *J Neurochem* **92**(1): 132-142.
442. **Papacostas, S., A. Malikides, M. Petsa, and T. Kyriakides** (2008). Ten-year mortality from Creutzfeldt-Jakob disease in Cyprus. *Eastern Mediterranean Health Journal* **14**(3): 715-719.
443. **Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S.G. Chen, M. Farlow, D.W. Dickson, A.A. Sima, J.Q. Trojanowski, R.B. Petersen, and P. Gambetti** (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **39**(6): 767-778.
444. **Parchi, P., S. Capellari, S. Chin, H.B. Schwarz, N.P. Schecter, J.D. Butts, P. Hudkins, D.K. Burns, J.M. Powers, and P. Gambetti** (1999). A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology* **52**(9): 1757-1763.
445. **Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti, and H. Kretzschmar** (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* **46**(2): 224-233.
446. **Parchi, P., W. Zou, W. Wang, P. Brown, S. Capellari, B. Ghetti, N. Kopp, W.J. Schulz-Schaeffer, H.A. Kretzschmar, M.W. Head, J.W. Ironside, P. Gambetti, and S.G. Chen** (2000). Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10168-10172.
447. **Parchi, P., R. Strammiello, S. Notari, A. Giese, J.P. Langeveld, A. Ladogana, I. Zerr, F. Roncaroli, P. Cras, B. Ghetti, M. Pocchiari, H. Kretzschmar, and S. Capellari** (2009). Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta Neuropathol* **118**(5): 659-671.
448. **Parchi, P., M. Cescatti, S. Notari, W.J. Schulz-Schaeffer, S. Capellari, A. Giese, W.Q. Zou, H. Kretzschmar, B. Ghetti, and P. Brown** (2010). 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* **133**(10): 3030-3042.
449. **Parchi, P. and D. Saverioni** (2012). Molecular pathology, classification, and diagnosis of sporadic human prion disease variants. *Folia Neuropathol* **50**(1): 20-45.
450. **Park, T.S., G.M. Kleinman, and E.P. Richardson** (1980). Creutzfeldt-Jakob disease with extensive degeneration of white matter. *Acta Neuropathol* **52**(3): 239-242.
451. **Parkin, E.T., N.T. Watt, I. Hussain, E.A. Eckman, C.B. Eckman, J.C. Manson, H.N. Baybutt, A.J. Turner, and N.M. Hooper** (2007). Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(26): 11062-11067.

452. **Pattison, I.H., W.S. Gordon, and G.C. Millson** (1959). Experimental production of scrapie in goats. *J Comp Pathol* **69**(300-312).
453. **Pattison, I.H. and G.C. Millson** (1960). Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J Comp Pathol* **70**(182-193).
454. **Pattison, I.H. and G.C. Millson** (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol* **71**(101-109).
455. **Pattison, I.H. and K.M. Jones** (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec* **80**(1): 2-9.
456. **Pauly, P.C. and D.A. Harris** (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**(50): 33107-33110.
457. **Peden, A., L. McCardle, M.W. Head, S. Love, H.J. Ward, S.N. Cousens, D.M. Keeling, C.M. Millar, F.G. Hill, and J.W. Ironside** (2010). Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* **16**(2): 296-304.
458. **Peden, A.H., M.W. Head, D.L. Ritchie, J.E. Bell, and J.W. Ironside** (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**(9433): 527-529.
459. **Peralta, O.A., W.R. Huckle, and W.H. Eyestone** (2011). Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation* **81**(1): 68-77.
460. **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**(7): 519-523.
461. **Peretz, D., M.R. Scott, D. Groth, R.A. Williamson, D.R. Burton, F.E. Cohen, and S.B. Prusiner** (2001). Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci* **10**(4): 854-863.
462. **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**(6): 921-932.
463. **Peretz, D., S. Supattapone, K. Giles, J. Vergara, Y. Freyman, P. Lessard, J.G. Safar, D.V. Glidden, C. McCulloch, H.O. Nguyen, M. Scott, S.J. Dearmond, and S.B. Prusiner** (2006). Inactivation of prions by acidic sodium dodecyl sulfate. *J Virol* **80**(1): 322-331.
464. **Politopoulou, G., J.D. Seebach, M. Schmugge, H.P. Schwarz, and A. Aguzzi** (2000). Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. *Haematologica* **85**(6): 580-587.
465. **Polymenidou, M., K. Stoeck, M. Glatzel, M. Vey, A. Bellon, and A. Aguzzi** (2005). Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol* **4**(12): 805-814.
466. **Porter, D.D., H.G. Porter, and N.A. Cox** (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol* **111**(5): 1407-1410.

