



Modélisation de la réplifications des Prions : Implication de la dépendance en taille des agrégats de PrP et de l'hétérogénéité des populations cellulaires.

Natacha Lenuzza

► To cite this version:

Natacha Lenuzza. Modélisation de la réplifications des Prions : Implication de la dépendance en taille des agrégats de PrP et de l'hétérogénéité des populations cellulaires.. Autre. Ecole Centrale Paris, 2009. Français. <NNT : 2009ECAP0032>. <tel-00453321>

HAL Id: tel-00453321

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00453321>

Submitted on 4 Feb 2010

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

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

ÉCOLE CENTRALE PARIS
LABORATOIRE DE MATHÉMATIQUES APPLIQUÉES AUX SYSTÈMES
COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE
SERVICE D'ÉTUDE DES PRIONS ET DES INFECTIONS ATYPIQUES



THÈSE DE DOCTORAT
Spécialité : **Mathématiques Appliquées**

présentée par
LENUZZA Natacha

pour obtenir le grade de Docteur de l'École Centrale Paris

Sujet de la thèse :
MODÉLISATION DE LA RÉPLICATION DES PRIONS :
implication de la dépendance en taille des agrégats de PrP et de l'hétérogénéité
des populations cellulaires

Pour soutenance le *16 octobre 2009* devant :

D ^r DESLYS Jean-Philippe	Co-directeur de thèse
P ^r SAGUEZ Christian	Co-directeur de thèse
P ^r LANGLAIS Michel	Rapporteur
D ^r MOUILLET-RICHARD Sophie	Rapporteur
D ^r LAURENT Pascal	Examineur
P ^r PERTHAME Benoît	Examineur
D ^r PUJO-MENJOUET Laurent	Examineur

2009-ECAP0032

ECP/MAS - Grande voie des vignes - 92290 Châtenay-Malabry
CEA/DSV/IMETI/SEPIA - 18, route du Panorama - 92265 Fontenay-aux-Roses

Remerciements

La rédaction de ce mémoire touchant à sa fin, il est temps de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée, encadrée ou supportée pendant ces quatre dernières années. Au-delà du domaine professionnel, la réalisation de cette thèse a été une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais pas les citer toutes sans écrire un nombre de pages incalculable, mais je reconnais que chacune a apporté une contribution essentielle à la finalisation de ce mémoire.

Je pense particulièrement à mon encadrant de thèse, Franck Mouthon, pour la finesse de son attitude sur le plan scientifique et humain. Par ses encouragements permanents, il m'a beaucoup aidé à trouver ma place au sein de son équipe et a su gérer mes angoisses d'une façon très paternelle. Je lui sais gré, entre autres, de son enthousiasme à chercher différentes collaborations dans un domaine autre que le sien, de sa confiance en moi (quelquefois plus grande que la mienne), et de sa réserve de kleenex... J'ai énormément appris à son contact, et pour reprendre une phrase lue récemment dans d'autres remerciements, j'espère que cette thèse sera à la hauteur de tout ce qu'il m'a apporté. Si un jour l'occasion m'est donnée d'encadrer à mon tour des étudiants, j'espère avoir la même envie et le même talent que lui!

Je pense aussi chaleureusement à Pascal Laurent, mon co-encadrant de thèse version mathématicienne, qui m'a initiée au monde des équations différentielles et à celui des automates cellulaires avec tant de patience et de gentillesse. Merci pour ses nombreux conseils, tant scientifiques que sur la thèse et l'après-thèse, ainsi que pour sa bienveillance à toute épreuve!

Je remercie également Jean-Philippe Deslys, directeur du SEPIA, pour m'avoir accueillie au sein de son institution. Il m'a fait confiance, malgré les connaissances inexistantes que j'avais sur les Prions et la biologie expérimentale, et la grande liberté qu'il m'a laissée en acceptant cette thèse en co-tutelle m'a permis d'appréhender deux modes de recherche très différents et complémentaires. De même, je remercie énormément Christian Saguez, responsable du laboratoire MAS, de m'avoir suivie ces dernières années, d'abord en tant que responsable de l'option Mathématiques Appliquées, puis en tant que co-directeur de cette thèse. Son appui permanent depuis les premiers jours et ses encouragements ont été décisifs quant à mon choix de poursuivre mes études en thèse.

Je témoigne ma reconnaissance plus qu'amicale à l'équipe avec laquelle j'ai travaillé pendant ces quatre années. C'est grâce à leur présence que j'ai pu mener à bien ce travail. Merci à Mathieu Charvériat, le "petit-thésard", pour tous ces cafés, ces moments de spleen et ceux plus détendus, ces trajets, ces doutes et ces bureaux partagés! Merci à Fabien Aubry, pour tous

ces fantastiques tris à quatre tubes, ces innombrables points d'interrogation en manip ou à la cantine ! Merci à Marlène Reboul pour son calme, son accent chantant et le plaisir qu'elle prend à travailler, si communicatif ! Merci à Virginie Nouvel, pour sa sérénité épanouie que je lui envie tant, pour ses gâteaux, et sa joie de vivre qu'elle partage avec nous tous ! Merci à Christèle Picoli, pour sa formation expérimentale à mon arrivée au labo, pour tous ces résultats partagés, et aussi un peu pour son inimitable bavarois aux framboises, dont j'ai enfin eu la recette ! Merci à Mickael Eterpi, mon collaborateur temporaire, pour ses dilutions et ses blagues (parfois) limites, ainsi que pour son intérêt inexplicable pour les gènes ménagers et les peluches lumineuses ! Merci à eux pour tous ces petits moments, cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle a été sans eux...

J'ai également passé une partie de mon temps dans les murs de Centrale. Derrière ma soi-disant excuse pour ne pas travailler, se cache l'équipe MASBIO, pleine d'enthousiasme et de bonne humeur. J'ai notamment une pensée émue pour Sonia Benhamida, à l'origine de cette thèse. Outre ce projet de recherche génial qu'elle m'a apporté sur un plateau, je lui suis infiniment reconnaissante de m'avoir tendue la main quand j'en ai eu besoin. Son suivi permanent, même de loin et après une réorientation professionnelle, reste très important à mes yeux. Je remercie également Françoise Xavier pour avoir contribué plus qu'activement à faire de MASBIO une équipe dynamique. Les réunions qu'elle a mises en oeuvre sont à l'origine d'échanges scientifiques enrichissants avec les autres doctorants de l'équipe : Aurélie Cotillard, Sylvain Fouliard, et Frédérique Bravin. Merci à eux d'avoir été là !

Une grande partie de ce travail de thèse repose sur une collaboration initiée, grâce à Hateem Zaag, avec les membres du projet BANG de l'INRIA. J'en remercie certains de ses membres, Vincent Calvez, Marie Doumic et Pierre Gabriel, pour leur aide plus qu'essentielle à ce projet. L'entrain dont ils ont fait preuve vis-à-vis d'un sujet nouveau, ainsi que leur réactivité et le souhait de continuer cette collaboration fructueuse ont grandement contribué à un regain d'enthousiasme pour mon projet. Je les remercie de m'avoir fortement associée à leurs résultats et à toutes leurs réflexions. Je pense plus particulièrement à Benoît Perthame, pour nous avoir accueilli si chaleureusement au début de la collaboration, pour nous avoir fait confiance immédiatement, et pour continuer en acceptant d'être membre de mon jury !

Je remercie beaucoup Sophie Mouillet-Richard et Michel Langlais, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse pluridisciplinaire, et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également à Laurent Pujo-Menjouet, qui a accepté de considérer ce travail (et aussi pour avoir publié le modèle de polymérisation nucléée constant, très utilisé dans les pages qui viennent ...).

Je ne saurais oublier le personnel des deux laboratoires qui m'ont accueillie. Je remercie toutes les personnes du SEPIA, qui ont assuré ou qui assurent encore le bon fonctionnement du bâtiment Prion, Lylian Challier, Emmanuel Comoy, Capucine Dehen, Valérie Durand, Christelle Duval, Sophie Freire, Dolorès Jouy, Pierre L'Erario, Dominique Marcé, Pascal Morin, Vincent Thomas, les animaliers, et pleins d'autres encore. Je remercie plus particulièrement Frédéric Auvré, Evelyne Correia, Guillaume Fichet, Nathalie Lescoutra, et Zhou Xu pour leur gentillesse, leur présence, et leur bonne humeur quotidienne qui m'a fait tant plaisir. Merci également aux membres du laboratoire MAS, et plus spécialement à Julie Deville, Céline Hudelot

et Véronique Letort, pour leurs encouragements et leur plaisir à travailler.

Enfin, je souhaite terminer ces remerciements par un hommage à ma famille et à mes amis. Merci à Florian d'avoir toujours été à mes côtés, et de m'avoir apporté plus que du réconfort. J'espère qu'il me pardonnera ces quelques nuits de relecture interminables. Merci à ma mère, à Toni, à Manu et à Fanny, à mes grands-parents Madeleine, Bernard et Roméo, à Gaëlle et à tous les autres, pour leur présence continue et irremplaçable, malgré la distance. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements remontent à bien plus longtemps que cette thèse, et comptent énormément pour moi. Je dédie plus particulièrement cette thèse à mon père, Jacques Lenuzza, et à Narcisse Mouri.

J'ai un peu de mal à trouver les mots justes pour écrire tous ces remerciements, alors j'espère que vous me pardonnerez si maladresse il y a. Mes dettes de reconnaissance sont énormes à votre égard, j'espère commencer à les combler par l'achèvement de ce travail !

Table des matières

Avant-propos : présentation et organisation du manuscrit	14
Partie I Les maladies à Prions : état de l'art	17
1 Description des maladies à Prions	18
1 Généralités	18
1.1 Des maladies humaines et animales	18
1.2 Des caractéristiques communes	20
2 Modifications moléculaires au cours des ESST	21
2.1 La PrP ^c	22
2.1.1 Régulation du gène <i>PRNP</i>	22
2.1.2 Structure, synthèse, maturation et dégradation	23
2.1.3 Fonction	25
2.2 La PrP ^{res}	26
2.2.1 Structure, synthèse	27
2.2.2 Propriétés physico-chimiques, détection	28
3 Description des agents étiologiques responsables des ESST	29
3.1 Propriétés des agents	29
3.2 Nature protéique des agents	30
4 Phénomène de souches	33
4.1 Outils d'étude des souches de Prion	34
4.2 Phénomène de barrière d'espèce et d'adaptation de souche	35
2 Mécanismes de réplication des Prions et physiopathologie	37
1 Propagation des Prions à l'échelle d'un individu	37
1.1 Localisation des Prions dans l'organisme	37
1.2 Propagation des Prions dans l'organisme	38
2 Mécanismes cellulaires de réplication et physiopathologie cellulaire	40
2.1 Localisation subcellulaire du mécanisme de conversion	40
2.2 Réponses cellulaires à l'infection	41
2.2.1 Neurodégénérescence et toxicité cellulaire	41
2.2.2 Autres réponses à l'infection	42
2.3 Susceptibilité cellulaire à l'infection	43
3 Mécanismes moléculaires de conversion	44
3.1 Hypothèses sur le mécanisme de conversion	44

3.2	Régions moléculaires impliquées dans la réplication	45
3.2.1	Rôle de la région centrale dans le mécanisme de conversion . . .	45
3.2.2	Rôle des régions N- et C-terminales	47
3.3	Caractérisation des polymères de PrP ^{res}	47
3.3.1	Recherche de la particule convertissante	49
3.3.2	Recherche de l'espèce neurotoxique	49
3.4	Partenaires moléculaires impliquées dans la réplication	49
3	Modèles théoriques autour des maladies à Prions	53
1	Echelle d'une population d'individus	53
1.1	Outils expérimentaux	53
1.2	Modèles théoriques	54
1.2.1	Estimation de la prévalence du vMCJ lié à une contamination par voie alimentaire	54
1.2.2	Estimation des risques de contamination secondaire	56
2	Echelle cellulaire et individuelle	57
2.1	Outils expérimentaux	57
2.1.1	Lignées cellulaires	57
2.1.2	Modèles animaux	59
2.2	Modèles théoriques	60
3	Echelle protéique	61
3.1	Outils expérimentaux	61
3.1.1	Méthodes biophysiques d'étude des protéines	61
3.1.2	Techniques de conversion <i>in vitro</i>	62
3.2	Modèles théoriques	63
3.2.1	Modélisation atomique de la PrP ^{res}	63
3.2.2	Modélisation protéique de la PrP ^{res}	64
4	Modélisation du mécanisme de réplication	66
1	Des modèles pour mimer la connaissance biologique	67
1.1	Un phénomène autocatalytique : le modèle de l'hétérodimère	68
1.2	Conversion via de petits oligomères : le modèle de Laurent	69
1.3	Implication du mécanisme de polymérisation : le modèle de Masel	70
1.4	Modèles alternatifs	73
2	Discrimination des modèles	74
2.1	Effet d'une augmentation locale de PrP ^c	74
2.2	Effet de l'état d'agrégation initial de la PrP ^{res}	76
2.3	Distribution en taille des agrégats de PrP ^{res}	76
3	Des modèles pour orienter la compréhension biologique	77
3.1	Mise en évidence de comportements synergiques ou antagonistes	77
3.2	Conditions d'occurrence des ESST sporadiques	77
3.3	Divergence des mesures expérimentales du titre infectieux	78
5	Problématique et objectifs de la thèse	86

Partie II Implication de la dépendance en taille de l'infectiosité des agrégats de PrP		88
6	Généralisation du modèle de polymérisation nucléée	89
1	Introduction	89
2	Etat de l'art sur le modèle de polymérisation nucléée	90
2.1	Le modèle discret	90
2.1.1	Description du modèle	90
2.1.2	Propriétés du système macroscopique	91
2.1.3	Propriétés du système microscopique	94
2.2	Le modèle continu	95
2.2.1	Description du modèle	95
2.2.2	Propriétés du système	96
3	Taux d'élongation dépendant de la taille des agrégats	97
3.1	Généralisation du modèle discret	97
3.1.1	Notations	97
3.1.2	Description du modèle généralisé discret	97
3.1.3	Existence d'une solution positive	99
3.2	Généralisation du modèle continu	101
3.2.1	Description du modèle continu généralisé	101
	Hypothèses sur les coefficients.	102
3.2.2	Conditions de déclenchements des ESST	102
4	Liens entre les modèles discrets et continus	104
4.1	Comparaison des deux approches	104
4.2	Validation des hypothèses du modèle continu par le modèle discret	105
4.2.1	Etude des valeurs propres de la matrice \mathbf{M}_V	105
4.2.2	$\lambda_1(V)$ est une fonction croissante de V	107
5	Effet d'un taux de conversion non constant sur la dynamique de réplication	109
5.1	Conversion taille-dépendante et distribution en taille des agrégats de PrP ^{res}	109
5.2	Distribution en taille des agrégats de PrP ^{res} et Souches de Prions	110
6	Discussion	112
7	Articles	113
7	Réduction de la dimension du modèle de polymérisation nucléée	141
1	Introduction	141
2	Principe général de la réduction POD	142
2.1	Une inégalité classique sur les valeurs propres	142
2.2	Décomposition aux valeurs propres	143
3	Réduction du modèle de polymérisation nucléée des Prions	145
3.1	Procédure d'obtention et de vérification de la base POD	145
3.1.1	Intégration numérique du modèle de Masel	145
3.1.2	Création de la base POD	146
3.1.3	Construction du modèle réduit	148
3.1.4	Evaluation de la robustesse de la base	148
3.2	Résultats : validation de la base POD	150

3.2.1	Taille optimale de la base de réduction	150
3.2.2	Robustesse de la base POD vis-à-vis des paramètres d'évolution	153
3.2.3	Réduction POD et positivité de la solution	153
3.2.4	Robustesse de la base POD vis-à-vis de la propagation	155
4	Conclusion et perspectives	155

Partie III Implication de l'hétérogénéité des populations cellulaires 157

8	Les modèles individus-centrés pour la biologie cellulaire	158
1	Description de l'approche individus-centrée	158
1.1	Définition formelle d'un modèle individu-centré	158
1.2	Différentes approches individus-centrées	159
1.2.1	La microsimulation	159
1.2.2	Les automates cellulaires	160
1.3	Enjeux, avantages et limites des MIC	161
2	Exemples d'applications des AC pour la biologie cellulaire	163
2.1	Immunité et propagation virale	163
2.2	Croissance tumorale	166
2.3	Synthèse des règles d'évolution classiques	168
3	L'analyse de sensibilité comme outil d'étude des MIC	169
3.1	Définition et ambitions de l'analyse de sensibilité	169
3.2	Les différentes méthodes de <i>screening</i>	170
9	Paramètres cellulaires influencés par la réplication des Prions	172
1	Introduction	172
2	Résultats expérimentaux	173
2.1	Etude comparative fonctionnelle des lignées cellulaires	173
2.1.1	Effet de l'infection sur la croissance cellulaire	173
2.1.2	Effet de la croissance cellulaire sur l'infection	174
2.1.3	Etude de l'expression de la PrP	175
2.2	Tri des différentes populations cellulaires	177
2.3	Etude de la propagation intercellulaire des Prions	179
2.4	Etude de la susceptibilité cellulaire à l'infection	179
2.4.1	Quantification du nombre de cellules infectées en fonction de la souche de Prions	179
2.4.2	Stabilisation de l'hétérogénéité de susceptibilité par fusions cel- lulaires	180
3	Discussion	181
4	Conclusions : orientation de la modélisation	183
10	Modèle de réplication des Prions dans une population cellulaire en division	186
1	Description du modèle	187
1.1	Topologie générale de l'automate cellulaire	188
1.1.1	Géométrie de l'AC et voisinage	188

1.1.2	Type d'évolution et états possibles	189
1.2	Description d'une cellule	189
1.3	Règles d'évolution	190
1.4	Sorties de l'automates	194
2	Résultats	194
2.1	Stabilité numérique et robustesse des sorties du modèle	196
2.1.1	Qualité du schéma de discrétisation des équations de Masel	196
2.1.2	Variabilité des sorties de l'automate cellulaire	197
2.1.3	Effet du pas d'évolution temporelle de l'automate	197
2.2	Effet de la prolifération cellulaire sur la réplication des Prions	200
2.2.1	Evolution spatio-temporelle de l'automate cellulaire	200
2.2.2	Optimisation des conditions de culture	202
2.2.3	Criblage thérapeutique	202
3	Discussion	204
3.1	Choix des paramètres de simulations	205
3.2	Mécanisme de réplication et niveaux d'équilibre de PrP ^{res}	206
3.3	Effet du passage des cellules	206
3.4	Orientations thérapeutiques et diagnostiques	207
	Discussion générale et Perspectives	209
	Annexes	212
	Matériels et méthodes	213
	Communication	220
	Bibliographie	222

Table des figures

1.1	Lésions tissulaires engendrées par les ESST	21
1.2	Structure de la PrP	23
1.3	Trafic intracellulaire de la PrP ^c	24
1.4	Voie de signalisation impliquant la PrP ^c	26
1.5	Modèles de la structures des protofibrilles de PrP	28
1.6	PrP ^c et PrP ^{res}	28
2.1	Hypothèses sur le mécanisme de conversion de la PrP	44
2.2	Principales régions impliquées dans la conversion de la PrP	46
2.3	Bases structurales du mécanisme de conversion	48
3.1	Modèle âge-cohorte pour l'étude des transmissions secondaires du vCJD	55
3.2	Modèle de trafic cellulaire	60
3.3	Principe de la PMCA	63
4.1	Démarche de modélisation	66
4.2	Différents mécanismes d'agrégation	67
4.3	Différents modèles d'un même mécanisme	67
4.4	Mécanisme de Laurent	69
4.5	Mécanisme de Masel	70
4.6	Cinétique d'évolution de la PrP	73
4.7	Effet d'une augmentation de la PrP ^c	76
4.8	Titration de l'infectiosité	79
4.9	Effet de la sonication sur l'infectiosité	80
6.1	Mécanisme de Masel	90
6.2	Dynamique du système de Masel	92
6.3	Etats d'équilibre du système de Masel	93
6.4	Dynamique du modèle de Masel microscopique	94
6.5	Distribution en taille des agrégats à l'équilibre	95
6.6	Exemples de distribution en taille des agrégats de PrP ^{res}	111
6.7	Evolution temporelle de la distribution en taille des agrégats	111
7.1	Paramètres de création de la matrice des snapshots	147
7.2	Valeurs propres	151
7.3	Représentation des premiers modes POD associés au modèle de Masel réduit	152

TABLE DES FIGURES

7.4	Erreur de réduction	154
7.5	Robustesse de la base POD vis-à-vis de la propagation	155
8.1	Le Jeu de la Vie	161
8.2	Caractéristiques structurelles des AC	162
8.3	Exemple d'automates cellulaires à 1 dimension	163
8.4	Propagation de la grippe	165
8.5	Méthode de Morris	170
9.1	Vitesse de prolifération cellulaire	173
9.2	Etude de la mortalité cellulaire	175
9.3	Effet de la prolifération et de la mortalité cellulaire sur l'infection	175
9.4	Etude de l'expression membranaire de la PrP	176
9.5	Détection immunocytochimique de la PrP ^{res}	176
9.6	Tri des différentes populations cellulaires	178
9.7	Etude de la dissémination des Prions	179
9.8	Etude de la susceptibilité par fusion cellulaire	181
10.1	Maillages réguliers pour une culture cellulaire	189
10.2	Description du modèle d'une culture cellulaire	195
10.3	Variabilité des sorties de l'AC	197
10.4	Robustesse des sorties du modèle vis-à-vis du pas temporel d'évolution	198
10.5	Effet de la prolifération cellulaire sur le niveau d'infection	201
10.6	Effet du passage sur la distribution de PrP ^{res}	202
10.7	Effet de la vitesse de prolifération	203
10.8	Effets anti-Prions avec ou sans croissance cellulaire	203

Liste des tableaux

1.1	Les maladies à Prions animales	19
1.2	Les maladies à Prions humaines	20
1.3	Anticorps conformationnels	27
1.4	Historique des différentes théories sur la nature des ATNC	31
1.5	Les différents Prions de champignons	33
1.6	Principales techniques de typages de souches	34
1.7	Principales souches expérimentales de Prions	36
2.1	Ligands de la PrP	50
3.1	Estimations de l'incidence du vMCJ	57
3.2	Modèles cellulaires infectés par des Prions naturels ou adaptés aux rongeurs	58
3.3	Méthodes physiques d'étude d'agrégation de protéines	65
4.1	Stratégies thérapeutiques issues de la modélisation	75
4.2	Modèles de réplication des Prions	81
4.2	Modèles de réplication des Prions	84
4.3	Notations	85
6.1	Conditions de déclenchement d'une ESST.	103
8.1	Exemples de règles d'évolution des AC pour la biologie cellulaire	168
8.2	Synthèse des méthodes de <i>screening</i>	171
9.1	Mécanisme de réplication des Prions dans les différents modèles expérimentaux	184
9.2	Estimation des valeurs cinétiques des paramètres	185
10.1	Description des sorties de l'AC	194
10.2	Intervalle de stabilité du modèle de Masel discrétisé	196
10.3	Etude de l'erreur de discrétisation	197
10.4	Variabilité intrinsèque des sorties de l'AC	199

Liste des abréviations

<i>PRNP</i>	Gène codant pour la PrP humaine
<i>Prnp</i>	Gène codant pour la PrP de souris
AC	Automate Cellulaire
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
AS	Analyse de Sensibilité
BASE	Encéphalopathie Spongiforme Bovine Atypique
CCN	Conversion Conformationnelle Nucléée
CD	Cellule Dendritique
CDI	Conformation-Dependant Immunoassay
CFC	Cell Free Conversion assay
CFD	Cellule Folliculaire Dendritique
CPA	Cell Panel Assay
CSA	Conformational Stability Assay
CWD	Syndrôme du Dépérissement Chronique (ou <i>Chronic Wasting Disease</i>)
DL ₅₀	Dose Léthale 50%
DM	Dynamique moléculaire
EDO	Equation Différentielle Ordinaire
EDP	Equation aux Dérivées Partielles
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESF	Encéphalopathie Spongiforme Féline
ESST	Encéphalopathie Subaiguë Spongiforme Transmissible
ETV	Encéphalopathie Transmissible du Vison
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Syndrôme de Gerstmann-Straüssler-Scheinker
GT1	Cellules neuronales d'hypothalamus de souris
GT1-i	GT1-7 infectées
GT1-ni	GT1-7 non infectées
IFF	Insomnie Fatale Familiale
IFS	Insomnie Fatale Sporadique
kbp	Kilo-base pair
kDa	kilo-Dalton
KO	Knock-out / souris délétée d'un gène
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MIC	Modèle Individus-Centré
MovS6	Cellules de ganglions rachidiens de souris
MovS6-i	MovS6 infectées
MovS6-ni	MovS6 non infectées
MPN	Modèle de Polymérisation Nucléée
Nor98	Souche atypique de Tremblante
PIPLC	Phospholipase C
PK	Protéinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification

LISTE DES TABLEAUX

POD	Proper Orthogonal Decomposition
POPC	Lipides 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PrP	Protéine du Prion
PrP ^{-/-}	Souris KO pour le gène <i>Prnp</i>
PrP ^c	Protéine du Prion cellulaire
PrP ^L	Protéine du Prion labile
PrP ^{res}	Protéine du Prion PK-résistante
RE	Réticulum Endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Sodium odecyl Sulfate
SLP	Système Lymphoïde Périphérique
SLR	Système Lymphoréticulaire
SN56	Cellules de neurones cholinergiques de souris
SN56-i	SN56 infectées
SN56-ni	SN56 non infectées
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOD	Superoxyde Dismutase
UV	Ultra-Violets
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vMCJ	Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Avant-propos : présentation et organisation du manuscrit

Les maladies à Prions sont des maladies neurodégénératives fatales transmissibles, touchant l'homme et l'animal. Elles sont caractérisées par l'accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP, sous une forme anormalement repliée (appelée PrP^{res}). Actuellement, le risque de santé publique lié aux maladies à prions persiste, avec notamment la possibilité de transmission iatrogène du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob par transfusion sanguine. Par ailleurs, les maladies à Prions constituent un paradigme infectieux dans les maladies d'accumulation de protéines. La maîtrise de la transmission de ces maladies passe par la compréhension des mécanismes de réplication et de dissémination au sein d'un organisme. Ces mécanismes de réplication se produisent à des échelles de temps et de taille difficilement accessibles expérimentalement, et ont ainsi fait l'objet de nombreuses modélisations théoriques utiles pour aider à la compréhension des mécanismes.