467. **Powell, A.D., E.C. Toescu, J. Collinge, and J.G. Jefferys** (2008). Alterations in Ca<sup>2+</sup>-buffering in prion-null mice: association with reduced afterhyperpolarizations in CA1 hippocampal neurons. *J Neurosci* **28**(15): 3877-3886.
468. **Pradines, E., D. Loubet, B. Schneider, J.M. Launay, O. Kellermann, and S. Mouillet-Richard** (2008). CREB-dependent gene regulation by prion protein: impact on MMP-9 and beta-dystroglycan. *Cell Signal* **20**(11): 2050-2058.
469. **Prusiner, S.B., D.F. Groth, S.P. Cochran, F.R. Masiarz, M.P. McKinley, and H.M. Martinez** (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* **19**(21): 4883-4891.
470. **Prusiner, S.B., D.F. Groth, S.P. Cochran, M.P. McKinley, and F.R. Masiarz** (1980). Gel electrophoresis and glass permeation chromatography of the hamster scrapie agent after enzymatic digestion and detergent extraction. *Biochemistry* **19**(21): 4892-4898.
471. **Prusiner, S.B., M.P. McKinley, D.F. Groth, K.A. Bowman, N.I. Mock, S.P. Cochran, and F.R. Masiarz** (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11): 6675-6679.
472. **Prusiner, S.B.** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**(4542): 136-144.
473. **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**(2 Pt 1): 349-358.
474. **Prusiner, S.B., D. Groth, A. Serban, R. Koehler, D. Foster, M. Torchia, D. Burton, S.L. Yang, and S.J. DeArmond** (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10608-10612.
475. **Puckett, C., P. Concannon, C. Casey, and L. Hood** (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* **49**(2): 320-329.
476. **Puoti, G., G. Giaccone, G. Rossi, B. Canciani, O. Bugiani, and F. Tagliavini** (1999). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: co-occurrence of different types of PrP(Sc) in the same brain. *Neurology* **53**(9): 2173-2176.
477. **Race, R. and B. Chesebro** (1998). Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* **392**(6678): 770.
478. **Race, R., K. Meade-White, A. Raines, G.J. Raymond, B. Caughey, and B. Chesebro** (2002). Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication, and adaptation of infectivity during four passages. *J Infect Dis* **186** Suppl 2(S166-170).
479. **Race, R.E., S.A. Priola, R.A. Bessen, D. Ernst, J. Dockter, G.F. Rall, L. Mucke, B. Chesebro, and M.B. Oldstone** (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* **15**(5): 1183-1191.

480. **Raymond, G.J., J. Hope, D.A. Kocisko, S.A. Priola, L.D. Raymond, A. Bossers, J. Ironside, R.G. Will, S.G. Chen, R.B. Petersen, P. Gambetti, R. Rubenstein, M.A. Smits, P.T. Lansbury, Jr., and B. Caughey** (1997). Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* **388**(6639): 285-288.
481. **Raymond, G.J., A. Bossers, L.D. Raymond, K.I. O'Rourke, L.E. McHolland, P.K. Bryant, 3rd, M.W. Miller, E.S. Williams, M. Smits, and B. Caughey** (2000). Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J* **19**(17): 4425-4430.
482. **Redman, C.A., P.G. Coen, L. Matthews, R.M. Lewis, W.S. Dingwall, J.D. Foster, M.E. Chase-Topping, N. Hunter, and M.E. Woolhouse** (2002). Comparative epidemiology of scrapie outbreaks in individual sheep flocks. *Epidemiol Infect* **128**(3): 513-521.
483. **Rezaei, H., Y. Choiset, F. Eghiaian, E. Treguer, P. Mentre, P. Debey, J. Grosclaude, and T. Haertle** (2002). Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *J Mol Biol* **322**(4): 799-814.
484. **Richt, J.A., P. Kasinathan, A.N. Hamir, J. Castilla, T. Sathiyaseelan, F. Vargas, J. Sathiyaseelan, H. Wu, H. Matsushita, J. Koster, S. Kato, I. Ishida, C. Soto, J.M. Robl, and Y. Kuroiwa** (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* **25**(1): 132-138.
485. **Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich** (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* **382**(6587): 180-182.
486. **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**(2): 282-288.
487. **Rivera-Milla, E., B. Oidtmann, C.H. Panagiotidis, M. Baier, T. Sklaviadis, R. Hoffmann, Y. Zhou, G.P. Solis, C.A. Stuermer, and E. Malaga-Trillo** (2006). Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *FASEB J* **20**(2): 317-319.
488. **Robinson, M.M., W.J. Hadlow, T.P. Huff, G.A. Wells, M. Dawson, R.F. Marsh, and J.R. Gorham** (1994). Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* **75** ( Pt 9)(2151-2155).
489. **Rossi, D., A. Cozzio, E. Flechsig, M.A. Klein, T. Rulicke, A. Aguzzi, and C. Weissmann** (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J* **20**(4): 694-702.
490. **Roucou, X., Q. Guo, Y. Zhang, C.G. Goodyer, and A.C. LeBlanc** (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* **278**(42): 40877-40881.
491. **Roucou, X., P.N. Giannopoulos, Y. Zhang, J. Jodoin, C.G. Goodyer, and A. LeBlanc** (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* **12**(7): 783-795.
492. **Rubenstein, R., P.A. Merz, R.J. Kascsak, R.I. Carp, C.L. Scalici, C.L. Fama, and H.M. Wisniewski** (1987). Detection of scrapie-associated fibrils (SAF) and SAF proteins from scrapie-affected sheep. *J Infect Dis* **156**(1): 36-42.