La partie I de ce manuscrit consiste en un état de l'art sur les maladies à Prions et les modèles mathématiques correspondants. Les chapitres 1 et 2 présentent des généralités sur les maladies à Prions. Le chapitre 3 présente les différents outils expérimentaux, leurs limites et les modèles mathématiques développés pour pallier ces limites. Le chapitre 4 détaille plus spécifiquement les modèles mathématiques de réplication des Prions à l'échelle moléculaire. Au vu de cet état des connaissances, les objectifs de cette thèse sont de compléter ces modèles mathématiques pour étudier plus spécifiquement les conséquences dynamiques sur la réplication des Prions, des propriétés de réplication taille-dépendante d'une part, et de l'hétérogénéité des cellules impliquées dans la réplication d'autre part. Ces objectifs sont détaillés au chapitre 5.

La partie II est consacrée à l'étude théorique des propriétés de réplication dépendantes de la taille des particules infectieuses. Cette étude est effectuée grâce à la généralisation d'un modèle mathématique existant, le modèle de polymérisation nucléée des Prions de Masel. Le chapitre 6 présente dans un premier temps un état des connaissances de ce modèle, puis sa généralisation. Deux publications font suite à cette étude. Elles permettent de souligner l'importance de la distribution en taille des agrégats de PrP pour étudier les mécanismes élémentaires de réplication des Prions. Le modèle mathématique généralisé est très coûteux en temps de calculs, ainsi, nous testons au chapitre 7 une méthode permettant de réduire sa complexité sans perte d'information sur sa dynamique.

Enfin, la partie III est dédiée à l'étude de la dynamique multicellulaire de la réplication

des Prions, grâce à un modèle par automate cellulaire. Dans un premier temps, le chapitre 8 présente de façon général le cadre théorique des modèles individus-centrés (automates cellulaires). Le chapitre 9 consiste en une étude expérimentale des propriétés de réplication au sein d'une population cellulaire, servant de base à la modélisation. Enfin, un modèle théorique est développé au chapitre 10. Son analyse dans un contexte de cellules en division asynchrone, sans propagation intercellulaire des Prions, permet d'aider à la compréhension de certaines observations expérimentales et d'identifier des étapes du processus de culture cellulaire critiques pour l'établissement d'une infection chronique. Ces travaux sont suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.

Première partie

Les maladies à Prions : état de l'art

Chapitre 1

Description des maladies à Prions

Les maladies à Prions ou Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives fatales qui affectent de nombreux mammifères. Malgré l'épidémie de Kuru qui a décimé une partie importante de la population Fore (une tribu de Papouasie-Nouvelle Guinée), elles sont relativement rares chez l'homme. Toutefois, elles posent un problème de santé publique important, illustré par différents événements dramatiques du 20^{ème} siècle : la transmission iatrogène de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) à plus de 200 personnes par injection d'hormones de croissance, l'apparition chez l'homme de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), causée par la transmission de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) par ingestion de produits bovins contaminés, et plus récemment, par la transmission du vMCJ par transfusion sanguine (globules rouges non leucodéplétés) et un cas de contamination suspecte par transfusion de produits sanguins d'origine plasmatique.

Par ailleurs, les maladies à Prions sont très particulières : de forme sporadique, génétique ou infectieuse, elles sont toutes transmissibles. L'agent responsable de cette transmission semble être une protéine, capable de se répliquer comme les agents pathogènes classiques, mais en l'absence d'acide nucléique. Ainsi, pour maîtriser le risque sanitaire, il est primordial de comprendre les mécanismes de réplication associés à l'émergence et à la propagation de ces pathogènes atypiques.

1 Généralités

1.1 Des maladies humaines et animales

La première ESST animale décrite (Tableau 1.1) est la Tremblante (ou "Scrapie"), chez les ovins et les caprins. Reconnue il y a plus de 200 ans, la Tremblante persiste encore, avec une incidence de 0.1 à 4.5 cas par centaine d'animaux par an au Royaume-Uni, selon les troupeaux [1]. Elle semble confinée aux petits ruminants.

Au contraire, l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), découverte en 1985 chez les bovidés [2], est connue pour sa capacité à franchir les barrières d'espèce. Le franchissement le plus connu est celui du bovin à l'homme [3], mais d'autres ESST animales sont également reliées à l'épidémie d'ESB, comme l'Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF) des félinés domestiques ou en captivité [4] ou l'Encéphalopathie Spongiforme des ruminants de zoo [5].

La transmission de l'ESB résulte principalement de l'ingestion d'aliments contaminés par des Prions, notamment des farines animales produites à partir de carcasses d'animaux d'équarissage et dont les procédés de décontamination étaient inefficaces pour inactiver les agents infectieux. [6].

Enfin, d'autres maladies à Prions animales existent, sans lien apparent avec l'ESB : l'Encéphalopathie Transmissible du Vison [7] ou le Syndrome de Dépérissement Chronique (CWD) chez les cervidés sauvages ou captifs nord-américains [8]. Plus récemment, des formes atypiques de maladies à Prions ont été découvertes chez les ovins [9] (Tremblante Atypique ou Nor98, identifiée en Norvège depuis 1998) et chez les bovins (Encéphalopathie Spongiforme Bovine Amyloïdes ou BASE [10], ESB-H).

Nom	Espèces	Cause	¹ Date
Tremblante du mouton	Ovins, Caprins	Transmission verticale ou horizontale chez les individus génétiquement sensibles	1732
Encéphalopathie Transmissible du Vison (ETV)	Vison	Infection par voie alimentaire (ingestion de carcasses d'ovins ou de bovins)	1947
Syndrome du dépérissement chronique (CWD)	Cervidés (sauvages ou captifs)	Origine inconnue. Transmission horizontale importante.	1967
Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)	Bovins, ruminants de zoos	Origine inconnue. Infection par voie alimentaire (recyclage de l'agent de l'ESB dans les farines animales)	1986
Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF)	Félinés domestiques ou de zoos	Infection par voie alimentaire par l'agent de l'ESB.	1992
Encéphalopathie Spongiforme Amyloïde Bovine (BASE)	Bovins	Origine inconnue (forme spontanée?)	2004

TAB. 1.1 – Les maladies à Prions animales. ¹Date de la première description.

Chez les humains (Tableau 1.2), les maladies à Prions sont d'incidence rare (environ 1 à 2 cas par million d'individus dans le monde [11]). Quatre formes distinctes ont été décrites sur la base de critères cliniques, neuropathologiques, biochimiques et génétiques : le Kuru [12], le Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), l'Insomnie Fatale Familiale (IFF) [13] ou Sporadique (IFS) [14], et la maladie de Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Plus récemment, la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) a été identifiée, chez des patients présentant des caractéristiques différentes des cas classiques de MCJ. Cette nouvelle forme a pour origine la transmission de l'ESB à l'homme, par ingestion de viande contaminée [15]. Enfin, en 2008, il a été rapporté une nouvelle forme de maladie à Prions humaine, caractérisée par l'absence d'accumulation de protéines Prion résistantes [16].

Une particularité importante des maladies à Prions humaines réside dans leur mode de transmission. La forme la plus courante est sporadique, dans environ 80% des cas [11] : aucune mutation génétique spécifique n'a été détectée et les études épidémiologiques ne révèlent aucun facteur de risque ou de contact avec des ESST humaines ou animales [17]. Les ESST peuvent également être d'origine génétique (dans presque 10 à 15% des cas), dues à une mutation du gène *PRNP* [11]. Actuellement, environ 55 mutations associées aux pathologies et 16 polymorphismes ont été identifiés chez l'homme et l'animal, responsables de la variété de

Nom	Origine - Mode de transmission	¹ Date
MCJ sporadique	Apparition spontanée, avec une incidence moyenne de 1 cas par millions d'habitants et par an	1920
MCJ familiale	Due à une mutation du gène <i>Prnp</i> . Transmission de type autosomique dominant	
MCJ iatrogène	Contamination par : - transplantation (cornée, dure-mère, tympan) - l'utilisation d'instruments chirurgicaux insuffisamment décontaminés - l'utilisation de dérivés thérapeutiques d'origine hypophysaire (hormone de croissance) ou de gonadotrophine	1974 1977 1985
Variante de la MCJ	Transmission par voie alimentaire, lors de l'ingestion de bovins atteints d'ESB. Plus récemment, possibilité de transmission secondaire par transfusion sanguine.	1996
Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Due à une mutation du gène <i>Prnp</i> . Transmission de type autosomique dominant	1936
Insomnie Fatale Familiale	Due à une mutation du gène <i>Prnp</i> . Transmission de type autosomique dominant	1986
Insomnie Fatale Sporadique	Apparition spontanée	1992
Kuru	Transmission par le biais de rites cannibales. Une origine possible serait celle d'un cas sporadique, passé ensuite dans la chaîne alimentaire.	1957

 TAB. 1.2 – Les maladies à Prions humaines. ¹Date de la première description.

maladies à Prions observées [18, 19]. Enfin, les ESST peuvent être d'origine infectieuse. Ce mode de transmission est principalement iatrogène, via l'utilisation d'instruments chirurgicaux insuffisamment décontaminés, les greffes de cornée ou de dure-mère, par l'injection d'hormones pituitaires ou par transfusion sanguine (dans le cas de la vMCJ) [17].

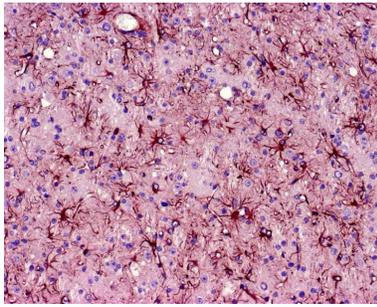
1.2 Des caractéristiques communes

Les ESST ont en commun un grand nombre de traits caractéristiques :

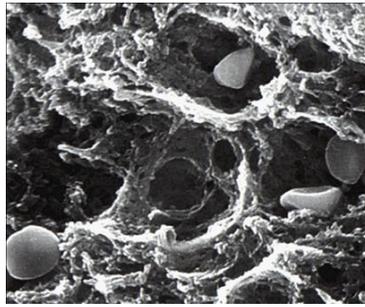
Un caractère transmissible. Elles peuvent en effet se transmettre au sein d'une même espèce ou entre des individus d'espèces différentes. Les premières preuves de cette transmissibilité ont été apportées par les travaux de Cuillé et Chelle en 1936 sur l'inoculation expérimentale de Tremblante à des moutons [20], par ceux de Greig en 1955 sur la transmission naturelle de la Tremblante [21], et par l'inoculation aux primates du Kuru en 1966 [22] et de la MCJ en 1968 [23]. Les agents responsables de cette transmission sont appelés Prions.

Une période d'incubation asymptomatique, qui peut être longue par rapport à la durée de vie de l'individu (jusqu'à 50 ans chez l'homme). Cette phase d'incubation silencieuse est suivie d'une phase clinique rapide, de l'ordre de quelques mois ou années, dont les signes reflètent uniquement une atteinte du système nerveux central (SNC) : démence progressive, myoclonies (contractions musculaires rapides involontaires), ataxie cérébelleuse (trouble de coordination des mouvements).

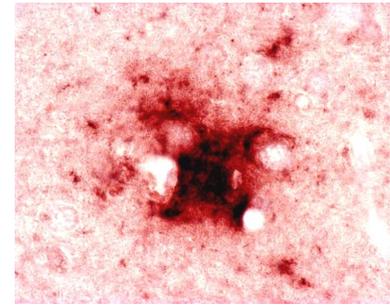
Une dégénérescence du système nerveux central. Les lésions tissulaires observées sont



(a) Astroglie (Détection immunohistochimique de la GFAP x10)



(b) Spongiose (Microscope électronique à balayage x2000)



(c) Plaques amyloïdes (Détection immunohistochimique de la PrP^{res} x20)

FIG. 1.1 – Lésions tissulaires engendrées par les ESST

uniquement confinées au SNC. Elles se manifestent sous la forme d'une triade caractéristique des ESST : mort neuronale massive, spongiose et réaction gliale de type astrocytaire (Figure 1.1). Des plaques amyloïdes formées d'agrégats de nature protéique sont observées de manière non systématique. L'apparition de ces lésions est progressive et continue, et conduit systématiquement à la mort de l'individu. En revanche, aucune réaction immunitaire ou inflammatoire n'a été détectée.

L'accumulation précoce et progressive d'une protéine de l'hôte, la protéine du Prion. Cette protéine s'accumule, sans modification de l'expression de son messager, proportionnellement au titre infectieux, sous une forme anormalement repliée.

Une absence de traitement, curatif ou préventif, et une **absence de moyen de diagnostic** la maladie avant l'apparition des premiers signes cliniques. Malgré la recherche de marqueurs dans le liquide céphalorachidien (LCR), comme par exemple la protéine 14-3-3, le diagnostic de certitude des maladies à Prions humaines reste *post-mortem*, basé sur l'étude anatomopathologique des lésions du cerveau et sur la détection immunologique de la protéine du Prion pathologique dans les tissus nerveux.

2 Modifications moléculaires au cours des ESST

En dehors d'altérations biochimiques réactionnelles, consécutives aux lésions du SNC, la seule modification moléculaire spécifique des ESST est l'accumulation précoce et progressive d'une protéine de l'hôte, la PrP ou protéine Prion. Cette protéine s'accumule proportionnellement au titre infectieux, sans modification de l'expression de son messager, sous une forme anormalement repliée qui lui confère des propriétés de résistance accrue à son propre mécanisme de dégradation. La protéine normalement produite chez l'hôte est appelée PrP cellulaire (PrP^c) ou PrP sensible (PrP^{sen}) et la protéine pathologique est généralement appelée PrP résistante (PrP^{res}).

2.1 La PrP^c

La PrP^c est une sialoglycoprotéine de 33 à 35kDa, codée par un gène ménager unique situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme (gène *PRNP*) [24, 25]. *PRNP* s'étend sur environ 16 kbp. Il contient deux (hamster, humain) ou trois exons (rat, souris, bovin, mouton) selon les espèces. Dans tous les cas, le cadre ouvert de lecture du gène est contenu en totalité sur le dernier exon [26].

2.1.1 Régulation du gène *PRNP*

In vivo ou en culture cellulaire, divers agents ou conditions modifient l'expression du gène *PRNP*. Trois niveaux de régulation ont été identifiés.

Régulation transcriptionnelle. Le gène de la PrP, longtemps considéré comme un gène ménager (car normalement soumis à aucune régulation transcriptionnelle dans un type cellulaire donné) présente dans sa structure un certain nombre de zones de régulation transcriptionnelle :

Facteurs de croissance : la régulation du gène *PRNP* peut être dépendante de facteurs de croissances tels le NGF (*Nerve Growth Factor*) qui entraîne une augmentation de l'expression du gène. Cet effet a été constaté dans des cellules PC12 (phéochromocytome de rat) [27]. Une protéine de la voie MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*), la protéine MEK1 potentialise l'effet du NGF. Des protéines de la voie AKT diminuent l'effet activateur du NGF. Ces résultats suggèrent que le NGF agit via la voie MAPK, du moins dans les cellules PC12 [28].

Acide rétinoïque : l'acide rétinoïque entraîne une diminution de l'activité du promoteur, via l'activation du récepteur RAR (Récepteur de l'Acide Rétinoïque) [28]. Le RAR régulerait un facteur de transcription de type AP-2, et réprimerait l'induction par le sérum de c-fos.

Histones désacétylases, facteur de transcription et sites Sp : Le promoteur possède des sites Sp (3 sites Sp putatifs : le premier de -63 à -54 pb, le second de -51 à -42 pb et le troisième de -18 à -9 pb) [29] qui permettent des interactions directes avec des facteurs de transcription (régulation positive et négative). Ces facteurs de transcription interagissent également avec des histones désacétylases, ce qui suggère que la régulation du gène *PRNP* dépend également de la conformation de la chromatine [27]. Les sites Sp sont inclus dans une région d'ilôts CpG (au moins 35) dans la région -110 à +242 pb. Un inhibiteur d'une histone désacétylase, la trichostatine A, permet une forte augmentation de l'activité du promoteur du gène de la PrP^c dans des cellules de rat PC12 et C6 (gliome).

Facteurs de transcription et sites AP : Le promoteur du gène *PRNP* possède un site AP-1 (-103 à -96 pb), ce qui suggère que des facteurs de transcription de la famille Jun et Fos peuvent s'y fixer [27]. De plus, un site AP-2 (-597 à -591 pb) a également été mis en évidence [29].

Boîte CCAAT : Le promoteur du gène *PRNP* possède une séquence inversée CCAAT (5'-ATTGGTG-3') entre les positions -78 et -72 pb. Cette séquence est un élément de régulation transcriptionnelle [29].

Métaux : Le promoteur du gène *PRNP* possède également des séquences MRE (*Metal Responsive Element*, en position -2075 à -2086 pb) permettant la fixation de métaux (principalement le cuivre), ce qui régule l'activité génique en fonction de la concentration de Cuivre. Il peut donc y avoir une régulation métal-spécifique de l'expression du gène *PRNP* [30].

Régulation par les régions non codantes de l'ARNm. Des études montrent que l'exon 1 et l'intron 1 permettent une régulation de l'expression du gène *Prnp* chez les bovidés, l'intron 1 présentant en particulier une activité promotrice [31].

Régulation par la stabilité de l'ARNm. Comme il existe deux niveaux de polyadénylation de l'ARNm qui influencent la production de PrP (chez le mouton et les bovidés, mais pas chez l'homme ni chez la souris), et que les régions non traduites en 3' peuvent jouer un rôle dans la stabilité de l'ARNm, la stabilité de l'ARNm pourrait constituer un troisième niveau de régulation génique de l'expression de PrP [32].

2.1.2 Structure, synthèse, maturation et dégradation

La PrP^c est une petite protéine globulaire de 253 acides aminés chez l'homme (Figure 1.2). Sa région N-terminale est composée d'un peptide signal de 22 acides aminés, d'une région contenant des répétitions d'hexapeptides et d'octapeptides (résidus 23 à 91) et d'une région hydrophobe correspondant au site d'insertion transmembranaire potentiel de la protéine (résidus 110 à 135). Ce site est précédé d'une séquence d'arrêt de transfert, qui permet l'arrêt de la translocation de la protéine native dans le réticulum endoplasmique (RE). Sa région C-terminale (résidus 232 à 253) est composée d'une zone hydrophobe servant de signal pour l'addition d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la sérine située au résidu 231 [33].

Sa structure tridimensionnelle a été résolue par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à

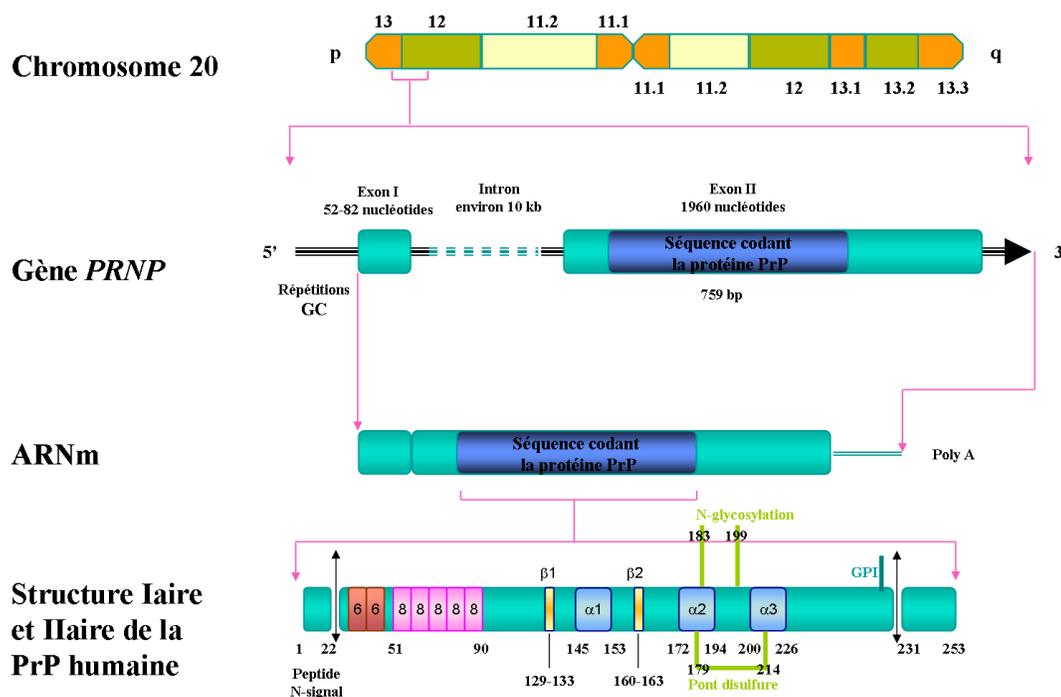


FIG. 1.2 – Structure du gène *PRNP*, de l'ARN messager et structure primaire et secondaire de la PrP humaine.

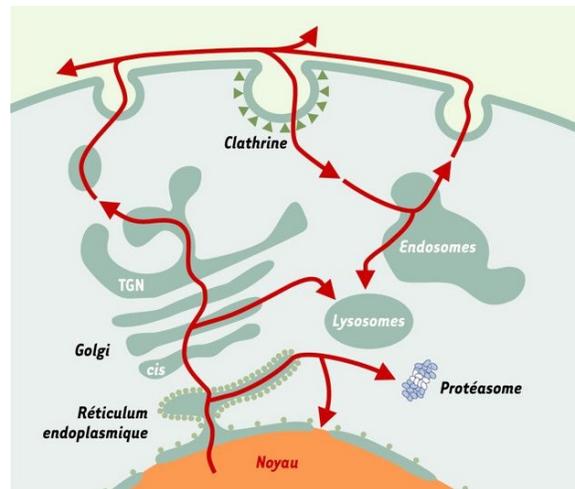


FIG. 1.3 – **Trafic de la Protéine du Prion cellulaire.** (TGN : trans-Golgi network). D'après [41].

partir de PrP recombinante de différentes espèces. Il existe une forte conservation de structure entre les différentes espèces mammifères (présentant une homologie de séquence importante, par exemple 94% entre la PrP de hamster et la PrP de souris) [34–36], mais également entre la PrP de mammifère et celles d'autres espèces présentant une homologie de séquence moindre (poulet, tortue, grenouille) [37]. La PrP se compose d'une longue queue N-terminale flexible, trois hélices α et deux feuillet β antiparallèles. Le pont disulfure fait la connexion entre les hélices 2 et 3. Le deuxième feuillet β et la troisième hélice α sont reliés par une boucle dont la flexibilité est variable selon les espèces. Cette structure tridimensionnelle, obtenue pour de la PrP monomérique recombinante, peut être perturbée par l'ajout de glycosylations [38], la fixation d'ions cuivre au niveau des octapeptides [39] ou encore la dimérisation de la PrP par formation de ponts disulfures intra- et inter-moléculaires [40].

Suite à l'expression du gène *PRNP*, la PrP^c nouvellement synthétisée est dirigée grâce à son peptide signal N-terminal vers le RE, où elle subit différentes modifications post-traductionnelles : le clivage du peptide signal N-terminal et de la région C-terminale, l'ajout de l'ancre GPI, la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines 179 et 214, et l'addition de deux groupements d'oligosaccharides sur les résidus asparagines 181 et 197.

Dans le RE, la PrP^c peut adopter trois topologies différentes : la forme principale avec une ancre GPI, et deux formes transmembranaires, PrP^{Ctm} et PrP^{Ntm} [42]. La PrP mal repliée est alors dégradée via le système ERAD (pour "Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation") : après rétranslocation dans le cytosol, elle est ubiquitinée, puis dégradée par le protéasome [43].

Après le contrôle de qualité effectué par le RE, la PrP^c GPI est ensuite transportée via l'appareil de Golgi jusqu'à la surface des cellules, où elle est ancrée dans la membrane plasmique [44]. L'ajout d'un GPI permet l'ancrage au feuillet extracellulaire de la membrane plasmique de la protéine, localisée majoritairement dans des microdomaines résistants aux détergents (DRM) et riches en sphingolipides, appelés Rafts [45]. Le niveau de glycosylation de la PrP^c peut influencer le trafic vers la membrane de la protéine : les neurones de souris transgéniques dont la PrP est mutée aux résidus d'attaches des glycosylations présentent une accumulation anormale de la PrP dans le Golgi, sans toutefois présenter de signes de neurodégénérescence [46,47]. Une

fois à la surface cellulaire, la PrP^c est internalisée par des mécanismes clathrine- et/ou cavéoline-dépendants [48, 49]. Dans les neurones, la PrP^c endogène semble internalisée aussi rapidement que les récepteurs membranaires classiques, avec un $t_{1/2}$ de l'ordre de 3 à 5 minutes [50]. Une partie de la PrP sera alors recyclée à la membrane ou relarguée par exocytose, l'autre partie sera dégradée soit par les lysosomes [51], soit par le protéasome après rétrotranslocation dans le cytosol [43].

2.1.3 Fonction

La forte conservation du gène *Prnp* au cours de la phylogénèse [52], ainsi que son niveau d'expression élevé dans le cerveau suggèrent un rôle fondamental de la protéine. Cependant, les souris transgéniques *Prnp*^{0/0} sont parfaitement viables. Les souris KO conditionnelles, déplétées en PrP^c 10 semaines après la naissance, confirment que cette viabilité n'est pas due à la mise en place de mécanismes de compensation durant le développement embryonnaire [53]. Des études sur le rôle putatif de la PrP ont révélé son implication dans diverses activités [54].

Métabolisme du cuivre. La PrP^c possède plusieurs régions capables de fixer le cuivre (les octapeptides de la région N-terminale et la région C-terminale située au niveau des 2 histidines) avec une affinité réduite pour des pH faibles, ce qui suggère l'implication de la PrP dans la transport du cuivre de la membrane plasmique vers des vésicules endosomales acides [55].

Fonction anti-oxydante. La PrP^c obtenue par immunoprécipitation à partir de cerveaux de souris montre un taux élevé en cuivre et une activité de type superoxyde dismutase (SOD), indiquant que la PrP elle-même pourrait posséder une activité SOD [56]. Enfin, les lignées cellulaires PrP^{-/-} sont plus susceptibles au stress oxydatif induit par le cuivre ou le peroxyde d'hydrogène. Cet effet est compensé par la réintroduction de la PrP^c via une augmentation de l'activité des SOD et l'inhibition de la caspase 3/9 [57–59].

Signalisation et survie cellulaire. La localisation cellulaire de la PrP^c à la membrane aux niveaux des rafts lipidiques (à l'instar de certains récepteurs membranaires) et ses potentielles interactions avec NCAM, la caveolin, ou encore Grb2, ont conduit plusieurs équipes à évaluer son action sur différentes voies de signalisation cellulaire. En particulier, un couplage fonctionnel de la PrP^c à la NADPH oxydase, conduisant à la production transitoire de dérivés actifs de l'oxygène, a été mis en évidence dans des neurones sérotoninergiques et noradrénergiques [60]. Dans ces cellules, la liaison et l'agrégation de la PrP^c par des anticorps spécifiques induisent l'activation de la voie MAP-kinase ERK, dépendante de la protéine kinase Fyn [61], dont l'implication dans la survie cellulaire est largement documentée.

De même, la PrP^c peut se lier au facteur anti-apoptotique Bcl2, via la région des octapeptides, et protéger des neurones primaires humains contre l'apoptose induite par Bax. De la même façon, la sensibilité accrue des neurones PrP^{-/-} à la privation de sérum peut être contournée la surexpression de la PrP ou de Bcl-2 [54]. De plus, la protéine STI1 (*Stress Inducible Protein 1*) est un ligand spécifique de la PrP^c. La formation de ce complexe dans le cytosol (via la région hydrophobique 113-119 très conservée de la PrP^c) induit la neuritogénèse et la neuroprotection des neurones de l'hippocampe [63], vraisemblablement via l'activation de la voie de signalisation cAMP/PKA [64].

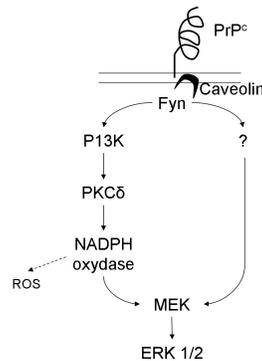


FIG. 1.4 – Voie de signalisation impliquant la PrP^c, dans les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques. D’après [62]

Formation du cytosquelette. La PrP^c recombinante semble induire l’oligomérisation de la tubuline, ce qui limiterait la quantité d’hétérodimères de tubuline disponibles pour la formation des microtubules et modulerait ainsi la formation du cytosquelette [65].

Rôle dans le développement embryonnaire. Des études sur le zébrafish suggèrent que la PrP^c pourrait jouer un rôle dans le développement embryonnaire, via une interaction indirecte avec la protéine E-Cadherin. Cette interaction régulerait le mouvement cellulaire impliqué dans la gastrulation [66].

Rôle dans le fonctionnement synaptique. Cette fonction est suggérée par la localisation de la PrP^c le long des axones et dans les régions présynaptiques [67]. L’ajout de PrP^c recombinante sur des cultures primaires de neurones hippocampaux conduit à l’augmentation du nombre de liaisons synaptiques, impliquant la PrP^c dans la formation des synapses. De plus, les souris PrP^{-/-} montrent des altérations du rythme circadien [68], de l’organisation des fibres nerveuses [69] et de l’excitabilité neuronale [53]. Couplés à la réduction des potentiels après hyperpolarisation des neurones CA1 et pyramidaux, ces résultats semblent indiquer un rôle de la PrP^c dans la modulation de la transmission synaptique [53].

Activation des cellules immunitaires. La PrP^c a récemment été décrite comme étant un composant des structures de signalisation formées à la membrane plasmique lors de l’activation des lymphocytes T [70]. De plus, *in vivo*, l’absence de la PrP^c affecte la prolifération des lymphocytes T en réponse aux cellules présentatrices d’antigènes [71].

2.2 La PrP^{res}

Le développement d’une ESST chez un individu est accompagné de l’accumulation dans le système nerveux central d’agrégats protéiques fibrillaires [72]. Ils sont constitués de PrP^{res}, une forme anormalement repliée et extrêmement résistante de la PrP, qui s’accumule au cours de l’infection, proportionnellement au titre infectieux. La dénomination de la PrP anormale dépend du critère retenu pour la différencier de la PrP normale. Selon la nomenclature biochimique (sur la base de la résistance à la protéinase K), elle est appelée PrP^{res}, pour PrP résistante ; selon

la nomenclature infectieuse, elle est appelée PrP^D (pour PrP "diseased"), PrP^{TSE} (pour PrP ESST), PrP^{sc} (pour PrP Scrapie), PrP^{BSE}, PrP^{CJD}, etc... en fonction de la souche de Prions. Par la suite, nous utiliserons indépendamment l'une ou l'autre des notations.

2.2.1 Structure, synthèse

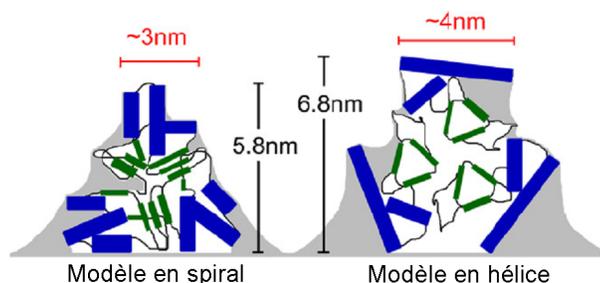
La PrP^{res} dérive de la PrP^c par un mécanisme de transconformation post-traductionnelle, vraisemblablement située à la membrane plasmique (voir Chapitre 2 Section 2.1, page 40). Sa séquence primaire en acides aminés est identique à celle de la PrP^c et les différences observées se situent au niveau des structures secondaires et tertiaires. En effet, bien que sa structure tridimensionnelle exacte n'ait pas encore été caractérisée entièrement, des études de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont mis en évidence un enrichissement en feuillet β (4 feuillets) et un appauvrissement en hélices α (2 hélices) de la PrP^{res} par rapport à la PrP^c [73].

Des anticorps conformationnels capables de reconnaître aussi bien la PrP^c que la PrP^{res} en conditions non dénaturantes suggèrent que la structure des hélices 2 et 3 de la protéine (région C-terminale) est conservée [74]. D'autres anticorps capables de reconnaître uniquement la PrP^c ou la PrP^{res} révèlent que les changements conformationnels se situent essentiellement dans la région centrale hydrophobe de la PrP (résidus 90 à 120 environ). Le tableau 1.3 montre différents anticorps conformationnels testés.

La PrP^{res} se différencie également de la PrP^c par sa capacité à s'agréger en fibrilles, présentant une biréfringence caractéristique des amyloïdes après marquage au Rouge Congo. Ces

Anticorps	Epitope	Espèces	Marquage	Référence
IgG19-33	19-33	Souris	PrP ^{res}	Solfrosi, 2007
IgG89-112	89-112	Humain	PrP ^{res}	Moroncini, 2006
1C5	119-130	Hamster, souris	PrP ^{res}	Choi, 2006
IgG136-158	136-158	Humain	PrP ^{res}	Moroncini, 2006
3F0	137-151	Hamster, souris	PrP ^{res}	Choi, 2006
15B3, VB52	142-148, 162-170, 214-226	Bovin, Homme, Souris	PrP ^{res}	Korth, 1997
Tyr-Tyr-Arg	149-151, 162-164	Souris Hamster, Humain	PrP ^{res}	Paramithiotis, 2003
sphAb3-15	94-100	Bovin	PrP ^c	Miyamoto, 2007
D13	95-104	Hamster	PrP ^c	Peretz, 1997
11F12	93-122	Mouton, Humain	PrP ^c et PrP ^{res}	Chang, 2008
R72	152-163	Hamster	PrP ^c et PrP ^{res}	Peretz, 1997
8E9	155-200	Mouton, Humain	PrP ^c et PrP ^{res}	Chang, 2008
2A11	Feuillet Beta 2	Ovin	PrP ^c et PrP ^{res}	Bilheude, 2008
-	188-199	Ovin	PrP ^c et PrP ^{res}	Eghiaian, 2004
R1	225-231	Hamster	PrP ^c et PrP ^{res}	Peretz, 1997

TAB. 1.3 – Anticorps conformationnels fixant différenciellement la PrP^c et la PrP^{res}


 FIG. 1.5 – Modèles de la structures des protofibrilles de PrP^{res} , dans [75]

fibrilles sont constitués par l'association latérale droite ou en forme d'hélice (selon la souche de Prions) de deux ou trois protofibrilles (*i.e.* association linéaire de monomères de PrP) d'environ 3 nm de diamètre pour de la PrP non glycosylée [75]. Il existe actuellement deux modèles informatiques de la structure des protofibrilles [76] :

le modèle en hélice , qui suppose une association de 3 (ou 6) molécules de PrP^{res} via un alignement en hélice de leurs feuilletts β .

le modèle en spirale , qui suppose une association de 3 molécules de PrP^{res} par le biais d'un alignement parallèles de leurs feuilletts β .

Ces deux modèles sont compatibles avec des données de microscopie électronique et de microscopie à force atomique obtenus récemment pour des Prions de Tremblante adaptés à la souris [75].

2.2.2 Propriétés physico-chimiques, détection

Outre les différences de structure, la PrP^{res} diffère de la PrP^{c} par ses propriétés physico-chimiques. Contrairement à la PrP^{c} , elle est insoluble en présence de détergents non dénatu-



Caractéristique	PrP^{c}	PrP^{res}
Résistance à la PK	-	++
Solubilité dans les détergents	++	-
Digestion à la PIPLC	+++	-
Profil électrophorétique	3 bandes	4 bandes
Hélice α	3 (42%)	2 (30%)
Feuilletts β	2 (3%)	4 (43%)
Temps de demi-synthèse	< 1 heure	15 heures
Temps de demi-vie	3-6 heures	> 24 heures

FIG. 1.6 – Comparaison des isoformes de la PrP : structure et propriétés physico-chimiques.

rants. Elle est également moins relargable que la PrP^c après traitement à la phospholipase C (PIPLC), qui clive l'ancre GPI. En outre, elle possède une résistance partielle à la protéinase K (PK). Cette digestion clive un peptide d'une soixantaine d'acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine. Les fragments résultants possèdent un poids de 27-30 kDa, 20-24 kDa et 15-18 kDa selon la glycosylation de la protéine (bi, mono ou non glycosylée). Cette résistance dépend de la concentration en enzyme, de la température et du temps de digestion. Au contraire, la PrP^c est totalement dégradée par la digestion à la PK.

Les outils actuels pour diagnostiquer une maladie à Prions repose sur la détection de la PrP^{res} dans le système nerveux central par immunohistochimie ou Western blot. Ces tests diagnostiques sont réalisés *post-mortem*, les quantités de PrP^{res} dans les fluides biologiques (LCR, sang, urine) étant trop faibles pour être détectées. Des techniques d'amplification de la PrP^{res} (par PMCA notamment) pourront permettre de passer outre ces limites. Récemment toutefois, une prionopathie sans PrP résistante a été identifié chez l'homme [16]. De même, certains oligomères de PrP infectieuse semble non résistants à la PK, ce qui pose le problème de la détection après digestion.

3 Description des agents étiologiques responsables des ESST

Les agents responsables des ESST sont appelés Prions (pour *Proteinaceous Infectious Particle*) ou Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC). Ils possèdent des propriétés biologiques communes aux virus, mais en raison de leur spectre de résistance aux procédés physico-chimiques de décontamination très en marge du monde microbiologique classique, il est communément admis que les Prions sont de nature protéique.

3.1 Propriétés des agents

Comme les virus, les Prions sont transmissibles. Ils entraînent une infection progressive longtemps asymptomatique, qui ressemble à l'évolution de certaines pathologies associées à des virus lents, comme par exemple la Panencéphalite Sclérosante Subaiguë ou le Syndrome d'Immuno-Déficience Acquis. Ils sont titrables par des procédés de dilutions sériées. Des titres infectieux de 10^8 à 10^{11} DL₅₀ (*i.e.* Dose Léthale 50% ou dose infectieuse pour laquelle 50% des animaux meurent) par gramme de cerveau sont couramment observés [77, 78]. Grâce à des expériences d'ultrafiltration, la taille des ATNC a pu être estimée entre 15 et 40 nm, ordre de grandeur compatible avec celui des virus. A titre d'exemple, la taille des picornavirus (*i.e.* petits virus nus très résistants) est de l'ordre de 25 nm [79]. Enfin, il existe plusieurs souches de Prions (à ce jour, plus de 20 souches différentes d'ATNC ont été identifiées chez des souris génétiquement identiques). La notion de souche se fonde sur l'observation de deux caractéristiques reproductibles : la période d'incubation de la maladie d'une part, et la répartition des lésions dans le cerveau en phase terminale de la maladie d'autre part. Elle sera détaillée plus précisément à la section 4 page 33. Une souche est capable d'infecter une espèce donnée et de franchir les barrières d'espèce.

Contrairement aux virus, les Prions échappent à toute observation directe en microscopie

électronique et ne génèrent ni réaction inflammatoire, ni réponse immunitaire chez l'hôte. En outre, ils possèdent des propriétés de résistance peu communes aux procédés physico-chimiques connus pour inactiver les acides nucléiques :

Résistance à la chaleur : les Prions résistent très bien à la chaleur sèche, alors qu'un traitement à 160°C pendant 1h suffit pour dégrader les micro-organismes [80,81]. L'efficacité de l'inactivation par la chaleur diminue encore si la préparation a été fixée au préalable [82]. En revanche, une température dépassant les 130°C en chaleur humide (stérilisation en vapeur d'eau ou autoclavage) inactive les Prions [83].

Résistance aux rayonnements : la dose d'inactivation à 37% par les ultraviolets (UV) est de 20 000 à 40 000 J/m² pour les Prions, contre seulement 15 J/m² pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [84,85]. Les rayonnements ionisants classiquement utilisés en stérilisation sont peu efficaces : la dose d'inactivation à 37% est de 100 000 Gy pour les Prions contre 100 Gy pour le virus Herpès et 5 000 Gy pour le VIH [86,87].

Résistance aux traitements chimiques : certains désinfectants chimiques comme le permanganate de potassium [88] ou encore les détergents non-ioniques [83] sont inefficaces. De même, des traitements par des nucléases préservent l'infectiosité des Prions. Au contraire, ils sont sensibles à des procédures connues pour dénaturer les protéines, comme la dénaturation par du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) [89], les ions chaotropes, le phénol, le thiocyanate de Guanidium [90] et l'urée [91]. Enfin, des traitements à la soude (1 Molaire, pH14 pendant 1 heure) [91] ou à l'eau de Javel (à 48 degré hypochlorique, contenant 12,5% de chlore actif) [83,88] sont ceux préconisés par l'Organisation Mondiale de la Santé pour décontaminer les Prions.

3.2 Nature protéique des agents

Différentes hypothèses concernant la nature des Prions ont été énoncées, allant d'un sarcocyste (*i.e.* petit parasite unicellulaire du porc et du mouton) à des lipides membranaires, des polysaccharides ou des virus (Tableau 1.4). Néanmoins, l'hypothèse couramment admise à l'heure actuelle est celle d'un agent entièrement protéique. Elle est énoncée pour la première fois en 1967, sur la base des travaux de résistance des Prions aux radiations ionisantes et aux rayonnements UV réalisés par l'équipe de Tikvah Alper [85,93], puis formalisée par le mathématicien Griffith, qui propose trois mécanismes possibles compatibles avec la réplication et le caractère infectieux d'une protéine [94]. Elle est ensuite détaillée grâce à la découverte de la protéine du Prion par Stanley Prusiner en 1982 [72], qui a été récompensé en 1997 par le Prix Nobel de physiologie et de médecine pour "la découverte des Prions : un nouveau principe biologique d'infection". Ses travaux regroupent deux concepts nouveaux, étayés par un faisceau important d'arguments.

La PrP^{res} est le support moléculaire de l'infection

- Le spectre de résistance des Prions aux procédés de décontamination classiques semble incompatible avec la présence d'un acide nucléique
- La PrP^{res} est systématiquement détectée dans les cerveaux des individus infectés et purifiée conjointement avec l'infectiosité.

- Les souris transgéniques KO pour le gène de la PrP sont complètement insensibles à l'infection [95,96]. La susceptibilité à l'infection est restaurée par la réintroduction du gène. De même, le polymorphisme du gène PRNP module fortement la susceptibilité à l'infection et le mécanisme de barrière d'espèce.

- Legname a montré qu'un fragment recombinant de PrP de souris, assemblé *in vitro* sous forme de fibrilles amyloïdes, est capable d'induire une ESST lorsqu'il est inoculé à des souris génétiquement sensibles. Même si le niveau d'infectiosité reste inférieur aux titres infectieux

Date	Nature	
1914	Sarcosporide	M'Gowan identifie la présence de sarcocystes dans les muscles des moutons atteints de Tremblante. Résultat non confirmé par la suite.
1938	Virus filtrable	Cuillé et Chelle tentent d'estimer la taille de l'agent : l'infection persiste après filtration.
1954	Virus lent	Après des essais négatifs pour isoler dans un échantillon de Tremblante des bactéries causant une encéphalite chronique du mouton, Sigurdsonn émet l'hypothèse d'un virus lent.
1966	Polysaccharide répliquant	S'appuyant sur la résistance des ATNC aux rayonnements UV identifiée par Alper, Fields suggère l'implication de polysaccharides associés à un virus lent. Alper propose un polysaccharide servant de modèle pour la réplication.
1967	Protéine	Pattison et Jones déterminent la taille des ATNC, compatible avec celle d'une protéine, et Alper explore le spectre de résistance des agents aux radiations (ionisantes et UV). S'appuyant sur ces travaux, Griffith propose alors plusieurs mécanisme de réplication, dont l'un reste encore très proche de l'hypothèse de la protéine seule.
1967	Fragment membranaire répliquant	Basés sur des extractions successives, Gibbons et Hunter émettent l'hypothèse d'un fragment membranaire, propageant sa structure infectieuse via la fixation de protéines membranaires.
1968	Complexe ADN - Polysaccharide	L'incorporation d'éléments radioactifs, puis la centrifugation des échantillons infectés conduisent Adams et Caspary à supposer que les ATNC sont des complexes ADN/Polysaccharides.
1972	Viroïde	L'agent causal de la maladie des tubercules fusiformes de la pomme de terre est identifié comme étant un petit virus à ARN. Dietner compare ses propriétés, similaires à celle des ATNC.
1978	Lipide	La continuité des expériences d'irradiation d'Alper montre un comportement similaire à celui des compartiments membranaires.
1979	Spiroplasma	Bastian détecte des structures hélicoïdales similaires aux spiroplasmes dans des cerveaux atteints de MCJ. Ces résultats ne seront pas confirmés.
1979	Virino	Dickinson et Outram introduisent le terme Virino pour décrire les ATNC comme des particules petites et immunologiquement neutres (par analogie aux neutrons, ou neutrinos).
1982	Prion (Protéine)	La découverte de la protéine PrP conduit Prusiner à émettre l'hypothèse d'un agent purement protéique, similaire à celle de Griffith.
1984	Virus	Rowher compare l'inactivation à la chaleur des ATNC et de certains virus, trouvant des similitudes importantes. Par la suite (1987), Manuelidis met en évidence un manque de corrélation entre la PrP ^{res} et l'infectiosité et suppose que l'agent est un virus non conventionnel, composé d'un corps protéique et d'un acide nucléique assemblés de façon incomplète.
1989	Acide nucléique mitochondrial	Lors d'un criblage de bibliothèques de cDNA construites à partir de cerveaux de hamsters infectés, Aiken détecte des mitochondries et des mitoplasmes associés au caractère infectieux.
1991	Holoprion	Pour réconcilier le caractère protéique de l'agent et l'existence de souche, Weissmann suggère un agent mixte, composé de la PrP (capable de transmettre la maladie même sans acide nucléique) et d'un acide nucléique porteur de l'information de souche.

TAB. 1.4 – Historique des différentes théories concernant la nature des agents responsables des ESST, d'après [92]

connus [97, 98], l'utilisation de Prions synthétiques est une donnée importante en faveur de l'hypothèse protéique.

La PrP^{res} est capable de transmettre son information de structure.

- Des systèmes de conversion *in vitro* de la PrP^c en PrP^{res} ont permis de générer de l'infectiosité *de novo*. La technique de conversion acellulaire développée par Caughey et Kocisko a confirmé le pouvoir autocatalytique de la PrP^{res} purifiée à partir d'homogénats de cerveaux infectés, mais la quantité importante de PrP^{res} requise pour initier la conversion (PrP^{res} :PrP^c = 50 :1) n'a pas permis de tester l'infectiosité de la PrP^{res} générée *de novo* [99]. Plus récemment, la technique d'amplification par PMCA (pour *Protein Misfolding Cyclic Amplification*) a permis de générer de l'infectiosité et de reproduire les mécanismes de souches et de barrières d'espèces. Cette technique consiste à amplifier des quantités infimes de PrP^{res} contenues dans un échantillon biologique par des cycles de sonication et d'incubation de ces échantillons dans une matrice de PrP^c (homogénat de cerveau sain). Cette technique sera détaillée au Chapitre 3, section 3.1.2 (page 62).

- Il existe chez les champignons un mécanisme d'hérédité non mendélienne (*i.e.* hérédité non liée à un patrimoine génétique), par le biais d'une protéine capable d'adopter une conformation non fonctionnelle. Une fois dans cette conformation, le Prion est alors capable de "convertir" les protéines de même séquence peptidique dans sa propre conformation non fonctionnelle. Les Prions de champignons possèdent toutes les caractéristiques des Prions de mammifères (transmissibilité, formation d'amyloïde, phénomène de souche et de barrière d'espèce, présence obligatoire du gène codant pour la protéine normale pour la propagation du phénotype pathologique). Six Prions de champignons différents sont répertoriés à ce jour (Table 1.5), parmi lesquels les plus connus sont [URE3], [PSI⁺] et [PIN⁺], formes pathologiques respectives des protéines *Ure2p*, *Sup35p* et *Rnq1p* de la levure *S. cerevisia*, et [HET-S] chez le champignon filamenteux *Podospora anserina* [100]. De façon similaire aux Prions synthétiques de mammifères, le phénotype pathologique [PIN⁺] peut-être induit par inoculation d'amyloïdes générées à partir de protéines Rnq1p recombinantes, avec la même efficacité que la transmission naturelle [101].

Toutefois, quelques résultats restent encore à expliquer dans le cadre de l'hypothèse purement protéique.

- Il existe plusieurs souches de Prions [102], isolées expérimentalement chez des souris syngéniques par Dickinson dans les années 70. Néanmoins, de nombreuses études plus récentes vont dans le sens d'une information de souche portée par différents états d'agrégation de la PrP [103, 104]. Cette information a été démontrée chez les Prions de levures [105].

- La présence d'ARN peut stimuler la conversion de la PrP^c en PrP^{res} [106].

- Les agrégats de PrP^{res} ne semblent pas spécifiques de l'infectiosité : des expériences de fractionnement permettent d'isoler des fractions très infectieuses malgré la très faible quantité de protéines présentes [107] alors que des fractions riches en agrégats de PrP^{res} ne semblent pas infectieuses [108, 109]. Par ailleurs, une nouvelle forme de prionopathie humaine sans PrP^{res} a récemment été caractérisée [16]. La transmission des maladies à Prions en l'absence de PrP^{res} détectable pourrait être liée à l'existence d'une conformation alternative, la PrP^{*}, qui n'a encore jamais été isolée [110, 111].

Prion	Protéine affectée	Phénotype	Mécanisme
[URE3]	Ure2p	Expression de gènes requis pour l'utilisation des ressources pauvres en azote, ralentissement de la croissance	Gln3p non retenu dans le cytoplasme
[PSI ⁺]	Sup35p	Augmentation du taux de translecture au niveau des codons stop	Facteur de terminaison de la traduction Sup35p inactif
[PIN ⁺]	Rnq1p	Sur-production de Sup35p, conduisant à l'apparition sporadique du phénotype [PSI ⁺]	Agrégation croisée de Sup35p par les amyloïdes Rnq1p.
[Het-s]	HETs	Incompatibilité des hétérocaryons	inconnu
[β]	Vacuolar B Protease	Mortalité en phase stationnaire, pas de méiose	Échec de la dégradation des protéines cellulaires dans des conditions de privation d'azote
[C]	MAP kinases	Ralentissement de la croissance, augmentation de la pigmentation	inconnu

TAB. 1.5 – Les différents Prions de champignons, d'après [100]

- Des particules rondes de diamètre d'environ 25 nm, ont été isolées, à la fois dans des cerveaux infectieux contenant peu de PrP et dans des lignées cellulaires très infectieuses. Ces particules, similaires à des virus, ne sont pas reconnues par des anticorps anti-PrP [112].

- Enfin, les maladies à Prions appartiennent à un groupe plus large de maladies, les amyloïdoses, caractérisées par l'accumulation de protéines mal conformées capables de s'agréger. Pourtant, à ce jour, les ESST sont les seules amyloïdoses transmissibles, suggérant l'implication d'un mécanisme infectieux autre que la simple agrégation de la PrP. Des résultats d'induction de la maladie d'Alzheimer après injection de fibrilles de peptides A β à des souris génétiquement disposées à développer la maladie viennent toutefois tempérer cet argument [113, 114]. De même, de façon similaire aux Prions, des peptides A β ont été amplifiés par PMCA [115] et des agrégats de polyglutamine recombinante, impliqués notamment dans la maladie de Huntington, semblent capables d'être internalisés par des cellules de mammifères en culture et de se répliquer de façon stable dans le temps [116].