493. **Ryder, S.J., S.A. Hawkins, M. Dawson, and G.A. Wells** (2000). The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J Comp Pathol* **122**(2-3): 131-143.
494. **Saa, P., J. Castilla, and C. Soto** (2006). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem* **281**(46): 35245-35252.
495. **Saborio, G.P., B. Permanne, and C. Soto** (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**(6839): 810-813.
496. **Saeki, K., Y. Matsumoto, Y. Hirota, and T. Onodera** (1996). Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. *Virus Genes* **12**(1): 15-20.
497. **Saeki, K., Y. Matsumoto, and T. Onodera** (1996). Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun* **219**(1): 47-52.
498. **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**(10): 1157-1165.
499. **Sailer, A., H. Bueler, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann** (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**(7): 967-968.
500. **Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto, and T. Noda** (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**(6574): 528-531.
501. **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**(2): 341-354.
502. **Schatzl, H.M., F. Wopfner, S. Gilch, A. von Brunn, and G. Jager** (1997). Is codon 129 of prion protein polymorphic in human beings but not in animals? *Lancet* **349**(9065): 1603-1604.
503. **Schneider, B., V. Mutel, M. Pietri, M. Ermonval, S. Mouillet-Richard, and O. Kellermann** (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13326-13331.
504. **Schoch, G., H. Seeger, J. Bogousslavsky, M. Tolnay, R.C. Janzer, A. Aguzzi, and M. Glatzel** (2006). Analysis of prion strains by PrPSc profiling in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Med* **3**(2): e14.
505. **Schroter, A., I. Zerr, K. Henkel, H.J. Tschampa, M. Finkenstaedt, and S. Poser** (2000). Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **57**(12): 1751-1757.
506. **Schulz-Schaeffer, W.J., S. Tschoke, N. Kranefuss, W. Drose, D. Hause-Reitner, A. Giese, M.H. Groschup, and H.A. Kretzschmar** (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* **156**(1): 51-56.
507. **Scott, A.C., G.A. Wells, M.J. Stack, H. White, and M. Dawson** (1990). Bovine spongiform encephalopathy: detection and quantitation of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain. *Vet Microbiol* **23**(1-4): 295-304.

508. **Scott, J.R. and H. Fraser** (1984). Degenerative hippocampal pathology in mice infected with scrapie. *Acta Neuropathol* **65**(1): 62-68.
509. **Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S.J. DeArmond, D. Westaway, and S.B. Prusiner** (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**(5): 847-857.
510. **Scott, M.R., J. Safar, G. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14279-14284.
511. **Scott, M.R., R. Will, J. Ironside, H.O. Nguyen, P. Tremblay, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15137-15142.
512. **Scott, M.R., D. Peretz, H.O. Nguyen, S.J. Dearmond, and S.B. Prusiner** (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol* **79**(9): 5259-5271.
513. **Seabury, C.M. and J.N. Derr** (2003). Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed. *Cytogenet Genome Res* **102**(1-4): 85-88.
514. **Seuberlich, T., D. Heim, and A. Zurbriggen** (2010). Atypical transmissible spongiform encephalopathies in ruminants: a challenge for disease surveillance and control. *J Vet Diagn Invest* **22**(6): 823-842.
515. **Sigurdson, C.J., E.S. Williams, M.W. Miller, T.R. Spraker, K.I. O'Rourke, and E.A. Hoover** (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* **80** ( Pt 10)(2757-2764).
516. **Sigurdson, C.J., K.P. Nilsson, S. Hornemann, M. Heikenwalder, G. Manco, P. Schwarz, D. Ott, T. Rulicke, P.P. Liberski, C. Julius, J. Falsig, L. Stitz, K. Wuthrich, and A. Aguzzi** (2009). De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1): 304-309.
517. **Silverman, G.L., K. Qin, R.C. Moore, Y. Yang, P. Mastrangelo, P. Tremblay, S.B. Prusiner, F.E. Cohen, and D. Westaway** (2000). Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* **275**(35): 26834-26841.
518. **Simmons, M.M., P. Harris, M. Jeffrey, S.C. Meek, I.W. Blamire, and G.A. Wells** (1996). BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec* **138**(8): 175-177.
519. **Simmons, M.M., T. Konold, H.A. Simmons, Y.I. Spencer, R. Lockey, J. Spiropoulos, S. Everitt, and D. Clifford** (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res* **3**(20).

520. **Simmons, M.M., T. Konold, L. Thurston, S.J. Bellworthy, M.J. Chaplin, and S.J. Moore** (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res* **6**(14).
521. **Simmons, M.M., S.J. Moore, T. Konold, L. Thurston, L.A. Terry, L. Thorne, R. Lockey, C. Vickery, S.A. Hawkins, M.J. Chaplin, and J. Spiropoulos** (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis* **17**(5): 848-854.
522. **Simon, S., J. Nugier, N. Morel, H. Boutal, C. Creminon, S.L. Benestad, O. Andreoletti, F. Lantier, J.M. Bilheude, M. Feyssaguet, A.G. Biacabe, T. Baron, and J. Grassi** (2008). Rapid typing of transmissible spongiform encephalopathy strains with differential ELISA. *Emerg Infect Dis* **14**(4): 608-616.
523. **Simonic, T., S. Duga, B. Strumbo, R. Asselta, F. Ceciliani, and S. Ronchi** (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett* **469**(1): 33-38.
524. **Siso, S., L. Gonzalez, F. Houston, N. Hunter, S. Martin, and M. Jeffrey** (2006). The neuropathologic phenotype of experimental ovine BSE is maintained after blood transfusion. *Blood* **108**(2): 745-748.
525. **Sklaviadis, T., A. Akowitz, E.E. Manuelidis, and L. Manuelidis** (1990). Nuclease treatment results in high specific purification of Creutzfeldt-Jakob disease infectivity with a density characteristic of nucleic acid-protein complexes. *Arch Virol* **112**(3-4): 215-228.
526. **Sklaviadis, T., R. Dreyer, and L. Manuelidis** (1992). Analysis of Creutzfeldt-Jakob disease infectious fractions by gel permeation chromatography and sedimentation field flow fractionation. *Virus Res* **26**(3): 241-254.
527. **Sklaviadis, T., A. Akowitz, E.E. Manuelidis, and L. Manuelidis** (1993). Nucleic acid binding proteins in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12): 5713-5717.
528. **Sklaviadis, T.K., L. Manuelidis, and E.E. Manuelidis** (1989). Physical properties of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* **63**(3): 1212-1222.
529. **Sohn, H.J., J.H. Kim, K.S. Choi, J.J. Nah, Y.S. Joo, Y.H. Jean, S.W. Ahn, O.K. Kim, D.Y. Kim, and A. Balachandran** (2002). A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada. *J Vet Med Sci* **64**(9): 855-858.
530. **Somerville, R.A.** (1999). Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *J Gen Virol* **80** (Pt 7): 1865-1872.
531. **Somerville, R.A., S. Hamilton, and K. Fernie** (2005). Transmissible spongiform encephalopathy strain, PrP genotype and brain region all affect the degree of glycosylation of PrPSc. *J Gen Virol* **86**(Pt 1): 241-246.
532. **Somerville, R.A. and N. Gentles** (2011). Characterization of the effect of heat on agent strains of the transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* **92**(Pt 7): 1738-1748.
533. **Spasov, S., M. Beekes, and D. Naumann** (2006). Structural differences between TSEs strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1760**(7): 1138-1149.