4 Phénomène de souches

Les animaux atteints de maladies à Prions peuvent développer différentes pathologies, dont les caractéristiques cliniques et biochimiques sont généralement conservées au cours de passages successifs dans un hôte donné, alors même que la protéine qui s'accumule est identique (protéine de l'hôte). Par analogie avec les agents infectieux classiques, ces variantes ont été appelées "souches" de Prions. La définition classique d'une souche fait intervenir l'idée d'une variation génétique de l'agent infectieux, c'est pourquoi le phénomène de souches a longtemps été un argument contre l'hypothèse entièrement protéique des agents transmissibles non conventionnels. Le phénomène de souche a décrit pour la première fois en 1961 par Pattison et Millson [117] : des chèvres inoculées avec un même isolat de Tremblante ont développé deux pathologies différentes, dénommées "scratching" et "drowsy" d'après les signes cliniques présentés. Par la suite, environ une vingtaine de souches de Prions a été isolée (voir tableau 1.7). Plus récemment, plusieurs souches atypiques ont également été mises en évidence [104, 118, 119].

4.1 Outils d'étude des souches de Prion

Les souches de Prions sont classées selon différents paramètres. Classiquement, une souche est définie par 2 critères : un profil lésionnel, représentant le degré de vacuolisation dans 9 régions bien définies du cerveau, et un temps d'incubation, c'est-à-dire le temps écoulé entre l'inoculation et l'apparition des premiers signes cliniques ou la mort de l'individu. Dans un hôte donné, cette durée est généralement très reproductible lors d'inoculations successives. *In vivo*, l'analyse histologique des dépôts de PrP^{res} dans le cerveau montre des différences aussi bien en intensité, en zone touchée ou en type de dépôt. De la même façon, les signes cliniques sont utilisés lors de l'étude des souches humaines ou de certaines souches animales.

Les caractéristiques biochimiques des souches sont également utilisées, permettant un typage plus rapide que l'utilisation de modèles animaux, et plus particulièrement le profil de glycosylation et la mobilité électrophorétique de la PrP^{res} après digestion partielle à la protéinase K [104]. Plus récemment, le "Conformation-Dependent Immunoassay" (CDI), basé sur l'affinité différentielle des anticorps pour la PrP selon sa structure tridimensionnelle [120], le "Conformational Stability Assay" (CSA), basé sur la stabilité de la protéine à la dénaturation par du thiocyanate de guanidium [121], ou les polymères conjugués luminescents [122], capables de se fixer sur les agrégats de PrP en émettant une fluorescence structure-dépendante, ont été développés. Enfin, le "Cell Panel Assay" (CPA) est basé sur la susceptibilité différentielle des lignées cellulaires aux différentes souches et permet d'établir une signature spécifique de chaque souche [123].

Les techniques biochimiques ne permettent pas une discrimination complète des souches entre elles. Néanmoins, elles suggèrent que la conformation ou le niveau d'agrégation de la protéine du Prion est responsable de l'information de souche.

Test	Substrat	Vitesse	Coût
Mesure de la période d'incubation	Souris	Années	+++
Profil lésionnel (histologie)	Souris	Années	+++
Histoblots	Immunohistologie	Jours	++
"Conformation-Dependent Immunoassay"	ELISA	Jours	+
"Conformational-Stability Assay"	Western Blot	Jours	++
Site de coupure de la PK	Western Blot	Jours	+
Détection par des anticorps N-terminaux	Western Blot	Jours	+
Profil de glycosylation	Western Blot	Jours	+
Détection des amyloïdes par marquage au Rouge Congo ou à la thioflavine	Histochimie	Heures	+
Polymères conjugués luminescent	Histochimie	Heures	+
"Cell Panel Assay"	Culture cellulaire	Semaines	++

TAB. 1.6 – Principales techniques de typage de souche. + = Faible, ++ = Elevé, +++ = Très élevé. D'après [33].

4.2 Phénomène de barrière d'espèce et d'adaptation de souche

Les souches de Prions isolées dans une espèce donnée sont la plupart du temps moins (voire pas du tout) infectieuses pour d'autres espèces : c'est ce qu'on appelle le phénomène de barrière d'espèce. Celui-ci se traduit principalement par une prolongation et une plus grande variabilité du temps d'incubation, ainsi que par un taux d'attaque réduit (*i.e.* tous les animaux inoculés ne déclenchent pas une maladie à Prions). Les franchissements de barrière d'espèces les plus étudiés sont ceux de l'ESB, capable de se transmettre à un grand nombre d'espèces, dont l'homme. Lorsqu'il y a franchissement de la barrière d'espèce, l'agent infectieux devient progressivement plus virulent au cours des passages successifs chez le nouvel hôte, ce qui se caractérise par une diminution du temps d'incubation jusqu'à stabilisation (en 2 ou 3 passages généralement) : c'est le mécanisme d'adaptation de souche [104].

La capacité du CWD à franchir la barrière d'espèce chez des souris transgéniques tga20 surexprimant la PrP murine, mais pas chez les souris sauvages, suggère l'importance du niveau d'expression de la PrP dans le franchissement de barrière d'espèce [124].

La barrière d'espèce est également modulée par le degré d'homologie entre les séquences primaires de la PrP du donneur et du receveur [125]. En effet, l'expression dans une souris transgénique d'un gène codant pour une PrP non murine, homologue à celle du donneur, a permis dans de nombreux cas de franchir la barrière d'espèce présente lors de la transmission d'une ESST à la souris, avec notamment le passage de l'ESV du vison à la souris [126]. Des souris codant pour la PrP de hamster sont ainsi devenues susceptibles à la souche Sc237 de Tremblante adaptée au hamster, contrairement aux souris non transgéniques [125].

Enfin, des données récentes sont en faveur d'une capacité à franchir les barrières d'espèce liée à la conformation de la PrP ou à son niveau d'agrégation. En effet, le deuxième feuillet β et la troisième hélice α de la PrP sont reliés par une boucle très flexible dans la majorité des espèces, mais entièrement rigide chez l'élan et le cerf, potentiellement à l'origine de la capacité de ces animaux à développer le CWD [127]. De façon similaire, des études réalisées sur des animaux transgéniques mutés dans la région N-terminale non-structurée suggèrent l'implication de cette région [128]. De même, l'utilisation de polymères conjugués luminescents met en évidence une adaptation de conformation induite lors de l'adaptation de souches [122].

Toutefois, ces différents critères sont insuffisants pour caractériser entièrement le mécanisme de barrière d'espèce. En effet, il a été démontré récemment que la MCJ sporadique passe aussi facilement aux campagnols qu'aux souris transgéniques surexprimant la PrP humaine, malgré une homologie de séquence plus faible [129]. De plus, des outils de typage comme le "Cell Panel Assay" se basent sur la susceptibilité cellulaire différentes selon la souche, malgré des séquences donneuses identiques (souches passées à la souris) et des séquences receveuses identiques, indiquant que d'autres critères sont impliqués [123].

CHAPITRE 1 : Description des maladies à Prions

Souche	Origine	Hôte	Rôles dans la compréhension du mécanisme de souche
DY, HY	ESV (Stetsonville)	Hamster syrien	Premiers résultats en faveur d'une spécificité de souche portée par la conformation de la PrP elle-même et non un acide nucléique (Hill 2004), en comparaison avec la souche HY; compétition de souche (Barz 2007).
263K	Souche 'Drowsy' passé chez la souris, puis le rat	Hamster syrien	Franchissement d'une BE absolue par l'utilisation de souris transgénique exprimant la PrP de hamster (Scott 2003); Existence d'infections subcliniques (souris asymptomatiques capable de répliquer des Prions infectieux pour le hamster) (Race, Nature 1998); Estimation de la taille des particules infectieuses (Silveira 2005).
139H	Souche murine Chandler	Hamster syrien	Accumulation de la PrP ^{res} dans différentes zones du SNC selon la souche (Hecker 1992); Identification des composants minimales requis pour la transmission <i>in vitro</i> (Deleault 2007).
ME7-H	Souche murine ME7	Hamster syrien	Phénomène de convergence de souche (redonne la souche ME7 quand passé à la souris) (Kimberlin 1987); Identification de la taille des particules infectieuses comme un déterminant du temps d'incubation ? (avec 139H et 263K, Beringue Neuprion 2008).
ME7	Cas naturel de Tremblante isolée chez un mouton Suffolk	Souris (Prnp-a)	Mise en évidence de l'adaptation de souche et de l'existence de porteurs asymptomatiques au 1er passage (Zlotnick 1965); Mise en évidence d'infections subcliniques quand infection à de faibles doses (Thackray 2002).
87A	Tremblante naturelle adaptée à la souris à partir d'un mouton Cheviot x Border Leicester	Souris (Prnp-a)	Génotype comme modulateur du temps d'incubation (Dickinson 1977).
87V	Tremblante naturelle adaptée à la souris à partir d'un mouton Cheviot x Border Leicester	Souris (Prnp-b)	Génotype comme modulateur du temps d'incubation (Dickinson 1977).
221C	Tremblante naturelle à partir de moutons ARQ/ARQ (différentes espèces)	Souris (Prnp-b)	Identification récente de la souche : évolution temporelle de la diversité de souche ? (Bruce 2002).
79A	Chèvre 'Drowsy'	Souris (Prnp-a)	Identification de profils lésionnels différents selon les souches (Fraser 1967).
79V	Chèvre 'Drowsy'	Souris (Prnp-b)	
139A	Tremblante adaptée à la souris (VM) à partir d'une chèvre infectée par la souche 'Drowsy'	Souris (Prnp-a)	Efficacité variable en fonction de la voie de transmission (Kimberlin 1978); Conservation possible du phénotype de souches, même après transmission dans des espèces intermédiaires (rat) (Kimberlin 1987).
22C	Tremblante adaptée à la souris (C57BL) à partir d'un mouton Cheviot infecté par la souche SSBP/1	Souris (Prnp-a)	Phénomène de compétition de souche (Dickinson 1975, Kimberlin 1985); Emergence d'une nouvelle souche après transmission intermédiaire chez le hamster (Kimberlin 1989).
22H	22C non cloné	Souris (Prnp-b)	Co-existence de souche : composé mineur de la souche 22C non cloné.
22A	Tremblante adaptée à la souris (C57BL) à partir d'un mouton Cheviot infecté par la souche SSBP/1	Souris (Prnp-b)	Phénomène de compétition de souche (Dickinson 1975, Kimberlin 1985); Récupération du phénotype d'origine après transmission chez le hamster (Kimberlin 1989).
22F	22A clonée ou non	Souris (Prnp-a)	Emergence de nouvelles souches après passage avec une PrP différentes par transmission croisée.
22L	Tremblante adaptée à la souris (C57BL) à partir d'un mouton Cheviot infecté par la souche SSBP/1	Souris (Prnp-a)	
301C	ESB	Souris (Prnp-a)	ESB indépendante de la Tremblante (Moralès 2007); Très forte conservation des caractéristiques de l'ESB, même après passages dans différentes espèces.
301V	ESB	Souris (Prnp-b)	idem 301C.
Fukuoka	sCJD	Souris	
Drowsy	Transmission de SSBP/1 à la chèvre	Chèvre	Première mise en évidence du phénomène de souche, sur la base de signes cliniques différents (Pattison et Milson 1961); Divergence de souche ou co-existence ?
Scratching	Transmission de SSBP/1 à la chèvre	Chèvre	idem
SSBP/1	Pool de cerveaux de moutons atteints de Tremblante	Mouton	Identification du génotype comme facteur de susceptibilité chez l'ovin (Davies 1985); Tropisme lymphoïde (Davies, 1985); mise en évidence des souches différentes.
CH1641	Tremblante expérimentale, isolée chez un mouton Cheviot, puis passée dans une lignée résistante à la souche SSBP/1	Mouton (A/A ¹³⁶)	Identification du génotype comme facteur de susceptibilité souche-dépendant chez l'ovin (Davies, 1985) et la chèvre (Goldmann 1996); Transmission à la souris impossible.

TAB. 1.7 – Principales souches expérimentales de Prions

Chapitre 2

Mécanismes de réplication des Prions et physiopathologie

La transmissibilité est la caractéristique principale qui différencie les maladies à Prions des autres amyloïdoses. Mais comment l'infection d'un organisme est-elle déclenchée ? Comment les Prions se propagent-ils jusqu'au SNC pour s'y accumuler ? Les recherches menées aux cours des dernières décennies ont permis d'élucider partiellement les voies de migration des agents infectieux du système lymphoïde périphérique (SLP) au SNC de l'organisme hôte, les sites de multiplication des agents et les partenaires cellulaires impliqués dans cette réplication, ainsi que certains mécanismes moléculaires impliqués dans le changement de conformation.

1 Propagation des Prions à l'échelle d'un individu

Les modèles animaux disponibles (souris, hamster, primates,...), couplés à l'amélioration constante de la sensibilité des techniques de détection de la PrP^{res}, ont permis d'étudier en détail la localisation des Prions et leurs voies de propagation dans l'organisme.

1.1 Localisation des Prions dans l'organisme

Les Prions se répliquent essentiellement dans le système nerveux central, mais ils sont aussi détectables dans de nombreux tissus périphériques, en fonction du tropisme de la souche de Prions inoculée et de la voie de transmission. Le système lymphoïde (rate, ganglions lymphoïdes) constitue le réservoir principal d'infection en périphérie. De l'infectiosité est également détectée dans la cavité buccale (ganglion trigéminal, glandes salivaires, tissu gingival, pulpe dentaire et langue) [130], dans les fibres nerveuses des glandes sébacées de la peau [131], dans la muqueuse olfactive et dans les organes lymphoïdes associés au tractus digestif (plaque de Peyer, ganglions mésentériques, rectum). Ces tissus peuvent constituer les voies d'entrée naturelles potentielles pour les agents infectieux dans l'organisme.

De même, de l'infectiosité s'accumule dans les sites extraneuraux ou extralymphatiques, comme les muscles squelettiques [132], le placenta [133] ou les glandes mammaires (en association avec une inflammation) [134]. Pour la plupart, ces tissus ne sont pas en contact direct avec l'environnement, ce qui suggère leur faible implication dans la transmission interindividuelle naturelle des ESST, sauf pour les placentas animaux capables de contaminer les sols [133].

Enfin, les fluides corporels sont également porteurs d'infectiosité et constituent un vecteur important de transmission naturelle horizontale par contact direct ou par contamination des sols. En effet, de la PrP^{res} est détectable en faible quantité dans l'urine de hamster atteint de Tremblante, de bovins ESB et d'humains MCJ en cas d'infection concomitante avec une inflammation des reins [135, 136]. Elle peut être infectieuse chez des hamsters [137], mais pas chez les cerfs [138], avec un titre infectieux d'environ 3,8 LD₅₀/mL d'urine [139]. De même, de l'infectiosité a été détectée dans la salive [138], dans le sang [140], et plus récemment dans les fèces [141], le lait et le colostrum, bien qu'à des doses faibles [142].

La distribution de l'infectiosité dans l'organisme est modifiée en cas d'inflammation lymphocytaire chronique. Des organes non lymphoïdes comme les reins, le foie et le pancréas chez la souris [143], ou encore les glandes mammaires chez les moutons, atteints de mammite [134], participent alors à la réplication ectopique de l'infectiosité. Plus récemment toutefois, des dépôts de PrP^{res} ont été identifiés dans les reins de moutons atteints de Tremblante naturelle ou expérimentale, sans présence d'inflammation [144]. Les foyers inflammatoires locaux semblent recréer dans les tissus inflammés les conditions propices à la réplication des Prions dans les organes lymphoïdes, comme la production de lymphotoxines α et β nécessaires à la maturation des cellules folliculaires dendritiques (CFD) [145, 146].

1.2 Propagation des Prions dans l'organisme

La contamination périphérique (principalement par voie alimentaire) représente la voie de pénétration naturelle des agents infectieux dans l'organisme, même si d'autres modes de contamination expérimentaux ou accidentels ont été répertoriés. La pathogénèse dépend fortement de la souche de Prions et du mode de transmission. Néanmoins, on peut distinguer plusieurs étapes :

L'accumulation des agents infectieux dans les tissus lymphoïdes. Après infection par voie orale, les Prions doivent d'abord franchir la barrière intestinale, vraisemblablement par un mécanisme de transcytose dépendant des cellules épithéliales membranaire (cellules M) [147]. Les cellules dendritiques mobiles, connues pour capturer directement les antigènes dans la lumière de l'intestin, pourraient également être responsables de la transmission initiale [148]. Après avoir traversé la barrière épithéliale, la PrP^{res} semble être phagocytée par des cellules présentatrices d'antigènes, comme les macrophages et les cellules dendritiques (CD). Les macrophages semblent avoir un rôle protecteur [149, 150], au contraire des CD, qui conduiraient les agents infectieux aux CFD présentes dans les plaques de Peyer et les autres organes lymphoïdes [151]. En cas d'atteinte des plaques de Peyer, une neuroinvasion directe via le nerf vague est possible, en raison de la forte innervation des plaques de Peyer [152].

Après inoculation intrapéritonéale ou infection par transfusion sanguine, l'atteinte du système lymphoréticulaire (SLR) est plus importante : le titre infectieux des organes du SLR augmente jusqu'à un plateau et persiste tout au long de la maladie, sans toutefois causer de lésions spécifiques. Des études montrent une colocalisation dans la rate de l'accumulation de PrP^{res} et des CFD matures, qui sont le réservoir majoritaire d'accumulation des Prions en périphérie [153]. Malgré l'absence de réaction immunitaire, les souris immunodéficientes sont résistantes à l'infection et la susceptibilité à l'infection est rétablie par la restauration du pa-

trimoine de lymphocytes B (LB) n'exprimant pas la PrP^c [154]. Les LB ne participent ainsi pas directement à la multiplication des Prions, mais sont essentiels à la réplication, grâce à la production de lymphotoxines α et β qui contribuent au maintien et à la maturation des CFD. En revanche, les lymphocytes T ne semblent pas impliqués dans la réplication.

Les Prions sont alors transportés vers les terminaisons du système nerveux périphérique (SNP), par un mécanisme mal identifié. De nombreux travaux récents suggèrent une diffusion passive par relarguage des exosomes de CFD [155, 156], justifiée notamment par la proximité des CFD et des cellules neuronales innervant la rate [157]. Néanmoins, ce mode de propagation n'exclut pas d'autres modes de transfert des Prions. La présence de la PrP^{res} à la surface des cellules infectées pourrait, par contact de membranes à membranes, déclencher les premiers évènements de conversion à la surface des cellules cibles. L'infection pourrait alors progresser de proche en proche, entre cellules adjacentes [158]. De même, l'hypothèse d'un transport actif par des cellules mobiles a également été proposée, possiblement par le biais des cellules dendritiques mobiles CD11c+ [148, 159].

Le transport des Prions vers le cerveau et la moelle épinière (neuroinvasion). Après multiplication des Prions dans le SLR, les Prions colonisent le SNC via les trajets nerveux qui relient le SNP au SNC par un transport le long des nerfs des systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques [160]. En effet, les souris ayant subi une sympathectomie montrent un temps d'incubation prolongé, au contraire des souris transgéniques présentant une hyperinnervation des organes lymphoïdes qui présentent un temps d'incubation très court après inoculation périphérique [161].

La propagation des Prions le long des nerfs est modulée par le niveau d'expression de la PrP^c. Les Prions pourraient être transportés depuis les terminaisons axonales vers le SNC par un transport rétrograde, déjà identifié pour la PrP^c. Néanmoins, plusieurs études estiment la vitesse de propagation entre 0.7 et 2 mm/jour, ce qui n'est pas compatible avec un transport axonal rétrograde (de l'ordre de 15 à 25 cm/jour) [162]. De plus, des souris présentant une altération de la dynéine, une protéine cargo impliquée dans le transport axonal, ne montrent pas de différence significative de temps d'incubation [163]. Plus récemment, des expériences de neurectomie du nerf sciatique ont montré que la propagation des Prions est possible le long des nerfs, même en l'absence de transport axonal [164]. D'autres modes de propagation sont à l'étude, comme la transmission séquentielle des Prions le long des cellules de Schwann [165], ou plus récemment, la transmission par nanotubes identifiée *in vitro* pour des cellules neuronales CAD [166].

Du SNC vers la périphérie. Enfin, de la PrP^{res} est détectable en périphérie (dans la langue ou les muscles squelettiques), même après infection par voie intracrânienne, résultant possiblement d'une dissémination des Prions du SNC vers la périphérie via les nerfs sensoriels ou moteurs [152].

La pathogénèse des maladies à Prions à l'échelle d'un individu reste encore très descriptive. Néanmoins, des partenaires moléculaires participant à la réplication des Prions ont été identifiés

et leur étude a permis une meilleure caractérisation des mécanismes cellulaires mis en oeuvre au cours d'une infection à Prions.

2 Mécanismes cellulaires de réplication et physiopathologie cellulaire

L'environnement cellulaire joue un rôle primordial dans la réplication des Prions, ce qui est souligné d'une part par la difficulté de générer de l'infectiosité dans un contexte complètement acellulaire, et d'autre part par la difficulté d'interprétation des expériences de mutations de la PrP, dont les effets sur la réplication des Prions à l'échelle d'un individu ne peuvent être décorrélés des effets sur le trafic cellulaire de la PrP [167].

2.1 Localisation subcellulaire du mécanisme de conversion

La localisation subcellulaire de la PrP^{res} reste difficile à établir, en raison du manque d'anticorps spécifiques de la forme pathogène de la PrP. Elle semble principalement se situer à la membrane plasmique et dans le compartiment endosomal. Il a également été montré *in vitro* que des molécules PrP^{res}-like (*i.e.* qui ont la conformation de la PrP^{res}, mais ne sont pas nécessairement infectieuses) s'accumulent dans le cytoplasme des cellules infectées [168].

De nombreuses études suggèrent que la conversion pourrait avoir lieu au niveau de la membrane plasmique, où se passent les premiers contacts entre la PrP^c endogène et la PrP^{res} exogène [169, 170]. Notamment, empêcher le transport de la PrP^c à la membrane prévient la formation de PrP^{res} [171]. Il reste à déterminer pourquoi la membrane cellulaire est favorable à la transconformation. Est-ce parce que :

- (i) la PrP^c a acquis lors de son transport des modifications post-traductionnelles indispensables à sa conversion ?
- (ii) les facteurs environnementaux spécifiques de la membrane influencent la conversion (en particulier, les lipides membranaires) ?
- (iii) la PrP^c membranaire est requise pour l'internalisation de la PrP^{res}, et sa redirection vers d'autres compartiments intracellulaires ?

Il est également possible que la conversion ait lieu après l'internalisation de la PrP^{res} [172]. En effet, bloquer l'endocytose réduit l'accumulation de PrP^{res}. Enfin, des études impliquent également le RE et l'appareil de Golgi [49, 173]. Notamment, la stimulation du transport rétrograde et l'accumulation de la PrP^c dans le RE, grâce à la surexpression de Rab6a, augmente l'accumulation de PrP^{res} dans des cellules infectées [174].

Deux mécanismes distincts ont été envisagés : dans les cas génétiques, le RE pourrait être directement impliqué dans le mauvais repliement de la PrP [49] ; et dans les cas infectieux, il pourrait être un compartiment d'accumulation de la PrP^{res} produite dans un autre compartiment (PrP^{res} exogène, PrP^{res} produite à la membrane) [44].

2.2 Réponses cellulaires à l'infection

2.2.1 Neurodégénérescence et toxicité cellulaire

Les lésions observées au cours des maladies à Prions sont bien décrites et sont toutes situées dans le SNC, malgré la présence d'infectiosité dans les organes périphériques. Elles consistent principalement en une mort neuronale massive (par apoptose ou par autophagie [175]) et une astrogliose importante. Plusieurs mécanismes sont possiblement à l'origine de cette mort neuronale :

Réaction inflammatoire locale trop importante : l'étude histologique des cerveaux infectés montre une activation astrogliale et microgliale, qui semble être la conséquence de la présence de la PrP^{res} ou de dérivés réactifs de l'oxygène dans les neurones. Elle est caractérisée par une augmentation de facteurs d'inflammation (composants du complément, cytokines, chimiokines), qui conduirait alors à la mort des neurones infectés ou non [176].

Perte de fonctionnalité de la PrP^c : la PrP^c intervient dans des voies de signalisation assurant l'homéostasie de la cellule. En particulier, la PrP^c active dans les neurones la NADPH oxydase, qui, à son tour, génère à partir de l'oxygène des radicaux libres qui participent à l'équilibre redox de la cellule. En cas d'infection, la PrP^{res} pourrait agir comme un dominant négatif de la PrP^c ou au contraire, pourrait activer de façon permanente la NADPH oxydase. La sous- ou la sur-production de radicaux libre entraînerait alors la mort cellulaire [177].

Processus apoptotique directement induit par la PrP^{res} : Certains peptides dérivés de la PrP semblent neurotoxiques. Le plus caractérisé est le peptide 106-126, qui possède des caractéristiques similaires à la PrP^{res}. Ce peptide induirait un stress du réticulum endoplasmique, menant au relargage du cytochrome c mitochondrial, à l'activation de la caspase-3 et à la mort cellulaire [178]. En outre, des fibrilles amyloïdes générés à partir de protéines recombinantes ont aussi montré un effet neurotoxique sur des cellules neuronales en culture [179]. Néanmoins, la neurotoxicité n'est pas toujours associée à la présence de dépôts amyloïdes : les souris exprimant une PrP sans ancre GPI sont capables de répliquer l'infection, présentent des plaques amyloïdes, mais restent asymptomatiques [180]. Ce manque apparent de corrélation entre l'évolution de la neurodégénérescence et l'accumulation de PrP^{res} peut s'expliquer si seuls quelques intermédiaires de réplication sont neurotoxiques. Dans ce sens, les petits oligomères s'avèrent plus toxiques sur des cellules en culture que les fibrilles amyloïdes [181]. De même, l'existence d'un intermédiaire conformationel labile, la PrP^L a été proposée par Collinge, mais reste encore à démontrer [118].

Cette toxicité des différents polymères de PrP^{res} pourrait être induite par la formation de canaux ioniques membranaires venant déréguler l'homéostasie de la cellule.

Modification de la fonction de la PrP^c sous l'action de la PrP^{res} : Enfin, certains auteurs ont émis l'idée d'une modification de la fonction de la PrP^c, médiée par la PrP^{res}. En effet, l'accumulation de la PrP cytosolique semble être toxique pour certaines lignée cellulaire. En conditions normales, la PrP^c cytosolique est dégradée via la protéasome. Or, il est décrit que la PrP^{res} inhibe le protéasome. Ainsi, la présence de PrP^{res} pourrait entraîner une accumulation

de la forme cytosolique et une cascade de signaux de mort neuronale [182]. Il a très récemment été décrit que ces signaux de mort cellulaire pourraient découler de l'association de la PrP^c cytosolique avec la mahogunin, une ligase de l'ubiquitine E3 [183].

Toutefois, l'idée d'une perturbation de la fonction de la PrP^c sous l'effet de la PrP^{res} s'oppose au syndrome de Shmerling, dans lequel une dégénérescence des cellules granulaires du cervelet chez des souris transgéniques exprimant des formes tronquées de PrP dans sa région amino-terminale (32-121 et 32-134) sur fond génétique Prnp^{0/0} peut être supprimée si la PrP^c sauvage est exprimée conjointement aux transgènes délétères [184].

2.2.2 Autres réponses à l'infection

Des techniques d'études du transcriptome (puces à ADN) ont permis d'analyser à haut débit les réactions cellulaires à l'infection. Ainsi, les transcrits isolés à partir de cerveaux de rongeurs infectés par différentes souches [185,186], des rates de souris infectées [187], de cultures primaires [188] ou de lignées cellulaires chroniquement infectées [189] ont permis d'identifier de nombreux gènes dérégulés en cas d'infection. Ces gènes interviennent entre autres dans le transport des protéines, le métabolisme énergétique ou la croissance cellulaire. Toutefois, la significativité des gènes identifiés (réponse secondaire liée à l'activation microgiale ? réponse spécifique d'une lignée ? différences liées à la dérive cellulaire, non spécifiques de l'infection ? [190]), ainsi que les relations entre ces gènes dérégulés restent encore à établir.

Par ailleurs, la possibilité d'infecter transitoirement des cellules montre que des mécanismes de défense cellulaire peuvent se mettre en place pour contrer l'infection [191]. Les travaux d'Aguib et al ont récemment identifié un tel mécanisme [192]. Les cellules neuroendocriniennes en culture diminuent la quantité de PrP^c lorsqu'elles sont mises en contact avec de l'homogénat de cerveau infecté par une souche de Tremblante ou par du milieu de culture conditionné par des cellules infectées. Cette diminution s'effectue au niveau de la synthèse d'ARN messager, de façon rapide (dans les heures qui suivent l'exposition à l'inoculum) et indépendante de la formation *de novo* de PrP^{res}. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus *in vivo*, qui démontrent la décroissance de la PrP^c surfacique observée précédemment dans les cerveaux de souris infectées par différentes souches de Tremblante ou d'ESB adaptées à la souris [193]. Le mécanisme précis de régulation du gène PRNP conduisant à cette diminution reste une question ouverte. En particulier, il reste à déterminer si c'est une réponse directe à l'infection (*i.e.* exposition à de la PrP^{res}) ou aux facteurs inflammatoires et aux cytokines présents dans l'inoculum.

Les follicules lymphoïdes des Plaques de Peyer montrent au contraire une augmentation de la quantité d'ARN messager codant pour la PrP une fois l'infection établie [194].

Enfin, les cellules neuroendocriniennes montrent une augmentation significative de la vitesse de croissance, possiblement médiée par l'augmentation des kinases Src [192]. Cette augmentation de la vitesse de croissance s'accompagne d'altérations morphologiques qui évoquent une dédifférenciation des cellules après inoculation par des Prions [192].

2.3 Susceptibilité cellulaire à l'infection

La PrP^c est une protéine ubiquitaire, présente dans la plupart des cellules. Pourtant, peu de cellules ont la capacité de répliquer l'infection. Cette notion de susceptibilité (ou à l'inverse la notion de résistance) aux infections à Prions est un concept complexe qui regroupe plusieurs notions, difficilement distinguables expérimentalement :

- (i) la susceptibilité cellulaire relative ou absolue : des lignées cellulaires sont capables ou non de produire et d'accumuler de la PrP^{res} néosynthétisée à des niveaux différents, possiblement à des seuils indétectables ;
- (ii) la restriction de souche dans le phénomène de susceptibilité, où les cellules peuvent accumuler de la PrP^{res} après inoculation de différentes souches.

La présence de la PrP^c est indispensable au caractère susceptible d'une cellule. Il a en effet été montré que des souris n'exprimant pas le gène *Prnp* sont insensibles aux Prions [95], alors qu'à l'inverse, des souris hyperexprimant ce gène deviennent plus sensibles à l'infection, avec une réduction de la période d'incubation [195]. Toutefois, la grande majorité des cellules expriment la PrP^c, alors qu'*in vivo*, seuls les neurones, les astrocytes et les cellules folliculaires dendritiques sont capables de répliquer les Prions. Ce sont des cellules à demi-vie longue, à faible pouvoir mitotique et capables de faire des prolongements.

Le deuxième critère est la séquence primaire de la PrP. Des polymorphismes au sein de cette séquence peuvent induire des différences de susceptibilité à une souche de Prion donnée, et peuvent même conduire au franchissement de barrière d'espèces. En particulier, il existe chez les humains un polymorphisme au codon 129 (valine ou méthionine), associé à la susceptibilité à la MCJ. Les hétérozygotes sont sous-représentés chez les patients atteints, par rapport à la population totale. Environ 40% de la population est homozygote Méthionine, contre 78%, 50% et 100% chez les patients atteints respectivement de MCJ sporadique, iatrogène et du vMCJ. Le polymorphisme au codon 129 influence également le phénotype lié à d'autres mutations, comme la mutation de l'acide aspartique en Asparagine au codon 178, donnant la MCJ familiale dans le cas Val 129 ou l'IFF dans le cas méthionine [104]. Il existe également chez les ovins un polymorphisme naturel du locus *Prnp*, auquel est étroitement liée la susceptibilité de l'hôte à la maladie. Ce déterminisme est majoritairement associé aux codons 136, 154 et 171 pour la PrP ovine. Or les cas de Tremblante atypiques incluent fréquemment des animaux porteurs des allotypes Ala¹³⁶His¹⁵⁴Gln¹⁷¹ (AHQ) ou Ala¹³⁶Arg¹⁵⁴Arg¹⁷¹ (ARR), traditionnellement associés à une résistance marquée à la tremblante naturelle [104]. Un polymorphisme associé aux régions régulatrices du gène *Prnp* capable de moduler la susceptibilité à l'agent de l'ESB a également été récemment identifié [196]. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette modulation de la susceptibilité à l'infection ne sont pas encore connus

Ces critères seuls ne suffisent pas à caractériser entièrement la susceptibilité cellulaire. En effet, *in vitro*, des lignées cellulaires sont chroniquement infectables malgré des vitesses de division importante [197]. Un tableau résumant les modèles cellulaires infectables par des souches de Prion est donné page 58. De plus, au sein même d'une lignée cellulaire infectable (avec la même séquence primaire de la PrP), des dilutions limites successives de cellules permissives aux Prions ont montré qu'il existe une grande hétérogénéité de susceptibilité entre les cellules [198]

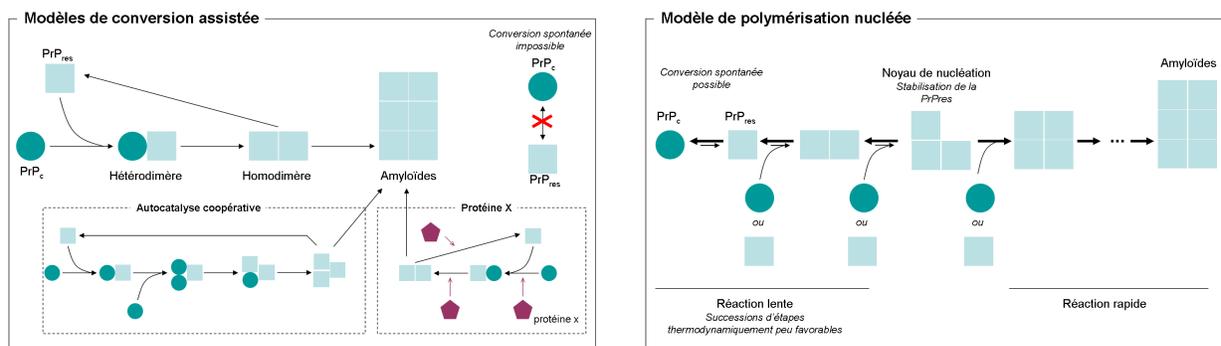


FIG. 2.1 – Hypothèses sur le mécanisme de conversion de la PrP

et que cette susceptibilité est un phénomène peu stable au cours du temps, suggérant la possibilité d'un phénomène épigénétique lié à la régulation cellulaire de certains facteurs non stables dans le temps [199].

3 Mécanismes moléculaires de conversion

La conversion de la PrP^c en PrP^{res} est un évènement clé du processus infectieux, qui n'est toujours pas élucidé, principalement à cause de l'absence de structure précise de la protéine pathologique.

3.1 Hypothèses sur le mécanisme de conversion

Dans le cadre de l'hypothèse purement protéique de Prusiner, plusieurs modèles de conversion ont été énoncés (Figure 2.1) :

Le modèle de repliement. Appelé aussi modèle de l'hétérodimère ou modèle de conversion assistée, il a initialement été introduit par Prusiner pour appuyer la théorie d'un agent protéique [200]. Sous sa forme la plus simple, il suppose qu'une molécule de PrP^c est capable de se fixer sur une molécule de PrP^{res} , ce qui induit de manière catalytique son changement de conformation. Après séparation du dimère ainsi formé, chaque protéine anormale peut alors agir comme modèle de repliement, assurant ainsi la multiplication de l'agent de proche en proche. Une fois une concentration critique atteinte, la PrP^{res} s'agrège en fibrilles amyloïdes.

Cette théorie s'accorde bien avec la croissance exponentielle de la PrP^{res} observé en cas de contamination. Néanmoins, sur le plan thermodynamique, la transconformation spontanée de la protéine normale en sa forme pathologique ne s'explique que par l'obtention d'un niveau énergétique plus bas du dimère, très stable, et donc ne se séparant pas pour donner deux nouvelles particules infectieuses. Des modèles alternatifs ont ainsi été proposés. Le modèle de réplication coopérative [201] suppose que la protéine convertissante n'est plus un monomère de PrP^{res} , mais un agrégat mixte de PrP^{res} - PrP^c (par exemple un dimère ou un trimère de PrP^{res}). Le modèle de dimérisation de Tompa [202] suppose qu'un dimère de PrP^c vient fixer un dimère

de PrP^{res} (la dimérisation se faisant via la formation des ponts disulfures). Enfin, le modèle de la protéine chaperonne nécessite l'intervention d'une protéine "X" de structure proche du Prion. Il pourrait s'agir d'une protéine chaperonne, dont le rôle naturel est d'aider les protéines à acquérir la conformation spatiale adaptée à leur fonction.

Le modèle de polymérisation nucléée, proposé par Lansbury [203]. Alternative au modèle de conversion coopérative, ce modèle suppose que les deux formes de la protéines sont en équilibre thermodynamique dans la cellule, cet équilibre étant déplacé vers la forme normale chez l'animal sain en raison de la faible stabilité de la PrP^{res} monomérique. La PrP^{res} est capable de s'agréger, de façon très lente, jusqu'à atteindre une taille critique, qui stabilise la PrP^{res} et accélère l'agrégation. L'équilibre se déplace alors vers la forme pathologique. La fragmentation des polymères formés, observée expérimentalement par le biais de protéines chaperonnes chez les Prions de levures, est essentielle pour multiplier le nombre de particules infectieuses et conduire à l'accumulation exponentielle de la PrP^{res}. La phase de latence observée expérimentalement lors des expériences de fibrillisation correspond à l'étape limitante de nucléation.

Ce modèle est le plus largement accepté à l'heure actuelle et a conduit à l'élaboration de la technique d'amplification des Prions par PMCA, qui alterne des cycles de sonication et d'incubation pour reproduire *in vitro* la fragmentation et l'élongation des polymères. En revanche, la nature exacte du mécanisme d'élongation reste peu claire. La proposition initiale de Griffith [94] suppose que des monomères de PrP^c viennent se fixer aux polymères et sont alors convertis en forme pathologique. Basé sur l'observation de la réplication des Prions de levures, Lindquist propose également un autre mode de fixation, dans lequel des petits oligomères de taille bien définie viennent agrandir les agrégats déjà formés [204]. Enfin, le concept d'un intermédiaire conformationnel supplémentaire, la PrP^{*}, en équilibre avec la PrP^c, a été introduit, la PrP^{res} n'étant alors que la forme agrégée.

Ces différents modèles de conversion demeurent hypothétiques. Ils ont fait l'objet de nombreuses investigations théoriques par le biais de modèles mathématiques qui seront détaillés au chapitre 4. Ils ont également fait l'objet d'approches expérimentales complémentaires, portant soit sur l'étude de la molécule elle-même et de sa structure tridimensionnelle (*i.e.* recherche des régions moins stables ou critiques pour la conversion, section 3.2), soit sur la caractérisation des différents complexes protéiques intervenant au cours de la conversion (section 3.3).

3.2 Régions moléculaires impliquées dans la réplication

Les modèles de conversion ne peuvent pas être confirmés en l'absence de données détaillées sur la structure de la PrP^{res}. Des outils divers tels que les simulations théoriques de dynamique moléculaire, le recours aux souris transgéniques ou les différentes protéines recombinantes mutées, ont néanmoins permis l'identification des régions impliquées dans le changement conformationnel et dans le mécanisme de polymérisation des Prions.

3.2.1 Rôle de la région centrale dans le mécanisme de conversion

Très diversifiées, les approches expérimentales s'accordent pour souligner l'implication critique de la région centrale de la PrP dans la réplication de l'agent infectieux. En effet, les

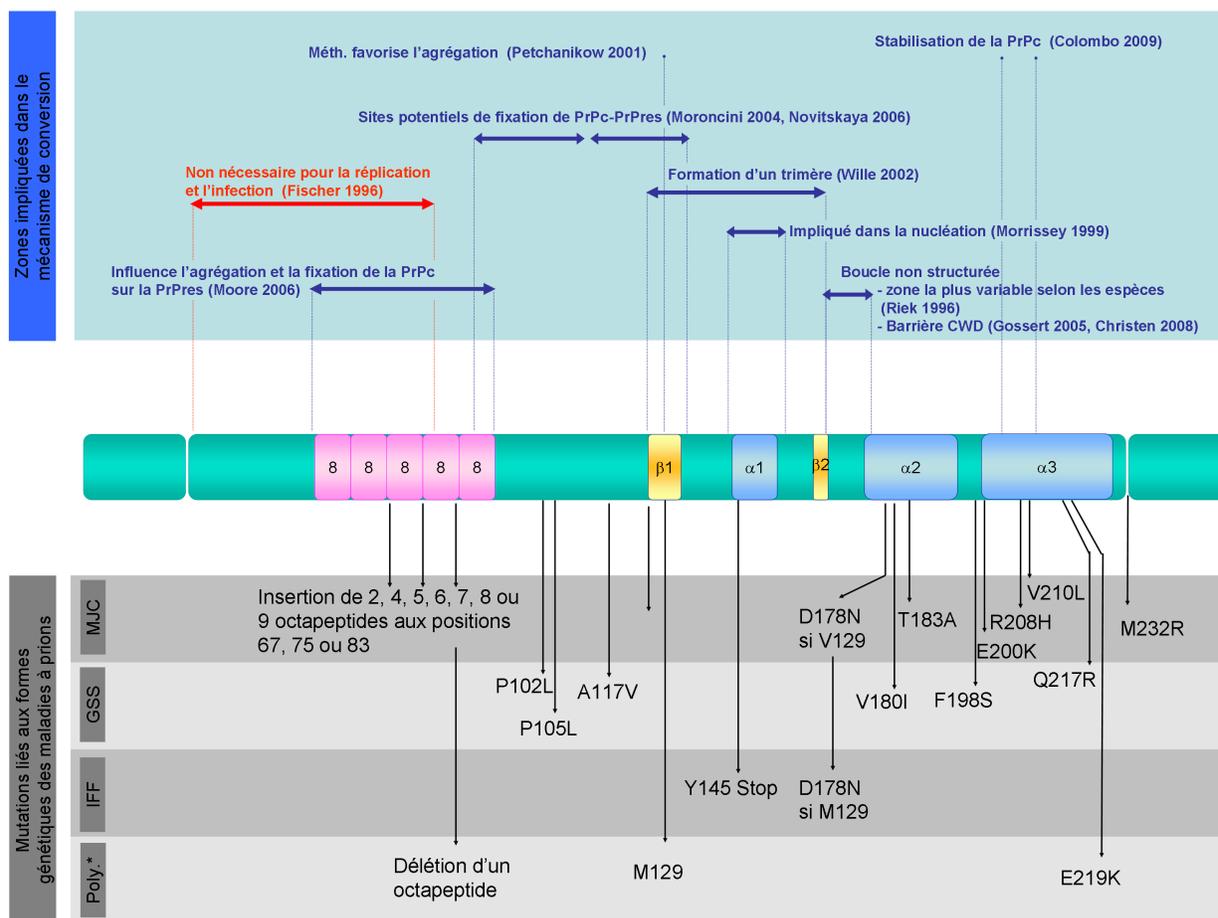


FIG. 2.2 – Principales régions impliquées dans la conversion de la PrP^c en PrP^{res}. La plupart des régions ont été identifiées par dynamique moléculaire. Cette liste est non-exhaustive. Poly* = polymorphisme

mutations à l'origine des formes génétiques des maladies humaines sont essentiellement localisées au niveau des hélices α . De plus, une homologie de séquence importante de la région 108-189 est nécessaire au franchissement de barrière d'espèce. Par ailleurs, des résidus semblent particulièrement importants pour la conversion *in vitro* et le franchissement de barrière d'espèce *in vivo* : les résidus 138 de la souris, 155 du hamster, 171 du mouton et 129 de l'homme. Différents d'une espèce à l'autre, ces résidus suggèrent l'importance de la structure tridimensionnelle de la PrP plus que de la séquence primaire en elle-même [167]. Enfin, un grand nombre d'anticorps dirigés contre cette zone ont montré un effet anti-Prion [205].

Néanmoins, il n'existe pas de corrélation entre les mutations à l'origine des ESST génétiques et la stabilité de la structure de la protéine [206], ce qui suggère une implication dans un autre mécanisme. Des analyses de dynamique moléculaire ont ainsi identifié la région englobant les 2 feuillets β (notés B1 et B2) et la première hélice α (H1) comme étant potentiellement impliquée dans la formation d'un trimère, servant de noyau de nucléation [207, 208]. La conversion serait initiée par l'alignement de B1 et B2. Dans la mesure où H1 constitue la jonction entre ces

deux feuillets, sa conformation et sa stabilité deviendraient critiques pour la conversion (Figure 2.3). Les protéines ainsi conformées seraient alors capables de s'agréger grâce à un alignement parallèle des feuillets β . En effet, l'utilisation de peptides synthétiques courts montre que le polymorphisme Met/Met au codon 129 (contenue dans B1) augmente la capacité de cette région à s'agréger en structures fibrillaires [209]. L'étude des Prions de levures va également dans le sens d'un tel mécanisme : le mélange aléatoire de la séquence en acides aminés des domaines Prion des protéines Ure2p et Sup35p n'empêche pas la formation des amyloïdes, montrant que la complémentarité de composition en acides aminés est plus importante que la séquence elle-même, ce qui est compatible avec un alignement parallèle des feuillets β [210].

D'autres études ont également démontré la forte implication de la boucle située entre le deuxième feuillet β et la deuxième hélice α . L'ajout d'un pont disulfure montre que la région B1-H1-B2 doit être physiquement séparée de la région H2-H3 avant l'oligomérisation, suggérant un changement conformationnel de la boucle B2-H2 [211]. L'hypothèse d'une protéine X capable de se fixer sur B2-H2 pour ouvrir la molécule a également été émise. Enfin, cette boucle est très variable d'une espèce à l'autre [34], et pourrait être à l'origine de la barrière d'espèce du CWD [127].

3.2.2 Rôle des régions N- et C-terminales

La zone N-terminale de la protéine, bien que non structurée, joue également un rôle dans la réplication des Prions. En effet, des expériences sur des souris transgéniques mutées au niveau de la PrP montrent que cette zone module fortement la barrière d'espèces. De même, des expériences de conversion *in vitro* confirment que les résidus 108 à 124 sont indispensables à la formation de la PrP^{res}. *In vivo*, le nombre de répétitions des octapeptides n'intervient pas dans la capacité à répliquer, mais module la cinétique d'accumulation, possiblement en influençant la fixation de la PrP^c sur la PrP^{res} [212]. En revanche, des souris transgéniques délétées en amont (dans la zone 1 à 80 environ) sont capables de répliquer à la fois la PrP^{res} et l'infectiosité. Enfin, des souris transgéniques délétées dans la zone C-terminale, sans peptide signal ni ancre GPI, sont capables d'accumuler de l'infection, mais sans déclarer la maladie [180]. En outre, la substitution de l'ancre GPI par un groupe N-myristoylamidomaleimidiyl (qui augmente l'affinité membranaire de la protéine sans en modifier la structure) empêche la formation de fibrille, suggérant l'influence de l'ancre GPI dans le mécanisme d'agrégation [213].

3.3 Caractérisation des polymères de PrP^{res}

Tous les modèles de conversion impliquent une étape d'agrégation (au moins une étape de dimérisation) et font intervenir des complexes protéiques de compositions différentes. Ainsi, dans le but de mieux caractériser le mécanisme de conversion, l'identification des espèces intervenant dans la conversion, de manière active (recherche de l'espèce convertissante) ou passive (produits de conversion), s'est intensifiée au cours des dernières années.

En plus des fibrilles amyloïdes observées après purification de la PrP^{res}, ou plus récemment, observées *ex vivo* à la surface de cellules infectées [215], plusieurs autres structures protéiques composées de PrP^{res} ont été décrites au cours des maladies à Prions, incluant des oligomères so-

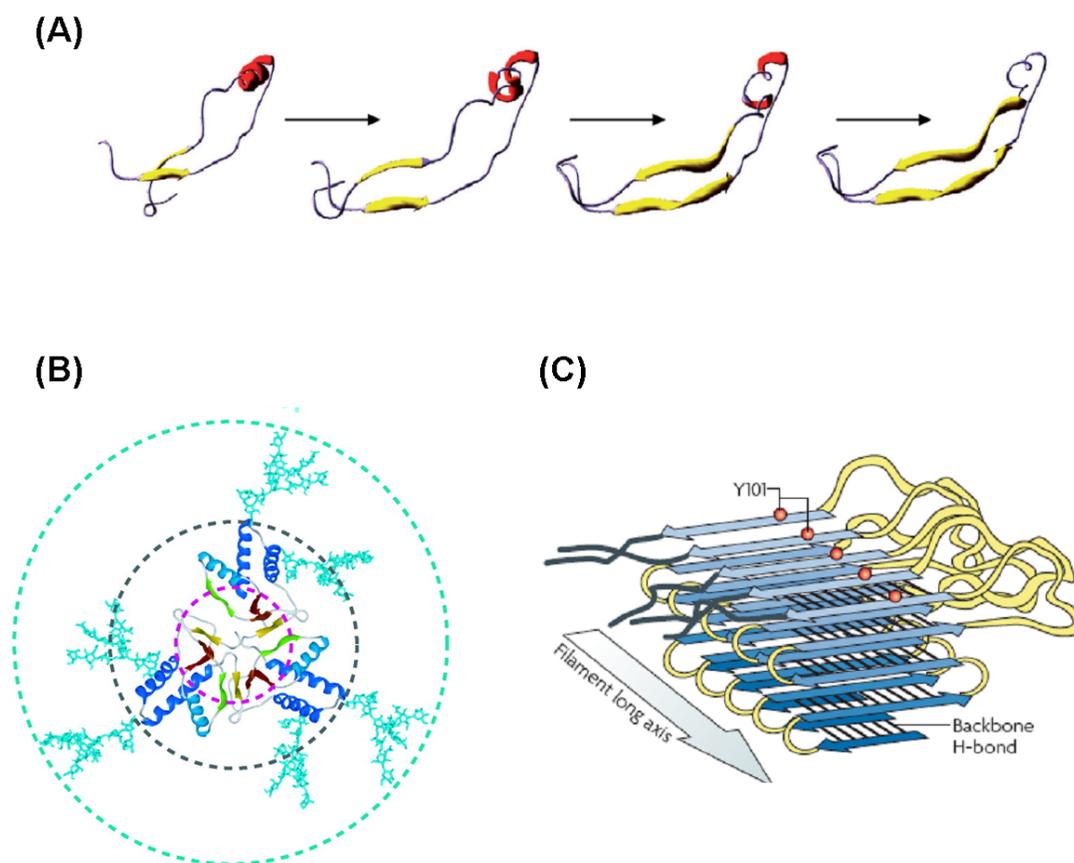


FIG. 2.3 – Bases structurales du mécanisme de conversion de la PrP^C en PrP^{res} (A) Réarrangements intramoléculaire au cours de la conversion : alignement des feuillets β . D'après [211] (B) Structure possible des trimères de PrP^{res} biglycosylés, formant le noyau de nucléation. D'après [214]. (C) Association des molécules de PrP^{res} par un alignement parallèle des feuillets β (Prions de levure Sup35NM, d'après [100].)

lubles, des pores, des structures annulaires, des micelles sphériques et des protofibrilles [216]. Des techniques variées, comme la production d'anticorps reconnaissant spécifiquement une structure donnée, ou le fractionnement fin des particules selon leur taille, ont permis de mieux caractériser les propriétés infectieuses des différents agrégats de PrP^{res}, en particulier, leur capacité à convertir de la PrP^C ou à générer des lésions dans le cerveau. Toutefois, la significativité biologique des intermédiaires polymériques reste à déterminer. En particulier, il reste à savoir s'ils existent en quantité significative dans le cerveau *in vivo*. Malheureusement, les études biophysiques des intermédiaires produits au cours de la formation des amyloïdes indiquent que les différentes espèces sont présentes simultanément et sont en équilibre dynamique les unes avec les autres [217], complexifiant encore plus l'étude de la contribution relative de chacune des espèces. De plus, la purification des polymères de Prions de levures suggère que ceux-ci sont étroitement associés à d'autres partenaires moléculaires, qui peuvent participer aux propriétés des différents agrégats [218].