534. **Spiropoulos, J., C. Casalone, M. Caramelli, and M.M. Simmons** (2007). Immunohistochemistry for PrP<sup>Sc</sup> in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**(4): 398-409.
535. **Stack, M.J., M.J. Chaplin, and J. Clark** (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* **104**(3): 279-286.
536. **Stahl, N., D.R. Borchelt, K. Hsiao, and S.B. Prusiner** (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**(2): 229-240.
537. **Stahl, N., M.A. Baldwin, D.B. Teplow, L. Hood, B.W. Gibson, A.L. Burlingame, and S.B. Prusiner** (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**(8): 1991-2002.
538. **Steele, A.D., J.G. Emsley, P.H. Ozdinler, S. Lindquist, and J.D. Macklis** (2006). Prion protein (PrP<sup>c</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3416-3421.
539. **Stewart, R.S., B. Drisaldi, and D.A. Harris** (2001). A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* **12**(4): 881-889.
540. **Strumbo, B., S. Ronchi, L.C. Bolis, and T. Simonic** (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* **508**(2): 170-174.
541. **Sun, R., Y. Liu, H. Zhang, and L. Manuelidis** (2008). Quantitative recovery of scrapie agent with minimal protein from highly infectious cultures. *Viral Immunol* **21**(3): 293-302.
542. **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**(14): 3591-3601.
543. **Supattapone, S., P. Bosque, T. Muramoto, H. Wille, C. Aagaard, D. Peretz, H.O. Nguyen, C. Heinrich, M. Torchia, J. Safar, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, and M. Scott** (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* **96**(6): 869-878.
544. **Tamguney, G., K. Giles, E. Bouzamondo-Bernstein, P.J. Bosque, M.W. Miller, J. Safar, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (2006). Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J Virol* **80**(18): 9104-9114.
545. **Tateishi, J., T. Tashima, and T. Kitamoto** (1991). Practical methods for chemical inactivation of Creutzfeldt-Jakob disease pathogen. *Microbiol Immunol* **35**(2): 163-166.
546. **Taylor, D.M. and I. McConnell** (1988). Autoclaving does not decontaminate formal-fixed scrapie tissues. *Lancet* **1**(8600): 1463-1464.
547. **Taylor, D.M., H. Fraser, I. McConnell, D.A. Brown, K.L. Brown, K.A. Lamza, and G.R. Smith** (1994). Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* **139**(3-4): 313-326.



548. **Taylor, D.M.** (1995). Survival of mouse-passaged bovine spongiform encephalopathy agent after exposure to paraformaldehyde-lysine-periodate and formic acid. *Vet Microbiol* **44**(1): 111-112.
549. **Taylor, D.M., J.M. Brown, K. Fernie, and I. McConnell** (1997). The effect of formic acid on BSE and scrapie infectivity in fixed and unfixed brain-tissue. *Vet Microbiol* **58**(2-4): 167-174.
550. **Taylor, D.M., K. Fernie, and I. McConnell** (1997). Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Vet Microbiol* **58**(2-4): 87-91.
551. **Taylor, D.M., K. Fernie, I. McConnell, and P.J. Steele** (1998). Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies. *Vet Microbiol* **64**(1): 33-38.
552. **Taylor, D.M., K. Fernie, I. McConnell, and P.J. Steele** (1999). Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat. *Vet Microbiol* **67**(1): 13-16.
553. **Taylor, D.M.** (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J* **159**(1): 10-17.
554. **Taylor, D.M., K. Fernie, P.J. Steele, I. McConnell, and R.A. Somerville** (2002). Thermostability of mouse-passaged BSE and scrapie is independent of host PrP genotype: implications for the nature of the causal agents. *J Gen Virol* **83**(Pt 12): 3199-3204.
555. **Taylor, D.M.** (2004). Resistance of transmissible spongiform encephalopathy agents to decontamination. *Contrib Microbiol* **11**(136-145).
556. **Taylor, D.R. and N.M. Hooper** (2007). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J* **402**(1): 17-23.
557. **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**(21): 9936-9940.
558. **Telling, G.C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner** (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**(1): 79-90.
559. **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**(5295): 2079-2082.
560. **Thackray, A.M., M.A. Klein, A. Aguzzi, and R. Bujdoso** (2002). Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J Virol* **76**(5): 2510-2517.
561. **Thackray, A.M., L. Hopkins, J. Spiropoulos, and R. Bujdoso** (2008). Molecular and transmission characteristics of primary-passaged ovine scrapie isolates in conventional and ovine PrP transgenic mice. *J Virol* **82**(22): 11197-11207.
562. **Thackray, A.M., L. Hopkins, R. Lockey, J. Spiropoulos, and R. Bujdoso** (2011). Emergence of multiple prion strains from single isolates of ovine scrapie. *J Gen Virol* **92**(Pt 6): 1482-1491.

563. **Thomzig, A., S. Spassov, 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**(32): 33847-33854.
564. **Thorgeirsdottir, S., S. Sigurdarson, H.M. Thorisson, G. Georgsson, and A. Palsdottir** (1999). PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol* **80** ( Pt 9)(2527-2534).
565. **Thuring, C.M., J.H. Erkens, J.G. Jacobs, A. Bossers, L.J. Van Keulen, G.J. Garssen, F.G. Van Zijderveld, S.J. Ryder, M.H. Groschup, T. Sweeney, and J.P. Langeveld** (2004). Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol* **42**(3): 972-980.
566. **Tobler, I., S.E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P.A. McBride, and J.C. Manson** (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**(6575): 639-642.
567. **Tobler, I., T. Deboer, and M. Fischer** (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* **17**(5): 1869-1879.
568. **Torres, J.M., O. Andreatti, C. Lacroux, I. Prieto, P. Lorenzo, M. Larska, T. Baron, and J.C. Espinosa** (2011). Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerg Infect Dis* **17**(9): 1636-1644.
569. **Tranulis, M.A.** (2002). Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep. *APMIS* **110**(1): 33-43.
570. **Tremblay, P., E. Bouzamondo-Bernstein, C. Heinrich, S.B. Prusiner, and S.J. DeArmond** (2007). Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res* **1139**(60-67).
571. **van Duijn, C.M., N. Delasnerie-Laupretre, C. Masullo, I. Zerr, R. de Silva, D.P. Wientjens, J.P. Brandel, T. Weber, V. Bonavita, M. Zeidler, A. Alperovitch, S. Poser, E. Granieri, A. Hofman, and R.G. Will** (1998). Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet* **351**(9109): 1081-1085.
572. **Vargas, M.E., M.J. Kupersmith, P.J. Savino, F. Petito, L.P. Frohman, and F.A. Warren** (1995). Homonymous field defect as the first manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Ophthalmol* **119**(4): 497-504.
573. **Vassallo, N., J. Herms, C. Behrens, B. Krebs, K. Saeki, T. Onodera, O. Windl, and H.A. Kretzschmar** (2005). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **332**(1): 75-82.
574. **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**(25): 14945-14949.

575. **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**(13): 5977-5984.
576. **Vorberg, I. and S.A. Priola** (2002). Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J Biol Chem* **277**(39): 36775-36781.
577. **Wadsworth, J.D., A.F. Hill, S. Joiner, G.S. Jackson, A.R. Clarke, and J. Collinge** (1999). Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol* **1**(1): 55-59.
578. **Wadsworth, J.D., S. Joiner, A.F. Hill, T.A. Campbell, M. Desbruslais, P.J. Luthert, and J. Collinge** (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**(9277): 171-180.
579. **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**(1510): 3747-3753.
580. **Wang, F., X. Wang, C.G. Yuan, and J. Ma** (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**(5969): 1132-1135.
581. **Watt, N.T., D.R. Taylor, A. Gillott, D.A. Thomas, W.S. Perera, and N.M. Hooper** (2005). Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* **280**(43): 35914-35921.
582. **Webb, P.R., L. Powell, M. Denyer, S. Marsh, C. Weaver, M.M. Simmons, E. Johns, J. Sheehan, P. Horsfield, C. Lyth, C. Wilson, A. Long, S. Cawthraw, G.C. Saunders, and Y.I. Spencer** (2009). A retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987. *J Vet Diagn Invest* **21**(6): 826-829.
583. **Weise, J., R. Sandau, S. Schwarting, O. Crome, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, and M. Bahr** (2006). Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**(5): 1296-1300.
584. **Weiss, S., D. Proske, M. Neumann, M.H. Groschup, H.A. Kretzschmar, M. Famulok, and E.L. Winnacker** (1997). RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* **71**(11): 8790-8797.
585. **Weissmann, C., H. Bueler, M. Fischer, A. Sailer, A. Aguzzi, and M. Aguet** (1994). PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci* **724**(235-240).
586. **Wells, G.A., A.C. Scott, C.T. Johnson, R.F. Gunning, R.D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley** (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**(18): 419-420.
587. **Wells, G.A., J.W. Wilesmith, and I.S. McGill** (1991). Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol* **1**(2): 69-78.
588. **Wemheuer, W.M., S.L. Benestad, A. Wrede, W.E. Wemheuer, B. Brenig, B. Bratberg, and W.J. Schulz-Schaeffer** (2009). Detection of classical and atypical/Nor98 scrapie by the paraffin-embedded tissue blot method. *Vet Rec* **164**(22): 677-681.