3.3.1 Recherche de la particule convertissante

Silveira et al se sont basés sur une méthode consistant à séparer les agrégats de PrP^{res} selon leur taille par "Field-flow fractionation" afin de caractériser l'espèce infectieuse. Ils ont ainsi trouvé que pour la souche de hamster 263K, les particules les plus infectieuses *in vivo* ou les plus convertissantes *in vitro* (par unité de protéine) correspondent à des particules non fibrillaires d'environ 17 à 27 nm de diamètre et de masse moléculaire de 300 à 600 kDa, correspondant à des polymères composés de 14 à 28 monomères de PrP. Les particules inférieures à 5 PrP ne montrent aucune activité convertissante, les agrégats de taille supérieure à 28 monomères semblent moins infectieux (relativement à leur contenu en PrP) [219]. Toutefois, l'association des polymères à des molécules de détergent peut conduire à une surestimation de la taille des particules en termes d'unités de PrP^{res} [220]. De même, la significativité biologique des intermédiaires, obtenus après purification et sonication, reste à déterminer.

Dans la même optique, des homogénats de cerveaux de souris infectés par différentes souches de Prions ont été fractionnés par sédimentation, et les différentes fractions ont été inoculées à la souris. Dans le cas de souches rapides, telles que la Tremblante, l'infectiosité semble être associée aux fractions solubles (oligomères de petites tailles). Au contraire, dans le cas de souches plus lentes, l'infectiosité serait associée à des particules de tailles intermédiaires [221].

3.3.2 Recherche de l'espèce neurotoxique

La nature des espèces responsables de la mort neuronale reste ambiguë. Il a longtemps été supposé que les dépôts amyloïdes étaient responsables des lésions du SNC. Néanmoins, cette hypothèse a été mise en doute par différents résultats expérimentaux obtenus pour d'autres amyloïdoses neurodégénératives. Par exemple, l'analyse neuropathologique des cerveaux de patients morts de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson montre que les neurones qui contiennent les fibrilles amyloïdes semblent plus sains (selon des critères morphologiques et biochimiques) que les neurones voisins. De plus, la présence de plaques amyloïdes n'est pas nécessairement corrélée à une mort neuronale importante. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que les oligomères solubles sont les espèces toxiques [222]. Pour les Prions, l'inoculation d'oligomères solubles *in vitro* à des neurones primaires en cultures ou *in vivo* à des souris montre un pouvoir toxique plus important que l'injection de formes fibrillaires, non toxiques *in vitro* et faiblement toxiques *in vivo* [181].

Certains auteurs suggèrent que la formation des fibrilles est un mécanisme de protection, ayant pour but de séquestrer les espèces toxiques [223]. Il est également possible qu'ils constituent un réservoir de particules solubles. Enfin, il est proposé que les mécanismes de neurotoxicité diffèrent selon l'espèce polymérique : les oligomères solubles pourraient induire la transduction d'un signal d'apoptose, alors que les plaques amyloïdes pourraient remplir l'espace intercellulaire, dégradant ainsi les prolongements neuronaux [222].

3.4 Partenaires moléculaires impliqués dans la réplication

Des techniques aussi variées que le criblage en double hybride, la recherche de co-localisations *in vivo* ou *in vitro*, le dichroïsme circulaire ou encore les approches de dynamique moléculaire

Ligand	Rôle possible
Héparanes sulfates	Composants des structures amyloïdes. En compétition avec la fixation du cuivre.
Gangliosides	Complexe PrP ^c -GM3 impliqué dans l'activation des lymphocytes T et dans des fonctions membranaires
Lectin CBP70	Participation à la conversion de la PrP ^c en PrP ^{res}
Acides nucléiques	Participation à la conversion de la PrP ^c en PrP ^{res} ?
Lipides membranaires	Participation à la conversion de la PrP ^c en PrP ^{res} ou stabilisation de la PrP ^c (selon la nature du lipide)
Cuivre	Transport du cuivre. Fonction SOD.
Apolipoprotein E	Formation des amyloïdes ?
Récepteur à la laminin 37kDa/67kDa	Récepteur de la PrP
Laminin	Plasticité neuronale
66kDa protéine	Récepteur de la PrP avant sont internalisation, transduction de signal
Bcl2	Inhibition de la protection contre l'apoptose
Plasminogen	
N-CAM	
Tubuline	
Synapsin Ib	Transduction de signal ?
Grb2	Transduction de signal ?
Pint1	
Fyn	Transduction de signal via un récepteur de la PrP
P	Rôle similaire à la PrP ?
Calcineurin B	Phosphatase Ser/Thr
STH1	Transduction de signal, neuritogénèse, neuroprotection
Vibronectin	Croissance axonale
Caveolin-1	Transduction de signal
Rdj2	Chaperonne
TREK-1 2P domain	Modulation de la réponse cellulaire électrophysiologique
Hsp70	Repliement des protéines transloquées. Pas d'effet sur la conversion de la PrP
Hsp60	Protéine "X" ?
Hsp73	Lié à l'accumulation de la PrP ^{res}
Hsp104	Inhibition de l'activité ATPase de Hsp104. Participation à la conversion de la PrP ^c en PrP ^{res}
GroEL	Participation à la conversion de la PrP ^c en PrP ^{res}

TAB. 2.1 – Ligands de la PrP. D'après [211]

ont mis en évidence un grand nombre de ligands de la PrP, potentiellement impliqués dans la conversion ou dans le transport de la PrP^{res}. Plusieurs ligands, de nature protéique ou non, semblent intervenir dans le mécanisme de conversion de la PrP^c en PrP^{res}. Toutefois, en raison de la protéine utilisée (avec ou sans ancre GPI, avec ou sans région N-terminale...) et de la technique utilisée, il est difficile de conclure définitivement sur la spécificité des interactions trouvées et sur leur rôle dans le mécanisme de transconformation et de propagation des Prions.

Lipides membranaire : en cas d'association avec les lipides négativement chargés, la PrP de hamster adopte une structure enrichie en feuillet β , qui déstabilise les membranes. Au contraire, en cas d'association avec les rafts, la PrP reste dans sa conformation native, sans altération de l'intégrité membranaire [170]. De la PrP recombinante enrichie en feuillet β associée aux rafts tend même à se déplier, suggérant que les rafts sont peu propices à la tranconformation [224].

Acides nucléiques : plusieurs équipes ont démontré que certains acides nucléiques sont capables de se fixer avec une grande affinité sur une région de la PrP recombinante murine soumise à l'enrichissement pathogène en feuillet β . Cette affinité est séquence-dépendante et capable d'inhiber la conversion en cas de ratio ADN :PrP élevé ou de la favoriser dans le cas contraire [225]. De même, Deleault a récemment montré que des séquences d'ARN font partie des composants minimaux capables de promouvoir *in vitro* la tranconformation de la PrP^c en PrP^{res} [226]. La conversion de la PrP via la fixation à une macromolécule d'acides nucléiques pourrait se faire grâce aux interactions hydrophobes dans le complexe, qui déstabiliserait la PrP.

Ions métalliques : la PrP interagit avec les ions métalliques, et plus particulièrement les ions Cu²⁺ et les ions zinc Zn²⁺. A pH 7.4, ces ions sont capables d'induire la polymérisation de la PrP recombinante. En revanche, à faible pH, aucun effet n'est constaté. Des résultats controversés sont obtenus sur les sites de fixations impliqués. La PrP recombinante délétée en N-terminale (*i.e.* sans les octapeptides de fixation du cuivre) ne s'agrège pas en présence d'ions cuivre, contrairement à la protéine complète. Inversement, des simulations de dynamiques moléculaires ont récemment suggéré que la fixation des ions cuivres sur les sites en C-terminal peuvent initier la conversion de la PrP en sa forme pathogènes [227, 228]

Héparane sulfate protéoglycanes : support de l'adhésion et de la prolifération cellulaire, les HSPG peuvent se lier à la PrP et jouent un rôle prépondérant dans l'endocytose de la PrP et dans son métabolisme. Des glycosaminoglycanes semblent également augmenter la capacité à s'aggréger de la région N-terminale de la protéine recombinante [229]. Des héparanes mimétiques sont capables d'inhiber l'accumulation de la PrP^{res} de façon durable et rapide [230]. Cet effet aurait lieu via une liaison de l'héparane avec la PrP^c et une inhibition de la conversion, et non par modification de la synthèse de la PrP^c ou une augmentation de la dégradation la PrP^{res}.

Protéines chaperonnes : les protéines chaperonnes semblent indispensables à la propagation des Prions de levures. La protéine Hsp104 est supposé favoriser la fragmentation des amyloïdes de levures, multipliant ainsi le nombre de particules infectieuses. Les protéines cytoplasmiques Hsp70 (Ssa1, Ssa2, Ssa3, Ssa4, Ssb1, Ssb2) capables de se fixer sur les segments hydrophobes des protéines et de participer à leur repliement, semblent être impliquées directement dans la conversion. En effet, des mutants de Ssa1 perdent le phénotype [PSI+], des mutants de Ssa2 perdent le phénotype [URE3], et il semblerait que des formes Ssa particulières (Ssa ADP) se fixent sur les extrémités des fibrilles de Sup35p et empêchent leur élongation.

Concernant le rôle des protéines chaperonnes dans la réplication des Prions de mammifères, la protéine Hsp60 a été proposée comme Protéine X potentielle (*i.e.* comme protéine nécessaire au rapprochement de la PrP^{res} et de la PrP^c au moment de la conversion). De même, les

chaperonnes GroEL et Hsp104 favorisent la conversion *in vitro* des Prions de mammifères, contrairement à des chaperonnes chimiques (sucrose, trehalose et DMSO) qui l'inhibent. Hsp70 ne semble pas intervenir dans la réplication [231].

Récepteur à la laminine : Plusieurs études ont rapporté une interaction directe entre le récepteur à la laminine (et ses précurseurs, LRP/LR) et la PrP^{res} en culture cellulaire. LRP/LR semble capable de fixer les Prions exogènes et interviendrait ainsi dans les étapes initiales de l'infection cellulaire. Le LRP/LR est également capable de fixer la PrP^c sur une zone connue pour fixer la PrP^{res}, ce qui suggère que la dissociation de la PrP^c et du LRP/LR est un préalable à la conversion. Le LRP/LR pourrait également être un médiateur, rapprochant les deux réactifs de conversion [232].

Ligands impliqués dans le transport de la PrP : d'autres protéines semblent impliquées dans la réplication des Prions via le transport de la PrP^{res}. L'association de la PrP^{res} avec la ferritine conduit à l'endocytose et la transcytose des agents infectieux par des cellules épithéliales de l'intestin en culture [233]. Les composants du complément pourraient également jouer un rôle en favorisant le transport de la PrP résistante vers les cellules lymphoïdes [234]. Le plasminogène, trouvé dans le sang et dans le milieu intercellulaire, fixe spécifiquement la PrP^{res}, mais pas la PrP^c, et pourrait ainsi participer à la propagation de l'infection dans l'organisme [235].

Chapitre 3

Modèles théoriques autour des maladies à Prions

L'émergence de l'hypothèse purement protéique du Prion est étroitement liée à la modélisation mathématique. En effet, dès 1967, le mathématicien J.S. Griffith tente de réconcilier l'absence apparente d'acide nucléique des Prions [93, 236] avec leur caractère infectieux. Il propose trois mécanismes distincts pouvant expliquer l'auto-réplication d'une protéine. En particulier, son second mécanisme suppose que l'agent infectieux pourrait être un oligomère protéique, thermodynamiquement plus stable que les monomères, et capable d'induire la polymérisation des monomères [94]. La proposition de Griffith est encore très convaincante à l'heure actuelle, mais elle demeure hypothétique et le mécanisme exact de conversion de la protéine du Prion en sa forme pathologique reste mal caractérisé. Malheureusement, la nature très agrégée et insoluble de la PrP^{res} [237] limite le nombre de techniques expérimentales disponibles pour étudier les mécanismes *in vivo* de réplication des Prions. De même, à l'échelle d'une population d'individus, l'absence d'outil diagnostic associée à des temps d'incubation très longs rend difficile l'identification des facteurs de risques et des modes de transmission, et par conséquent, le contrôle de l'épidémie.

Quelle que soit l'échelle d'étude des maladies à Prions, les outils expérimentaux présentent des limites, qui peuvent en partie être contournées grâce au développement d'approches théoriques. L'objectif de ce chapitre est de faire le bilan des outils expérimentaux, de leurs limites et des approches théoriques pour étudier les maladies à Prions.

1 Echelle d'une population d'individus

1.1 Outils expérimentaux

Les données épidémiologiques sur la transmission des ESST humaines résultent d'un suivi systématique des cas mondiaux. Deux études collaboratives (le projet EUROCCJD, démarré en 1993, et le projet NEUROCCJD, débuté en 1998) ont été financées par l'Union Européenne pour recenser les cas de MCJ en Europe et dans les pays partenaires, et ainsi identifier les facteurs de risques spécifiques à chaque pays. Après identification des cas, la recherche des modes de transmission s'appuie sur des études "cas-contrôle" rétrospectives, c'est-à-dire une comparaison

entre les habitudes alimentaires, géographiques,... des individus infectés et d'un groupe contrôle de patients sains. Toutefois, le faible nombre de cas, couplé à des temps d'incubation très long, rend nécessaire le recours à la modélisation afin de tester précisément la significativité et la robustesse des causes inférées [238].

Les données concernant les ESST animales sont plus nombreuses grâce aux campagnes de surveillances systématiques instaurées dans de nombreux pays, mais elles restent incomplètes. Par exemple, en 2002, les pays membre de l'Union Européenne ont adopté une stratégie de surveillance active des ESST chez les petits ruminants, afin de mieux estimer la prévalence de la Tremblante, mais également de rechercher l'existence éventuelle d'animaux infectés par l'agent ESB bovin. Ce dépistage ne s'applique pas à la totalité des animaux dirigés vers l'abattoir, mais à un quota variable selon les pays. L'inférence de la prévalence complète passe alors par l'établissement d'un modèle épidémiologique, prenant notamment en compte les porteurs asymptomatiques non détectés par les tests de dépistage [239].

Enfin, des troupeaux expérimentaux ont été mis en place pour étudier les modes de transmission naturelle. Ces troupeaux pallient le manque de données dues à la faible incidence des maladies à Prions, et sont plus proches des conditions naturelles de transmission que l'exposition en laboratoire. Néanmoins, la diversité des troupeaux réels (en terme de génotype notamment) peut affecter l'efficacité des mesures de précautions prises sur la bases des résultats expérimentaux uniquement.

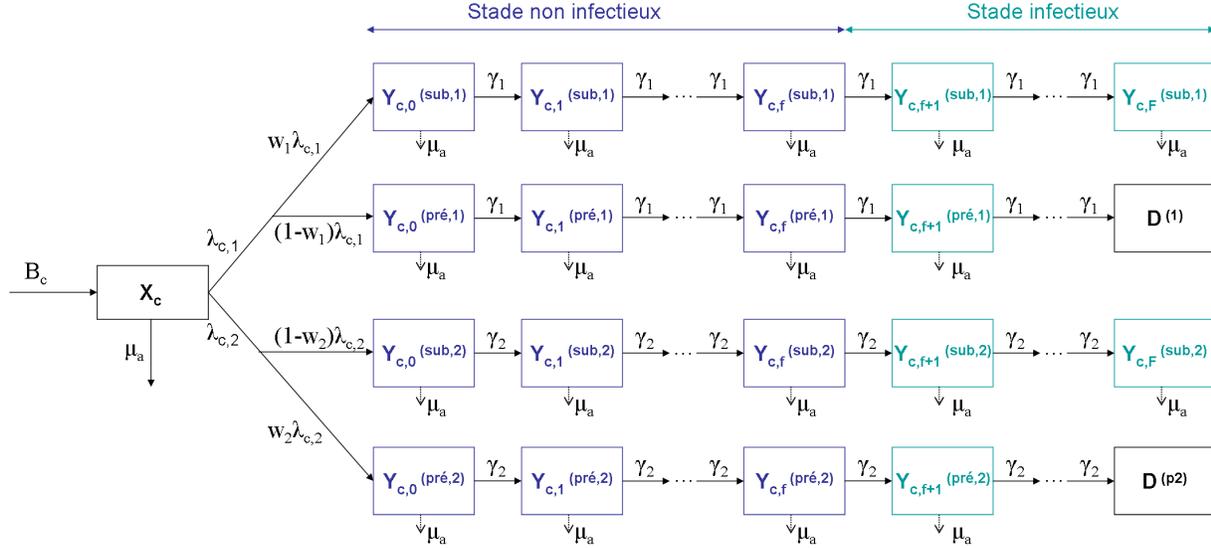
1.2 Modèles théoriques

Les modèles épidémiologiques développés autour des maladies à Prions ont pour rôle principal de permettre l'évaluation de paramètres non observables, à travers trois situations différentes : (i) la prévision des niveaux de prévalence des ESST à venir, (ii) l'estimation de paramètres inaccessibles expérimentalement, comme notamment la durée du temps d'incubation chez l'homme, et enfin (iii) l'estimation des effets liés à des expositions à faibles doses, inaccessible en pratique par les enquêtes épidémiologiques (risques de transmissions secondaires inter-humaines, par transfusion sanguine notamment). C'est ainsi qu'une équipe de modélisateurs anglais a permis d'estimer la taille de l'épidémie d'ESB au Royaume-Uni, en terme de cas cachés (bovins abattus en phase d'incubation), d'anticiper la baisse de l'épidémie et de simuler différentes interventions propres à accélérer cette baisse [240]. L'écart entre les prédictions mathématiques et le nombre réel de cas d'ESB en Angleterre, qui ne décroissait pas aussi vite qu'attendu, a alors permis de mettre en évidence le manques d'efficacité des mesures de précaution prises pour enrayer l'épidémie [241].

1.2.1 Estimation de la prévalence du vMCJ lié à une contamination par voie alimentaire

Tous les modèles de prédiction de l'épidémie de vMCJ font appel au rétro-calcul. La méthode de rétro-calcul est fondée sur le fait que le nombre de cas d'une maladie infectieuse à un instant donné dépend de trois fonctions : le nombre de personnes infectées au cours du temps, la distribution des dates d'infection, la distribution du délai entre l'infection et la maladie (ou durée d'incubation). La relation entre ces fonctions peut être décrite par une équation mathématique simple :

(A)



(B)

Paramètres	Description
X_c	Nbre d'individus susceptibles dans la cohorte c
$Y_{c,i}^{sub,1}$	Nbre de primo-infecté subclinique dans la cohorte c , au stade i
$Y_{c,i}^{pré,1}$	Nbre de primo-infecté préclinique dans la cohorte c , au stade i
$Y_{c,i}^{sub,2}$	Nbre de secondoinfecté subclinique dans la cohorte c , au stade i
$Y_{c,i}^{pré,2}$	Nbre de secondoinfecté préclinique dans la cohorte c , au stade i
F	Nbre total de stades de la maladie
f	Nbre de stades non infectieux de la maladie
B_c	Taux de naissance de la cohorte c
μ_a	Taux de mortalité à l'âge a
$\lambda_{c,1}$	Taux de primo-infections
w_1	Proportion de primo-infections subcliniques
$\lambda_{c,2}$	Taux d'infections secondaires
w_2	Proportion d'infections secondaires subcliniques
γ_i	Taux de progression de la maladie

(C)

$$\frac{d}{dt} X_c(t) = B_c \delta(a) - X_c(t) [\lambda_{c,1}(t) + \lambda_{c,2}(t) + \mu_a],$$

$$\frac{d}{dt} Y_{c,0}^{(sub,i)}(t) = \omega_i \lambda_{c,i}(t) X_c(t) - (\gamma_i + \mu_a) Y_{c,0}^{(sub,i)}(t),$$

$$\frac{d}{dt} Y_{c,0}^{(pré,i)}(t) = (1 - \omega_i) \lambda_{c,i}(t) X_c(t) - (\gamma_i + \mu_a) Y_{c,0}^{(pré,i)}(t),$$

$$\frac{d}{dt} Y_{c,f}^{(sub,i)}(t) = \gamma_i Y_{c,f-1}^{(sub,i)} - (\gamma_i + \mu_a) Y_{c,f}^{(sub,i)},$$

$$\frac{d}{dt} Y_{c,f}^{(pré,i)}(t) = \gamma_i Y_{c,f-1}^{(pré,i)} - (\gamma_i + \mu_a) Y_{c,f}^{(pré,i)},$$

$$\frac{d}{dt} Y_{c,F}^{(sub,i)}(t) = \gamma_i Y_{c,F-1}^{(sub,i)} - \mu_a Y_{c,F}^{(sub,i)},$$

FIG. 3.1 – Modèle âge-cohorte général pour l'étude des transmissions secondaires du vCJD. (A) Diagramme des flux de populations, (B) Notations, (C) Equations correspondantes. Le paramètre $\lambda_{c,2}$ varie en fonction du risque étudié (transmission par transfusion sanguine ou par actes chirurgicaux).

$$I(t) = \int_{s=0}^t h(s)f(t-s)ds$$

avec $I(t)$ le nombre d'individus infectés déclarés à l'instant t , $h(t)$ l'incidence de l'infection à l'instant t et f la distribution de la durée d'incubation. La difficulté d'étude de ce modèle réside dans le fait que toutes ces fonctions sont inconnues. Les modèles se distinguent par les hypothèses et les techniques utilisées pour les définir. En ce qui concerne la durée d'incubation f , les premiers modèles, limités par le nombre de cas déclarés au moment de l'étude, ont fait appel à des scénarios fixant aléatoirement sa valeur moyenne et sa variabilité [242, 243]. Les études ultérieures ont au contraire cherché à les estimer à partir des cas déclarés de vMCJ [244–246]. Concernant la distribution des dates d'infection h , elle est supposée proportionnelle à l'incidence d'ESB, corrigée par un facteur représentant les mesures de risques prise à partir de 1989, et intègre la possibilité d'une détection incomplète des cas d'ESB dans les années 1980.

Les différents modèles épidémiologiques développés pour estimer la taille de l'épidémie de vMCJ (voir tableau 3.1) s'accordent tous sur une épidémie de petites tailles (de 300 à 1500 cas environ) pour une durée moyenne d'incubation estimée à environ 15 ans [246]. Ces modèles reposent sur l'hypothèse d'une distribution du temps d'incubation unimodale, c'est-à-dire que les temps d'incubation sont les mêmes pour toutes les catégories de populations, indépendamment de l'âge ou du génotype. Toutefois, une susceptibilité accrue chez les jeunes semble expliquer l'âge moyen jeune des patients de vMJC mieux qu'un temps d'incubation dépendant de l'âge [247] ou d'une exposition différente seule [248]. En revanche, un modèle plus récent, évaluant le risque d'avoir une durée d'incubation plus longue chez les individus non homozygotes méthionine au codon 129, montre qu'une seconde vague ne peut survenir que pour des temps d'incubation moyen supérieur à 25 ans, et que dans ce cas, le nombre de cas non-homozygotes méthionine ne devrait pas dépasser 250 [249].

1.2.2 Estimation des risques de contamination secondaire

Alors que le nombre de patients vMCJ continue à décroître, conformément aux prédictions des modèles, les modèles épidémiologiques actuels s'orientent vers l'évaluation des risques de transmission secondaire d'homme à homme, pouvant survenir via la transfusion sanguine ou l'utilisation d'instruments chirurgicaux à usages multiples [252–255]. Ces modèles se basent sur une population structurée en âge (modèle âge-cohorte) [252, 253]. Pour chaque cohorte d'âge, la population est séparée en 3 catégories : les individus sains susceptibles, les primo-infectés par voie alimentaire et les secondoinfectés. Certains modèles intègrent également la présence de porteurs infectieux, mais ne développant jamais la maladie (phase sub-clinique) [253]. Le cadre général d'un tel modèle est représenté figure 3.1 page 55.

De grandes incertitudes demeurent quant aux paramètres de passage d'une catégorie à une autre. Toutefois, les modèles permettent d'effectuer une analyse de sensibilité de ces paramètres afin d'identifier les intervalles de paramètres compatibles avec une persistance de l'épidémie. Quel que soit le mode de transmission (transfusion ou actes chirurgicaux), la persistance de l'épidémie semble tout à fait vraisemblable [252, 253]. La grande majorité des scénarios testés suggèrent néanmoins un nombre de transmissions secondaires inférieur à 1000 d'ici l'année 2021 (actes chirurgicaux) ou 2080 (transfusion sanguine).