589. **Westaway, D., P.A. Goodman, C.A. Mirenda, M.P. McKinley, G.A. Carlson, and S.B. Prusiner** (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* **51**(4): 651-662.
590. **Westaway, D., C. Cooper, S. Turner, M. Da Costa, G.A. Carlson, and S.B. Prusiner** (1994). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6418-6422.
591. **Westaway, D., S.J. DeArmond, J. Cayetano-Canlas, D. Groth, D. Foster, S.L. Yang, M. Torchia, G.A. Carlson, and S.B. Prusiner** (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* **76**(1): 117-129.
592. **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. *Am J Pathol* **155**(5): 1723-1730.
593. **Whittal, R.M., H.L. Ball, F.E. Cohen, A.L. Burlingame, S.B. Prusiner, and M.A. Baldwin** (2000). Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein Sci* **9**(2): 332-343.
594. **Wickner, R.B.** (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**(5158): 566-569.
595. **Wientjens, D.P., Z. Davanipour, A. Hofman, K. Kondo, W.B. Matthews, R.G. Will, and C.M. van Duijn** (1996). Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies. *Neurology* **46**(5): 1287-1291.
596. **Wilesmith, J.W., G.A. Wells, M.P. Cranwell, and J.B. Ryan** (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* **123**(25): 638-644.
597. **Wilesmith, J.W., J.B. Ryan, and M.J. Atkinson** (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* **128**(9): 199-203.
598. **Wilham, J.M., C.D. Orru, R.A. Bessen, R. Atarashi, K. Sano, B. Race, K.D. Meade-White, L.M. Taubner, A. Timmes, and B. Caughey** (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* **6**(12): e1001217.
599. **Will, R.G., J.W. Ironside, B. Hornlimann, and M. Zeidler** (1996). Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **347**(8993): 65-66.
600. **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**(9006): 921-925.
601. **Wille, H., M.D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F.E. Cohen, D.A. Agard, and S.B. Prusiner** (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3563-3568.
602. **Williams, E.S. and S. Young** (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**(1): 89-98.

603. **Williams, E.S.** (2005). Chronic wasting disease. *Vet Pathol* **42**(5): 530-549.
604. **Wilson, R., C. Plinston, N. Hunter, C. Casalone, C. Corona, F. Tagliavini, S. Suardi, M. Ruggerone, F. Moda, S. Graziano, M. Sbriccoli, F. Cardone, M. Pocchiari, L. Ingrosso, T. Baron, J. Richt, O. Andreoletti, M. Simmons, R. Lockey, J.C. Manson, and R.M. Barron** (2012). Chronic wasting disease and atypical forms of bovine spongiform encephalopathy and scrapie are not transmissible to mice expressing wild-type levels of human prion protein. *J Gen Virol* **93**(Pt 7): 1624-1629.
605. **Windl, O., M. Buchholz, A. Neubauer, W. Schulz-Schaeffer, M. Groschup, S. Walter, S. Arendt, M. Neumann, A.K. Voss, and H.A. Kretzschmar** (2005). Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **79**(23): 14971-14975.
606. **Wood, J.L., L.J. Lund, and S.H. Done** (1992). The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet Rec* **130**(2): 25-27.
607. **Wopfner, F., G. Weidenhofer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T.F. Schwarz, T. Werner, and H.M. Schatzl** (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**(5): 1163-1178.
608. **Wroe, S.J., S. Pal, D. Siddique, H. Hyare, R. Macfarlane, S. Joiner, J.M. Linehan, S. Brandner, J.D. Wadsworth, P. Hewitt, and J. Collinge** (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**(9552): 2061-2067.
609. **Wyatt, J.M., G.R. Pearson, T.N. Smerdon, T.J. Gruffydd-Jones, G.A. Wells, and J.W. Wilesmith** (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* **129**(11): 233-236.
610. **Xanthopoulos, K., M. Polymenidou, S.J. Bellworthy, S.L. Benestad, and T. Sklaviadis** (2009). Species and strain glycosylation patterns of PrP<sup>Sc</sup>. *PLoS One* **4**(5): e5633.
611. **Yamaguchi, N., S. Sakaguchi, K. Shigematsu, N. Okimura, and S. Katamine** (2004). Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(4): 1247-1252.
612. **Yang, W., J. Cook, B. Rassbach, A. Lemus, S.J. DeArmond, and J.A. Mastrianni** (2009). A New Transgenic Mouse Model of Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome Caused by the A117V Mutation of PRNP. *J Neurosci* **29**(32): 10072-10080.
613. **Yao, H.L., J. Han, J.M. Gao, J. Zhang, B.Y. Zhang, Y.J. Guo, K. Nie, C. Gao, X.F. Wang, and X.P. Dong** (2005). Comparative study of the effects of several chemical and physical treatments on the activity of protease resistance and infectivity of scrapie strain 263K. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**(10): 437-443.
614. **Yin, X.M., Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer** (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* **369**(6478): 321-323.
615. **Yost, C.S., C.D. Lopez, S.B. Prusiner, R.M. Myers, and V.R. Lingappa** (1990). Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* **343**(6259): 669-672.

616. Yu, G., J. Chen, Y. Xu, C. Zhu, H. Yu, S. Liu, H. Sha, X. Xu, Y. Wu, A. Zhang, J. Ma, and G. Cheng (2009). Generation of goats lacking prion protein. *Mol Reprod Dev* **76**(1): 3.
617. Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wuthrich (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1): 145-150.
618. Zanata, S.M., M.H. Lopes, A.F. Mercadante, G.N. Hajj, L.B. Chiarini, R. Nomizo, A.R. Freitas, A.L. Cabral, K.S. Lee, M.A. Juliano, E. de Oliveira, S.G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R.R. Brentani, and V.R. Martins (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* **21**(13): 3307-3316.
619. Zanusso, G., A. Polo, A. Farinazzo, R. Nonno, F. Cardone, M. Di Bari, S. Ferrari, S. Principe, M. Gelati, E. Fasoli, M. Fiorini, F. Prelli, B. Frangione, G. Tridente, M. Bentivoglio, A. Giorgi, M.E. Schinina, B. Maras, U. Agrimi, N. Rizzuto, M. Pocchiari, and S. Monaco (2007). Novel prion protein conformation and glycoform in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **64**(4): 595-599.
620. Zeidler, M., G.E. Stewart, C.R. Barraclough, D.E. Bateman, D. Bates, D.J. Burn, A.C. Colchester, W. Durward, N.A. Fletcher, S.A. Hawkins, J.M. Mackenzie, and R.G. Will (1997). New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* **350**(9082): 903-907.
621. 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**(21): 745-754.
622. Zlotnik, I. and J.C. Rennie (1965). Experimental Transmission of Mouse Passaged Scrapie to Goats, Sheep, Rats and Hamsters. *J Comp Pathol* **75**(147-157).

### **Sites web**

623. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. Chronic Wasting Disease (CWD) [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/cwd/> (consulté le 01.09.2012)
624. **Health Protection Agency**. Variant CJD and blood [en ligne]. Disponible sur : <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/CreutzfeldtJakobDisease/VariantCJDAndBlood/> (consulté le 01.08.2012)
625. **Institut de Veille Sanitaire**. Maladie de Creutzfeldt-Jakob [en ligne]. Disponible sur : <http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Maladie-de-Creutzfeldt-Jakob/Definition-des-cas> (consulté le 01.09.2012)
626. **The National Creutzfeldt-Jakob Disease Research & Surveillance Unit (NCJDRSU)**. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease, Current Data [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm> (consulté le 01.09.2012)