Auteur	Année	Cas ¹	Estimations	Hypothèses sur l'exposition	Hypothèses sur l'incubation	Réf.
Cousens	1997	14	75-80 000 (107-1595)*	Exposition à l'ESB proportionnelle au nombre de cas jusqu'en 1989. Réduction entre 90 et 100% à partir de 1990. Prise en compte d'une sous-estimation avant des cas avant 1989.	Approche scénario	[242]
Ghani	2000	53	63-136 000	Exposition à l'ESB proportionnelle au nombre de cas jusqu'en 1989, corrigée par les mesures de précaution	Approche scénario	[243]
Huillard d'Aignaux	2001	82	250-3000	Exposition à l'ESB proportionnelle au nombre de cas jusqu'en 1989, corrigée par les mesures de précaution	Estimation des paramètres sur la base des cas existants	[245]
Valleron	2001	97	205	Exposition à l'ESB proportionnelle au nombre de cas jusqu'en 1989, corrigée par les mesures de précaution (pas de nouvelle infection après 1989)	Estimation sur la base des cas existants - durée moyenne de 16.7 ans.	[244]
Ferguson	2002	97	50-150 000	Exposition à l'ESB proportionnel aux cas bovins et ovins (mise en place d'un modèle d'infection ovine)	Approche scénario	[250]
Boëlle	2003	113	183-304	Exposition à l'ESB proportionnelle au nombre de cas jusqu'en 1989, corrigée par les mesures de précaution (pas de nouvelle infection après 1989)	Estimation sur la base des cas existants	[251]
Valleron	2006	-	250	Exposition à l'ESB proportionnelle au nombre de cas jusqu'en 1989, corrigée par les mesures de précaution (pas de nouvelle infection après 1989)	Distribution bimodale (seconde vague en fonction du génotype)- Approche scénario	[249]

TAB. 3.1 – Principaux modèles épidémiologiques pour estimer l'incidence du vMCJ, en fonction des hypothèses choisies sur les temps d'incubation ou l'incidence de l'infection. *Estimations correspondant à une durée d'incubation de 15 ans.¹Nombre de cas de vMCJ sur lesquels s'appuie l'étude épidémiologique.

2 Echelle cellulaire et individuelle

2.1 Outils expérimentaux

2.1.1 Lignées cellulaires

Les premiers modèles cellulaires remontent au début des années 1970, avec le développement de la lignée SMB dérivée d'un cerveau murin [261]. Depuis, d'autres lignées cellulaires capables de répliquer les Prions ont été décrites, bien qu'en nombre limité et principalement susceptibles aux Prions de Tremblante adaptés à la souris [197]. Elles sont pour la plupart décrites dans le tableau 3.2 page 58. Les cellules identifiées comme susceptibles sont principalement des lignées d'origine neuronale, cancéreuses ou transformées *in vitro* (SMB, N2a, PC12, HaB, ...), ou encore issues de souris transgéniques (MovS, GT1, ...). Ces cellules sont établies en lignées cellulaires, cependant, d'autres cellules répliquent également les Prions, comme certains explants primaires de neurones issus de souris transgéniques exprimant la PrP ovine ou les cellules souches neuronales [197]. Des systèmes d'origine non neuronale ont également été établis, incluant des fibrobalstes (MDB [262], NIH/3T3 et L929 [263]), des cellules musculaires (C2C12 [264]), des cellules migrogiales (MG20 [265]) ou des cellules épithéliales (RK13 [266]).

Les modèles cellulaires établis sont principalement permissifs aux Prions de Tremblante

Nom	Origine tissulaire	Espèce	Souche	Commentaire
Cellules infectées par des souches adaptées aux rongeurs				
C-1300	Neuroblastome	Souris	Chandler	
NIE-115	Neuroblastome	Souris	Chandler, Fu-1, RML	
N2a	Neuroblastome	Souris	Chandler, 139A, 22L	
N2a#58	Neuroblastome	Souris	SY-CJD, FU-CJD, Chandler, 22L, Fu-1	Surexpr. de PrP ^c
N2aPK1	Neuroblastome	Souris	Hypersuscept. RML et 22L	Cell Panel Assay [123]
N2aR33	Neuroblastome	Souris	RML, hypersuscept. 22L	Cell Panel Assay [123]
LD9 (L929)	Fibroblastes	Souris	Hypersuscept. RML, 22L, Me7	Cell Panel Assay [123]
CAD5	Lignée neuronale	Souris	Hypersuscept. RML, 22L, Me7, 301C	Cell Panel Assay [123]
GT1-7	Cell. hypothalamiques	Souris	139A, Chandler, 22L, Fu-1	Immortalisées Antigène T
PC12	Phéochromocytome	Rat	139A	
SMB	Cell. du cerveau	Souris	139A, 22F, 79A, Chandler	
SN56	Cell. neur. du septum	Souris	Chandler, ME7, 22L	
NSC	Neuronal Stem Cell	Souris	RML, 22L	Souris transg. ou convent.
MSC80	Cell. Schwann-like	Souris	Chandler	
HpL3-4	Cell. hippocamp.	Souris	22L	Souris KO transduites PrP ^c
L929, 3T3	Fibroblastes	Souris	22L, ME7, RML	
MG20	Microglie	Souris	Chandler, ME7, BSE adaptée	
C2C12	Myoblastes	Souris	22L	
moRK13	Epithéliale RK13	Lapin	Fu-1, 22L, Chandler, M100, sCJD adapté	Expr. de PrP ^c murine [256]
voRK13	Epithéliale RK13	Lapin	BSE adaptée	Expr. de PrP ^c campagnole
HaB	Cell. du cerveau	Hamster	Prions de hamsters	
tSP-SC	Cell. stromales (rate)	Souris	vCJD adapté, Fu-1	Tumeur spontanée [257]
CRBL	Cell. cervelet	Souris	Prions de SMB	Souris p53-/- [258]
MSC	Moelle osseuse	Souris	Fu-1, BSE adaptée	Explant <i>ex vivo</i> [259]
1C11	Neuroectoderme	Souris	Chandler, 22L, Fu-1	Différent. en 2 types de neur. [260]
Cellules infectées par des souches naturelles				
ovRK13 (Rov)	Epithéliale RK13	Lapin	Tremblante naturelle	Expr. de PrP ^c de mouton
MovS (DRG)	Cell. Schwann-like	tgOv	Tremblante naturelle	De souris tgOv
CGN ^{Ov}	Cult. primaire de neur.	tgOv	Tremblante naturelle	De souris tgOv
MDB	Fibroblastes	Cerf	CWD	

TAB. 3.2 – Modèles cellulaires infectés par des Prions naturels ou adaptés aux rongeurs. Adapté de Vilette [197]

adaptés à la souris. Les souches de Tremblante adaptées au hamster sont également étudiées sur les cellules HaB [267]. Toutefois, d'autres souches sont maintenant répliquées, comme le CWD par les cellules MDB [262] et l'ESB adaptée à la souris par la lignée MG20 [265]. Les cellules RK13, issues du lapin mais n'exprimant ni l'ARNm, ni la PrP endogène à des niveaux détectables, sont susceptibles à de nombreuses souches lorsqu'elles sont transduites avec des vecteurs codant pour la PrP de souris, de campagnol ou de mouton [268, 269]. Enfin, malgré de nombreuses tentatives, aucune lignée cellulaire ne réplique les souches humaines, bien que quelques lignées murines soient susceptibles aux souches humaines adaptées à la souris : la

lignée GT1-7 réplique une souche de GSS [270], les RK13 répliquent une souche de MCJ [268], ou encore des cellules stromales de la rate répliquent le vMCJ adapté à la souris [257].

Les cultures cellulaires permettent d'aborder certaines questions fondamentales concernant les ESST, de façon plus éthique, plus rapide et moins coûteuse que les modèles animaux. Plusieurs thématiques peuvent être analysées plus spécifiquement, comme la fonction ou le trafic intracellulaire de la PrP (rôle de l'ancre GPI, site de transconformation, etc ...) [197], le criblage haut débit de molécules thérapeutiques [271], ou encore les mécanismes de dissémination de l'infection, de susceptibilité cellulaire et de neurotoxicité [158]. Enfin, les cultures cellulaires interviennent dans la compréhension des propriétés de souches, comme le tropisme cellulaire avec des souches capables de se répliquer uniquement dans certaines lignées (en particulier, la souche ME7 capable de se répliquer dans les N2a ou les GT1, mais pas dans les SN56, les L929 ou encore les MG20 [197]). Toutefois, les modèles cellulaires restent encore limités pour étudier les mécanismes de réplication à l'échelle d'une cellule. En effet, malgré une grande hétérogénéité des cultures de cellules vis-à-vis de l'infection [198], les données expérimentales sont souvent moyennées sur une population de cellules (détection de la présence de PrP^{res} par Western Blot, ...). Ainsi, il est d'une part très difficile de fixer expérimentalement un paramètre relatif à une seule cellule pour étudier son impact sur la population globale. D'autre part, la cascade d'événements cellulaires ayant abouti à un état donné dans une population est difficilement accessible.

2.1.2 Modèles animaux

Les modèles rongeurs conventionnels Souris et Hamster sont les plus utilisés, en raison des conditions d'élevage et des temps d'incubation plus courts que chez les autres animaux. Ils sont utilisés depuis les années 60 et ont notamment permis d'isoler différentes souches de Prions. Plus récemment, des souches humaines ont été répliquées chez le campagnol aussi efficacement que chez les souris humanisées. Cet animal pourrait constituer un modèle de référence [129]. Le nombre limité de souches capable de se répliquer sur les modèles rongeurs a été compensé par le développement de nombreux modèles transgéniques. Trois types de souris transgéniques servent à étudier les maladies à Prions : des souris KO pour le gène codant pour la PrP (qui ont mis en évidence la caractéristique indispensable de l'expression de la PrP pour le développement d'une infection à Prions) [95], des souris portant des transgènes mutants du gène *Prnp* (pour étudier les formes familiales des ESST [272] ou pour étudier les différentes régions de la PrP essentielles à la réplication [273]) et des souris surexprimant une PrP hétérologue (permettant l'étude de différentes souches et le franchissement de barrière d'espèces) [273]. Les autres modèles animaux sont constitués par les ovins, les bovins, des cervidés et des primates. Ils permettent d'étudier l'impact du polymorphisme génétique sur la réplication des Prions, les risques de contamination verticale ou horizontale, et les risques de transmission à l'homme, dans des conditions plus proches que celles imposées par les modèles rongeurs.

Les modèles animaux restent les modèles de référence pour étudier la pathogénèse des maladies à Prions, la réplication dans les différents organes, les partenaires cellulaires impliqués, le caractère infectieux d'un échantillon ou encore le mécanisme de barrière d'espèce. Toutefois, les temps d'incubation importants et la lourdeur expérimentale ne permettent pas de criblage à

haut ou moyen débit de l'infectiosité d'un échantillon. De plus, la réplication des Prions *in vivo* s'effectue dans un milieu très hétérogène où il est difficile d'extraire l'information pertinente et la dynamique d'évènements conduisant à la mort de l'individu.

2.2 Modèles théoriques

Il n'existe pas de modèle théorique sur les maladies à Prions à l'échelle d'un individu. De même, les modèles à l'échelle d'une cellule ou d'une population de cellules sont rares [274–276]. Ils permettent d'affiner les modèles protéiques de réplication en introduisant des mécanismes cellulaires spécifiques (trafic cellulaire de la PrP, compartiments de réplication, etc...).

Dans cette optique, le modèle proposé par Payne [275] décrit la dynamique de la transformation de la PrP^c à l'intérieur de la cellule. Il tient compte de trois processus : l'association/dissociation des protéines sur les récepteurs membranaires correspondants, la conversion catalytique (jusqu'à un certain seuil) de la PrP^c en PrP^{res} à l'intérieur de la cellule, et le métabolisme de la PrP (production de la PrP^c et dégradation de la PrP^c et de la PrP^{res}). Ce modèle identifie le trafic cellulaire de la PrP comme un facteur important déterminant le temps d'incubation. En effet, dans un premier temps, les quantités de PrP^c à l'intérieur de la cellule et exprimées à la membrane sont à l'équilibre, et la quantité de PrP^{res} est faible (début de l'infection). La transformation de la forme cellulaire en son isoforme pathologique est donc proportionnelle à la quantité de PrP^{res}, qui augmente exponentiellement. Une fois la limite d'autocatalyse atteinte, l'augmentation de la PrP^{res} devient linéaire. Pendant cette phase, la quantité de PrP^c interne et la quantité de PrP^c ancrée dans la membrane sont en équilibre. L'augmentation de la quantité de PrP^{res} conduit à la saturation des récepteurs membranaires. La quantité de PrP^c interne augmente, ce qui accélère la production de PrP^{res}, d'où une accumulation importante et rapide de la protéine pathogène (Figure 3.2).

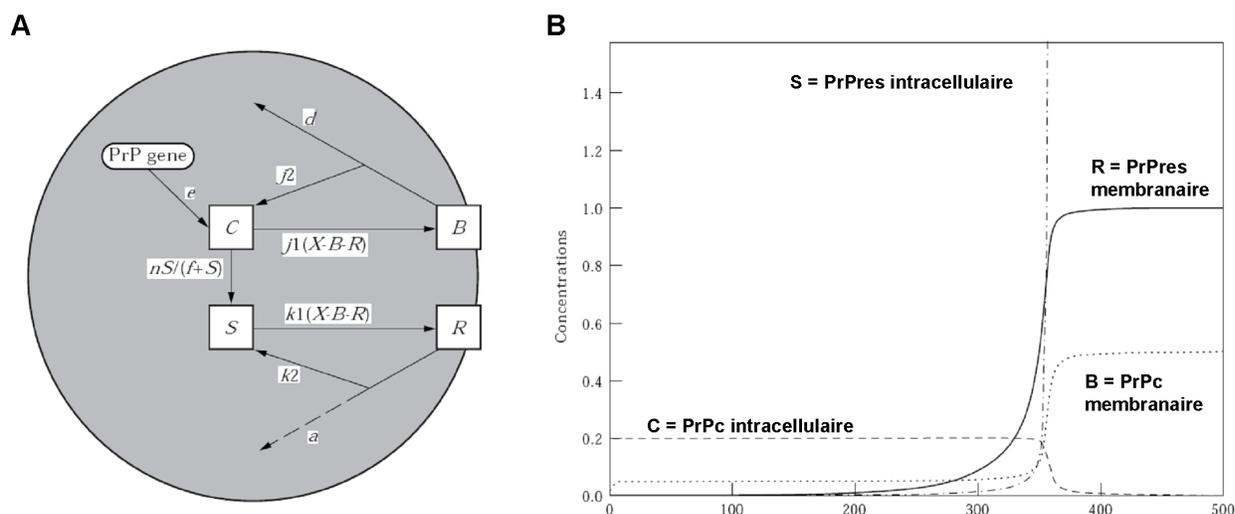


FIG. 3.2 – **Modèle de trafic cellulaire de Payne.**(A) Schéma des mécanismes pris en compte et notations. (B) Evolution des différentes espèces en fonction du temps. D'après [275].

Par ailleurs, quelques modèles mathématiques intègrent la diffusion spatiale des Prions. Ils sont basés sur deux formalismes distincts. Le premier est l'utilisation d'équations aux dérivées partielles. Un terme de diffusion sur un domaine à une dimension est ajouté aux équations des modèles de réplication, permettant l'étude d'un front de propagation et une interprétation de la compétition de souches en terme de compétition de ressources [274, 277]. Les Prions étant des protéines. Cette approche de diffusion est une version très simplifiée de la réalité, justifiée par l'absence de données expérimentales. Néanmoins, ce formalisme semble plus adapté à des compartiments particulier du système nerveux central qu'à des zones très inhomogènes, comme une culture cellulaire ou un cerveau. Le deuxième formalisme, suggéré par Matthäus, est le recours aux modèles de type multi-agents, par automates cellulaires hybrides couplant les équations cinétiques précédentes à des modèles cellulaires [276] ou par la théorie des graphes [274]. Ces approches ont été étudiées sur des modèles épidémiologiques de type Susceptible-Infecté-Remis [274].

3 Echelle protéique

3.1 Outils expérimentaux

3.1.1 Méthodes biophysiques d'étude des protéines

Environ une vingtaine de méthodes physiques ont été développées pour étudier la structure et l'agrégation des protéines, elles sont détaillées dans le tableau 3.3 page 65. Ces méthodes sont non spécifiques des maladies à Prions, mais sont couramment utilisées pour l'étude d'autres amyloïdoses, liées à l'agrégation de protéines mal conformées. Très variées, elles peuvent être classées selon leur apport majeur dans la caractérisation des mécanismes d'agrégation : (i) détection des protéines agrégées/mal conformées, (ii) recherche des conditions stabilisant la protéine et (iii) caractérisation des espèces protéiques produites au cours de l'agrégation.

Dans le cas du Prion, ces méthodes ont permis d'étudier en partie la structure de la PrP^{res}. En effet, des techniques de dichroïsme circulaire, de spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier ou encore la résonance magnétique nucléaire, ont notamment permis de mesurer l'enrichissement en feuillet β de la PrP^{res} [73]. Concernant la structure quaternaire, la microscopie à force atomique a mis en évidence des différences de structure des fibrilles amyloïdes en fonction des souches de Prions (fibrilles en hélices ou linéaires) [75]. Makarava et al ont généré ces deux types d'amyloïdes en incubant *in vitro* de la PrP^c de hamster recombinante dans des conditions amyloïdogènes, en faisant uniquement varier la nature de l'agitation. Lorsque la réaction de polymérisation est induite par un fibrille déjà formé, la structure du fibrille néosynthétisé reste identique au modèle, quelque soit la nature de l'agitation [105].

Toutefois, la nature très agrégée et insoluble de la PrP^{res} *in vivo* est incompatible avec les méthodes de caractérisation de la structure tertiaire de la PrP pathogène. Les amyloïdes générés *in vitro* à partir de protéines recombinantes présentent des caractéristiques communes avec ceux générés *in vivo*, et constituent une alternative expérimentale riche. Mais leur pouvoir infectieux faible ou inexistant [97] et les conditions de production éloignées d'un environnement physiologique rendent difficile l'inférence des mécanismes *in vivo* à partir des données *in vitro*.

Par ailleurs, les techniques visant à caractériser les intermédiaires protéiques formés au cours de la polymérisation, ont permis d'étudier la taille des particules les plus infectieuses, en fonction de différentes souches [219,221], mais la séparation des agrégats selon leur taille s'effectue après extraction dans des détergents, qui peuvent modifier l'état d'agrégation *in vivo* ou induire une erreur d'estimation de la taille par diffraction de lumière. Dans le cas de la souche 263K par exemple, la taille des particules infectieuses estimée à 14-28 unités semble surestimée à cause de l'association des polymères de Prions à des détergents [220].

3.1.2 Techniques de conversion *in vitro*

Le "Cell-Free Conversion assay" (CFC) [99] est la première technique de conversion *in vitro* acellulaire. Il consiste à incuber de la PrP^{res} avec de la PrP^c radiomarquée, permettant de quantifier la production *de novo* de PrP^{res}. Le CFC a permis de nombreuses études sur le mécanisme de souches et de transmission inter-espèces : des facteurs comme l'importance de la séquence en acides aminés ou la glycosylation ont été identifiés par des cette technique [278]. Toutefois, la quantité de PrP^{res} initiale requise pour amorcer la conversion est trop importante pour tester les propriétés de la PrP^{res} néosynthétisée, en particulier son caractère infectieux.

Plus récemment, la technique PMCA (pour "Protein Misfolding Cyclic Amplification") a été développée. Le protocole repose sur un mélange d'homogénat de cerveau sain et d'une faible dose d'infectiosité, qui subit des séries de sonication et d'incubation en présence de détergents. La sonication est supposée fragmenter les gros agrégats formés durant les phase d'incubation, multipliant ainsi le nombre de particules infectieuses disponibles au cycle suivant (Figure 3.3). Les étapes de sonication conduisent à la néosynthèse de particules de PrP^{res} de taille plus petite que celles synthétisées *in vivo*, conduisant à un pouvoir infectieux apparent plus faible (vraisemblablement à cause d'une dégradation plus rapide des petits agrégats). Toutefois, la stabilisation de la PrP^{res} par des particules de nitrocellulose montre que la PrP^{res} synthétisée par PMCA est aussi infectieuse que la PrP^{res} issue d'un homogénat de cerveau.

A l'heure actuelle, la PMCA est capable d'amplifier des Prions de nombreuses souches (Tremblante adaptée au hamster 263K, Tremblante adaptée à la souris ou encore CWD [279]), à partir d'échantillons infectieux d'origines très diversifiées (homogénat de cerveau, sang [280], urine [136]). Elle permet la détection de la PrP^{res} dans le sang de hamster asymptomatique [281]. De plus, les Prions générés par PMCA conservent les caractéristiques de la souche initiale (même durée d'incubation chez l'animal, même profil lésionnel et biochimique) [282]. Ainsi, la PMCA présente de nombreuses application utiles, comme la détection de PrP^{res} dans des tissus où l'infectiosité est faible, la synthèse d'infectiosité *de novo*, ou encore la recherche de nouveaux inhibiteurs ou de cofacteurs essentiels à la conversion de la PrP [283].

Toutefois, les protocoles sont très sensibles aux conditions expérimentales, et tout particulièrement à la préparation de la matrice de PrP^c. La technique QUIC (pour QUaking-Induced Conversion) utilisant une matrice de PrP^c recombinante, permet de s'affranchir de cette limite, mais ne génère pas d'infectiosité [284]. De plus, les concentrations de PrP^c requises sont très éloignées d'un contexte physiologique.

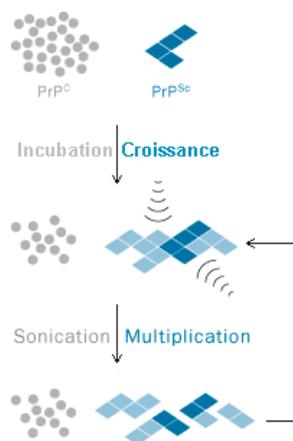


FIG. 3.3 – Principe de la PMCA

3.2 Modèles théoriques

En raison des difficultés expérimentales dues à l'insolubilité des amyloïdes, les modèles théoriques sont souvent la seule source d'information sur les mécanismes de réarrangements moléculaires survenant au cours de la réplication des Prions [285]. Ainsi, la modélisation à l'échelle de la protéine vient en complément des outils expérimentaux pour :

(1) **caractériser les réarrangements intramoléculaires de la PrP** : vers quoi tendent-ils ? (structure de la PrP^{res}), par quoi sont-ils déclenchés ? (recherche de facteurs environnementaux ou de partenaires moléculaires capables de déstabiliser la PrP^{res}). Ces modèles s'appuient une représentation atomique de la PrP et testent la compatibilité des modèles avec les données structurales expérimentales connues.

(2) **caractériser les réarrangements intermoléculaires de la PrP** : quelle est la nature du complexe protéique capable d'induire le changement autocatalytique de conformation ? par quel mécanisme ? Ces modèles s'appuient une représentation protéique de la PrP et testent la compatibilité des modèles avec les données cinétiques d'accumulation de la PrP^{res}.

3.2.1 Modélisation atomique de la PrP^{res}

Des approches de dynamique moléculaire (DM) ont été menées pour appréhender les changements topologiques impliqués lors de la conversion de la PrP^C en PrP^{res}. Ces études sont basées sur différents niveaux de représentation de la protéine. Des modèles de grille représentant une protéine idéale très simplifiée ont pour but de déterminer les effets de l'association entre différentes protéines sur leur structure tridimensionnelle [285–287]. Au contraire, des simulations plus réalistes au niveau atomique sont trop coûteuses en temps de calculs pour modéliser les réarrangements nécessaires à la formation des fibrilles amyloïdes, mais permettent d'étudier les propriétés locales de la protéine, à savoir la stabilité [288] et la flexibilité [289] de la PrP^C, et l'existence potentielle d'intermédiaires conformationnels.

Ces approches ont principalement permis de proposer deux modèles de la structure des trimères de PrP^{res} nécessaires à la formation des fibrilles (Chapitre 1 Section 2.2.1 page 27).

Elles ont en outre identifié différents facteurs capables de déstabiliser la structure de la PrP^c et donc de favoriser la transconformation :

PrP^{res} : les résultats qui s’approchent le plus d’un mécanisme de conversion autocatalytique ont été obtenus par Malolepza, avec la démonstration *in silico* qu’une PrP riche en feuillet β est capable de transmettre sa conformation anormale à une molécule native [290].

Modifications pré- et post-traductionnelles : Les travaux de Kazmirski et al sur la stabilité de la PrP humaine (résidus 109 à 122) suggèrent qu’une mutation de la PrP^c au codon 117 (substitution d’une alanine par une valine) expose un coeur hydrophobe, ce qui favoriserait sa conversion [291]; ceux de Zuegg et Gready sur l’étude de la structure N-terminale de la PrP^c montrent que les oligosaccharides fixés en N-terminal stabilisent la PrP^c, contrairement à l’ancre GPI qui n’influence pas la structure de la PrP [292].

pH : un pH faible semble capable de déstabiliser la forme α de la PrP vers une structure enrichie en feuillets β dans la zone N-terminale. Ces structures exposent des régions très hydrophobes, et sont donc capable de s’agréger entre elles pour former des protofibrilles amyloïdes [214, 293].

Lipides : des simulations de DM sur de la PrP humaine biglycosylée ancrée à des lipides membranaires POPC via son ancre GPI montrent que la PrP^c est stabilisée dans ces régions [294].

3.2.2 Modélisation protéique de la PrP^{res}

Plusieurs modèles ont été proposé pour décrire le processus de réplication de la PrP^{res} [200, 203, 295–302]. Dans ces modèles, La PrP est présente sous deux conformations : la PrP^c et la PrP^{res} (indépendamment de la structure interne des protéines). La transition PrP^c \rightarrow PrP^{res} est induite par un mécanisme de polymérisation à partir d’un complexe protéique dont la nature varie en fonction des modèles (monomère de PrP^{res}, complexe PrP^c-PrP^{res}, polymères de PrP^{res}). Ces modèles sont principalement des modèles 1-D (polymérisation de fibrilles amyloïdes non branchés) ou 2-D (croissance d’agrégats planaires).

Les modèles 1-D se basent sur une croissance unidirectionnelle des structures fibrillaires, observées notamment chez les Prions de levures [303], et plus récemment, à la surface des cultures cellulaires infectées [215]. La propagation fibrillaire des Prions selon un mécanisme de polymérisation nucléée, est la plus modélisée [299, 301, 304, 305]. Ces modèles font essentiellement appel à des systèmes d’équations différentielles ordinaires [299] ou partielles [305]. Ils permettent de reproduire la relation logarithmique entre la dose inoculée et la durée d’incubation [305].

Les modèles d’agrégation bi-dimensionnels sont des modèles par automates cellulaires, où chaque case correspond à une protéine PrP^c ou PrP^{res}; ils représentent la croissance des agrégats de PrP^{res} à la surface des cellules [297, 300, 302]. Ils reproduisent également de façon très fidèle les caractéristiques connues du temps d’incubation (corrélation logarithmique entre la durée d’incubation et la dose inoculée, avec une déviation en cas de faibles doses) [297].

Ces modèles de réplication sont présentés en détail au chapitre suivant (Chapitre 4, page 66).

Méthode	Principe	Rôle	Limitations
Microscopie électronique	Un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon mince. Les interactions entre les électrons et l'échantillon permettent d'établir une image de ce dernier.	Visualisation de la morphologie des agrégats	Méthode ex-situ, indirecte, nécessitant un traitement préalable de l'échantillon important. Uniformité de l'échantillon nécessaire. Possibilité de modification morphologique des agrégats par le faisceau électronique.
Microscopie à Force Atomique (AFM)	Les variations de hauteur dues aux forces d'interactions entre l'échantillon et le cantilever (pointe reliée à un microlevier) permettent de topographier l'échantillon.	Visualisation in-situ de la morphologie des agrégats.	Uniformité de l'échantillon nécessaire. Technique surfacique uniquement. Pas d'information sur la composition des agrégats.
Dichroïsme circulaire	Mesure de l'absorbance de la lumière selon le sens de polarisation.	Données sur la structure secondaire de la protéine (suivi cinétique possible)	Difficile à mettre en oeuvre (tampons particuliers, technique inaccessible dans l'aire, ...)
RMN	Résonance magnétique nucléaire. En présence d'un champ magnétique, les noyaux atomiques absorbent les rayonnements magnétiques d'une fréquence spécifique (fonction du spin nucléaire)	Suivi de la quantité de fibrilles. Suivi des changements de conformation.	Concentrations importantes requises, pouvant induire une perturbation de la fibrillation.
Résonance paramagnétique électronique	Principe analogue à la RMN, avec une excitation des spins des électrons.	Données sur la structure secondaire de la protéine (suivi cinétique possible)	Des concentrations non physiologiques d'échantillon sont requises pour détecter un signal
FTIR	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier. Analyse des fonctions chimiques présentes dans un matériau, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons après absorption d'un rayonnement infra-rouge.	Données sur la structure secondaire de la protéine (détection des feuillets β et de leur configuration)	Limité aux fibrilles amyloïdes
Absorbance	Mesure de la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse.	Suivi de la cinétique d'agrégation	Pas de distinction entre les fibrilles intermédiaires de différentes formes/taille
Spectroscopie de fluorescence	Des fluorophores intrinsèques ou extrinsèques (principalement Congo Rouge ou Thioflavine T) mesurent les changements de conformation/agrégation des protéines. Inclue en particulier le FRET et la microscopie à fluorescence.	Suivi de la cinétique d'agrégation	Pas de différenciation des différentes espèces
Oscillateur à quartz de cristal	Microbalance capable de détecter les changements de masse des fibrilles lors de la croissance de noyaux existants.	Suivi de la cinétique d'agrégation. Cinétique de croissance d'un fibrille.	Ne permet pas le suivi de polymérisation sans noyau de nucléation préexistants.
Turbidité	Détection des particules dont le rayon est supérieure à une longueur d'onde donnée.	Suivi de la cinétique d'agrégation. Détermination possible de la taille des particules dans un échantillon homogène.	Pas de détection des petits oligomères. Pas d'information de taille en cas d'échantillon inhomogène.
Viscosité	Plus une solution possède de gros agrégats, plus elle résiste à la déformation.	Mesure du degré d'agrégation des protéines en solution.	Pas de distinction des différentes espèces en solution.
Diffraction de lumière	La diffraction de la lumière dépend de la vitesse à laquelle se déplacent les particules en solution, ce qui donne une mesure indirecte de leur taille.	Caractérisation de la taille des polymères (suivi cinétique possible)	Echantillon uniforme nécessaire (en taille d'agrégats).
Spectrométrie de masse	Séparation en phase gazeuse des molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge	Caractérisation des intermédiaires polymériques	Conditions particulières d'utilisation (Tampon, etc...) incompatibles avec certaines protéines.
Sédimentation	Séparation des polymères selon leur densité.	Fractionnement des polymères selon leur taille (identification des intermédiaires et des produits)	Pas de séparation des oligomères solubles et des monomères, ni des fibrilles et des oligomères intermédiaires insolubles.
Chromatographie à exclusion de taille	Fractionnement des particules selon leur volume hydrodynamique via un gel réticulé.	Séparation des polymères selon leur taille.	Effets parasites d'adsorption sur les parois des pores, gênant pour la quantification des différentes fractions.

TAB. 3.3 – Principales méthodes physiques pour l'étude du processus d'agrégation des protéines. Une classification de ces méthodes présentant leurs avantages/inconvénients sur les critères (i) méthode directe/indirecte, (ii) in situ/ex situ et (iii) suivi cinétique/non cinétique, est disponible dans (Morris 2009). Une revue récente sur ces méthodes est également disponible dans (Bondos 2006)

Chapitre 4

Modélisation du mécanisme de réplication

Les approches théoriques épidémiologiques et biophysiques (*i.e.* dynamique moléculaire) présentées au chapitre précédent sont couramment utilisées par les biologistes. Au contraire, les approches mathématiques visant à modéliser les mécanismes de réplication à l'échelle protéique et cellulaire restent souvent ignorées, bien qu'elles soient, de part l'échelle considérée, les plus aptes à capturer les résultats expérimentaux les plus courants concernant l'étude des mécanismes de réplication. Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de présenter en détail les modèles théoriques de réplication des Prions et leur interprétation biologique.

Les mécanismes de réplication des Prions font tous intervenir une étape de polymérisation des différentes formes de PrP, allant de la simple dimérisation PrP^c-PrP^{res} à la formation de fibrilles amyloïdes. Par conséquent, les modèles mathématiques de réplication des Prions s'inscrivent dans le cadre très développé des modèles d'agrégation de protéines, étudiés depuis plus de 50 ans [216, 306, 307]. Toutefois, les données expérimentales concernant la réplication *in vivo* des Prions consistent principalement en des propriétés biologiques (temps d'incubation, pouvoir toxique et infectieux des agrégats de PrP, cinétique qualitative de l'accumulation de PrP^{res}), et les cinétiques d'agrégation quantitatives sont rares. Dans ce contexte, le but des modèles de réplication des Prions n'est pas seulement d'estimer les paramètres cinétiques des modèles d'agrégation, mais aussi d'explorer grâce aux modèles et à leur analyse mathématique et numérique l'ensemble des comportements dynamiques découlant d'une hypothèse biologique particulière.

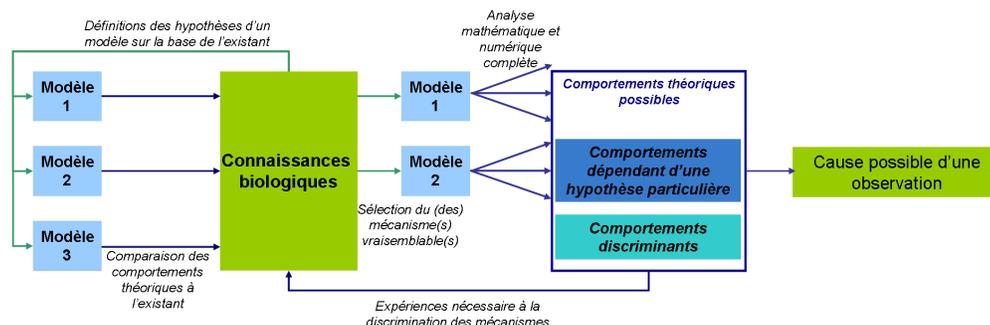


FIG. 4.1 – Démarche de modélisation de la réplication des Prions.

1 Des modèles pour mimer la connaissance biologique

Depuis la proposition de Griffith en 1967, divers mécanismes de réplication des Prions ont été proposés (voir Figures 4.2 et 4.3). Leur modélisation a permis de formaliser la connaissance biologique, mais également d'analyser en détail les différents mécanismes pouvant être impliqués. Cette section retrace l'évolution des modèles proposés, en fonction des données biologiques ayant servi à leur construction.

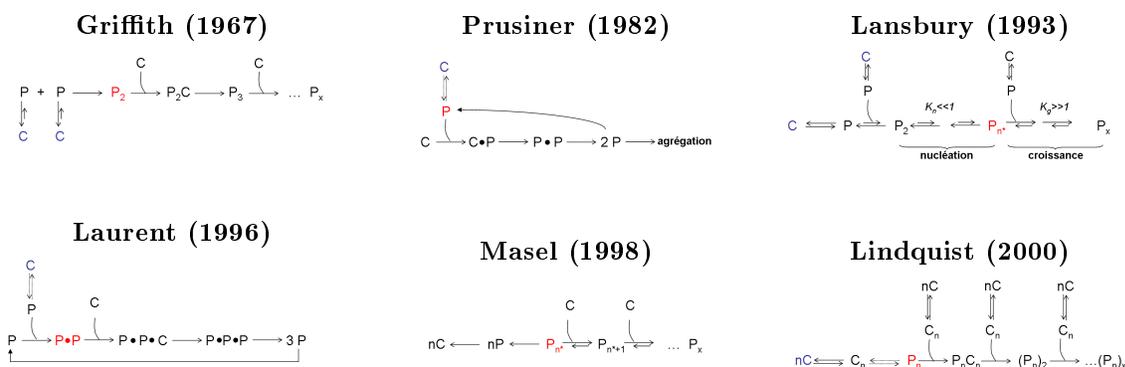


FIG. 4.2 – Différents schémas d'agrégation proposés pour expliquer la réplication des Prions. Les notations C et P désignent respectivement la PrP^C et la PrP^{res} . Les espèces requises pour une origine sporadique de la maladie sont représentées en bleue, celles pour une origine infectieuse en rouge. Certains schémas sont adaptés de [216].

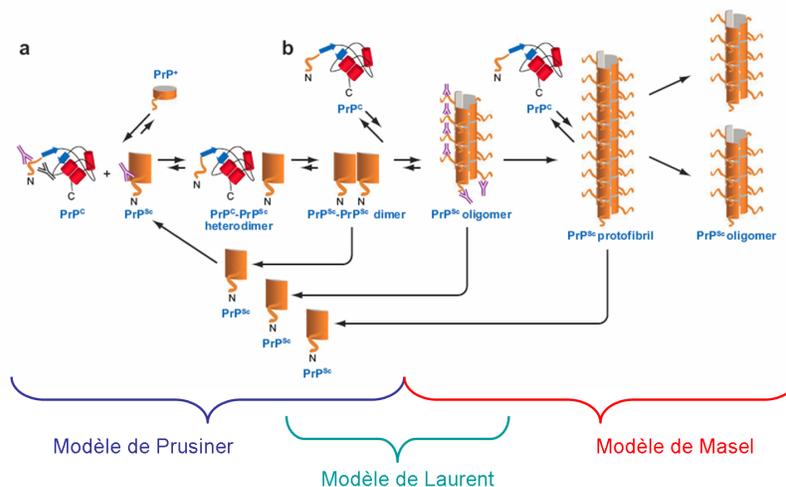


FIG. 4.3 – Différents modèles d'un même mécanisme. La figure d'origine, adaptée de [33], représente les mécanismes de conversion de la PrP^C en PrP^{res} . (a) mécanisme de conversion assistée (b) mécanisme de polymérisation nucléée. La représentation choisie, en terme de taille de particules infectieuses et non en terme énergétique, illustre bien le zoom des modèles mathématiques sur une partie d'un même mécanisme.

1.1 Un phénomène autocatalytique : le modèle de l'hétérodimère

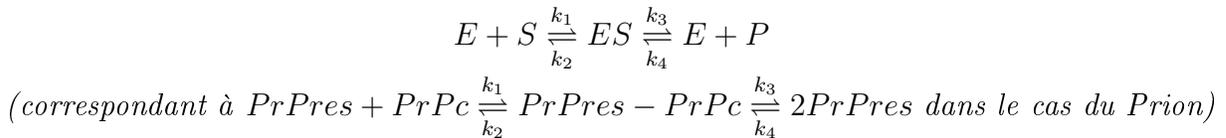
La découverte de la PrP et l'accumulation de preuves expérimentales en faveur d'un processus autocatalytique conduisent Prusiner à énoncer le modèle de conversion assistée (ou de l'hétérodimère) $PrP^c + PrP^{res} \rightarrow PrP^c \bullet PrP^{res} \rightarrow 2PrP^{res}$ pour expliquer la réplication des Prions. Ce mécanisme suppose que la particule infectieuse est un monomère de PrP^{res} , capable d'induire la conversion de la PrP^c en PrP^{res} via la formation d'un hétérodimère. En termes mathématiques, cela correspond au modèle suivant, introduit par Galdino et al [308, 309] :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[PrP^c]}{dt} = -k [PrP^c] [PrP^{res}] \\ \frac{d[PrP^{res}]}{dt} = k [PrP^c] [PrP^{res}] \end{array} \right.$$

où k représente le taux de conversion efficace de la PrP^c en PrP^{res} .

Ce modèle permet d'étudier la dynamique d'évolution de la PrP^{res} dans un contexte infectieux. Une solution analytique existe [308], elle est représentée Figure 4.6, page 73 . Or les maladies à Prions peuvent aussi être sporadiques, vraisemblablement à cause d'une conversion spontanée (et très rare) de la PrP^c en PrP^{res} . Pour prendre en compte cette idée, Eigen propose une variante plus complète du modèle précédent, incluant cette étape de conversion spontanée ainsi que le métabolisme de la PrP [200].

Il se place dans le cadre de la théorie de Mickaëlis-Menten, qui décrit la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme E , agissant sur un substrat S pour donner un produit P :



Sous les hypothèses : (1) Pas de réaction inverse, *i.e.* $k_4 = 0$, (2) Pré-équilibre rapide, *i.e.* la conversion du produit est très rapide devant la fixation de du substrat à l'enzyme, (3) La dissociation de l'enzyme et du produit est très rapide, la variation de la concentration en produit est donnée par :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_T [S]}{K_M [S]} [E]_T$$

avec

$[E]_T$ la concentration totale en enzyme (libre ou liée au substrat),

$K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ est la concentration de substrat qui sature l'enzyme à moitié

$k_T = k_3$ représente le nombre de cycles catalytiques par seconde (nombre de rotations) dont est capable l'enzyme.

Dans le cas de la réplication des Prions, la PrP^c est le substrat et la PrP^{res} est à la fois le catalyseur et le produit de réaction. Les équations de Eigen sont les suivantes :

$$\begin{cases} \frac{d[PrP_c]}{dt} = \lambda - (\gamma + k_{VP}) [PrP_c] - \frac{k_T [PrP_c]}{K_M + [PrP_c]} [PrP_{res}] \\ \frac{d[PrP_{res}]}{dt} = -(\mu + k_{PV}) [PrP_{res}] + k_{VP} [PrP_c] + \frac{k_T [PrP_c]}{K_M + [PrP_c]} [PrP_{res}] \end{cases}$$

où les termes λ , $\gamma [PrP_c]$ et $\mu [PrP_{res}]$ correspondent au métabolisme de la PrP (respectivement production de PrP^c , dégradation de PrP^c et dégradation de PrP^{res}). Les termes $k_{VP} [PrP_c]$ et $k_{PV} [PrP_{res}]$ correspondent à la conversion spontanée de la PrP^c en PrP^{res} et celle de la PrP^{res} en PrP^c . Enfin, $\frac{k_T [PrP_c]}{K_M + [PrP_c]} [PrP_{res}]$ modélise la conversion catalysée par le monomère de PrP^{res} .

Grâce à une analyse semi-quantitative des états d'équilibre de ce système, Eigen souligne que pour rendre compte des cinétiques d'infection et des durées d'incubation observées, le rapport des processus de conversion spontanée et de changement de conformation assisté par la PrP^{res} déjà présente (k_T/K_M , appelé rapport d'accroissement) devait être très supérieur à 10^{15} . Ce rapport dépasse de plusieurs ordres de grandeur ceux des réactions enzymatiques connues les plus efficaces. A titre d'exemple, le rapport d'accroissement associé à la chymotrypsine (enzyme digestive catalysant la protéolyse) est de 10^7 , celui de l'uréase (qui catalyse la transformation de l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac) est de 10^{14} [310].

Ainsi, l'hypothèse d'une conversion catalysée par la forme pathogène monomérique semble peu vraisemblable [200].

1.2 Conversion via de petits oligomères : le modèle de Laurent

Laurent propose un mécanisme alternatif d'autocatalyse coopérative. Il suppose que la particule infectieuse est un complexe mixte de PrP^c et de PrP^{res} [201,311]. Dans un premier temps, il propose une formulation phénoménologique du mécanisme, basée sur la théorie des enzymes coopératives (où l'association de plusieurs molécules modifie l'activité de l'enzyme) :

$$\begin{cases} \frac{d[PrP^c]}{dt} = \lambda - \gamma [PrP^c] - \frac{k_{VP}(1 + b [PrP^{res}]^r)}{1 + a [PrP^{res}]^r} [PrP^c], \\ \frac{d[PrP^{res}]}{dt} = -\mu [PrP^{res}] + \frac{k_{VP}(1 + b [PrP^{res}]^r)}{1 + a [PrP^{res}]^r} [PrP^c] \end{cases} \quad (4.1)$$

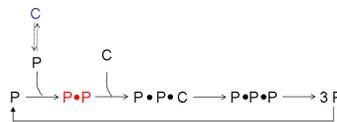


FIG. 4.4 – Mécanisme de Laurent. Cas particulier où l'espèce convertissante est un dimère de PrP^{res}

où λ représente la production de PrP^c , γ et μ les coefficients de dégradation respectifs de la PrP^c et de la PrP^{res} et k_{VP} le coefficient de conversion spontanée de la PrP^c en PrP^{res} . Les coefficients a , b et r se rapportent à la conversion par autocatalyse coopérative.

La force principale de ce modèle réside dans sa capacité à capturer, en un seul modèle, les formes infectieuses et sporadiques des maladies à Prions. En effet, l'analyse des états d'équilibre du système (par une méthode des isoclines nulles [312]) montre la co-occurrence possible de deux états d'équilibre stables : un état caractérisé par une faible quantité de PrP^{res} (correspondant à l'état sain), et un caractérisé par une forte quantité de PrP^{res} (correspondant à l'état pathologique). Le système peut passer de l'état sain à l'état infecté, par le biais d'un changement des paramètres cinétiques (expliquant les formes sporadiques) ou par inoculation d'une quantité donnée de PrP^{res} (expliquant les formes infectieuses) [201]. Des résultats similaires ont été obtenus par Kacser et Small dans le cas où la conversion passe par un intermédiaire partiellement replié, pouvant se conformer soit en PrP^c , soit en PrP^{res} [313].

En revanche, sa formulation phénoménologique ne permet pas d'étudier en détail la composition exacte du complexe actif pour la conversion du Prion. Pour pallier cela, Laurent et Keller-shohn proposent alors un modèle plus descriptif, faisant explicitement intervenir les dimères de PrP^{res} comme particules infectieuses (Table 4.2). Ce modèle retient toutes les caractéristiques du modèle général [314,315]. Il ne prend cependant pas en compte l'agrégation des molécules de PrP^{res} , conduisant à la formation des fibrilles amyloïdes.

1.3 Implication du mécanisme de polymérisation : le modèle de Masel

En 1993, Lansbury propose le mécanisme de polymérisation nucléée (MPN) [203,295]. Selon ce mécanisme, la PrP^{res} est un polymère de PrP^c . Cette polymérisation est très lente, jusqu'à ce que le polymère atteigne une taille critique. Au delà de cette taille, le polymère est stabilisé, et la polymérisation devient plus rapide. Nowak, Masel et Jansen ont développé un modèle mathématique de ce mécanisme [299,304]. Selon leur modèle (appelé dans toute la suite le modèle de Masel), les particules actives pour la conversion sont des agrégats linéaires de PrP^{res} de différentes tailles (rappelant les fibrilles amyloïdes observées expérimentalement). Ces agrégats peuvent soit s'agrandir par fixation et conversion d'un monomère de PrP^c à l'une de ses extrémités, soit se fragmenter en 2 agrégats plus petits, multipliant ainsi le nombre de particules convertissantes.

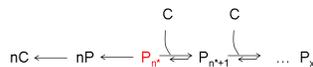


FIG. 4.5 – Mécanisme de Masel.

Le système d'équations différentielles ordinaires suivant décrit la dynamique de la quantité de PrP^c , couplée à l'évolution des agrégats de PrP^{res} :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}V(t) = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + 2\beta \sum_{i=1}^{n_0-1} \sum_{j>i} iu_j(t), \\ \frac{d}{dt}u_i(t) = -\mu u_i(t) - \beta(i-1)u_i - \tau V(t)(u_i(t) - u_{i-1}(t)) + 2\beta \sum_{j>i} u_j(t), \quad \text{pour } i \geq n_0. \end{cases} \quad (4.2)$$

$V(t)$ représente la quantité de PrP^c et $u_i(t)$ le nombre de polymères de PrP^{res} constitués de i unités élémentaires au temps t . La variable n_0 correspond à la taille critique, stabilisant les agrégats. La quantité $U(t) = \sum u_i(t)$ correspond au nombre total d'agrégats. Les paramètres constants $\lambda, \gamma, \tau, \beta, \mu$ correspondent respectivement à la production de la PrP^c, la dégradation de la PrP^c, le taux de conversion de la PrP^c en PrP^{res}, le coefficient de fragmentation et le taux de dégradation de la PrP^{res}.

Ce système, de dimension infinie, peut-être réduit par sommation à un système de 3 équations ordinaires :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}V(t) = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + n_0(n_0 - 1)\beta U(t), \\ \frac{d}{dt}U(t) = -\mu U(t) + \beta P(t) - (n_0 - 1)\beta U(t), \\ \frac{d}{dt}P(t) = -\mu P(t) + \tau V(t)U(t) - n_0(n_0 - 1)\beta U(t). \end{cases} \quad (4.3)$$

où $P(t) = \sum iu_i(t)$ correspond à la quantité totale de PrP^{res} constituant les agrégats. Par la suite, on appellera système microscopique le système (4.2) et système macroscopique les équations (4.3).

C'est le modèle le plus étudié à l'heure actuelle. Son intérêt principal réside dans le fait que, contrairement au mécanisme d'autocatalyse coopérative, les espèces actives ne sont pas limitées en taille. Le système macroscopique permet d'étudier les propriétés globales du système (cinétique totale de l'accumulation de PrP^{res}, états d'équilibre), le système microscopique permet de suivre en détail la dynamique d'évolution des espèces participant à la réaction et pouvant avoir un effet biologique important. C'est également le seul modèle pour lequel des paramètres cinétiques ont été estimés à partir de données expérimentales de réplication *in vivo* [299, 316].

Néanmoins, il repose sur des hypothèses très fortes :

(i) Hypothèses sur l'étape de nucléation.

Le modèle de Masel mime la polymérisation des Prions, au détriment de l'étape initiale de nucléation ; il ne prend donc pas en compte les occurrences sporadiques. D'autres modèles plus simples du MPN séparent bien les deux étapes de nucléation et de croissance (Modèle de Finke-Watsky [317]). Ils montrent une bonne correspondance avec des données cinétiques de fibrillisation *in vitro*, renforçant ainsi la validité d'un tel mécanisme [318, 319]. Mais ils ne

détaillent pas les étapes élémentaires de polymérisation.

(ii) Hypothèses sur la fragmentation.

La fragmentation des polymères de PrP^{res} est une étape clé du processus de réplication. En effet, la sonication (*i.e.* cassure par ultrasons), supposée induire la fragmentation des agrégats, est indispensable à l'amplification des Prions par PMCA [320]. De plus, la présence de la protéine chaperonne Hsp104, capable de fragmenter les Prions de levures Sup35 et Ure2, est primordiale pour la propagation du caractère infectieux [321].

Le mécanisme exact de fragmentation reste toutefois inconnu. Dans le modèle de Masel, la fragmentation est supposée linéaire en fonction de la taille de l'agrégat et pouvant se produire à n'importe quelle position de l'agrégat. Plusieurs mécanismes alternatifs ont été modélisés : une scission située uniquement aux extrémités des fibrilles (dépolymérisation uniquement) [322], et une scission à la fois aux extrémités et au centre du polymère [296].

(iii) Hypothèses sur l'élongation.

Une hypothèse importante est faite concernant la nature de l'élément qui vient s'ajouter à l'extrémité du polymère : le modèle de Masel suppose que c'est un monomère de PrP^c, ce qui correspond au mécanisme proposé par Griffith [94]. Pourtant, d'autres alternatives ont été envisagées. En effet, le mécanisme proposé par Lansbury suppose que c'est un monomère de PrP^{res} [216]. De plus, des expériences *in vitro* sur la polymérisation de la PrP ovine recombinante montrent l'existence d'oligomères de tailles spécifiques (12-mère et 36-mère) [217], pouvant polymériser par la suite. Enfin, après étude de l'agrégation des Prions de levures, Lindquist propose un mécanisme, appelé Conversion Conformationnelle Nucléée (CCN), où les agrégats s'aggrandissent par ajout d'un noyau de nucléation [204] (voir Figure 4.2, page 67).

(iv) Hypothèses sur les coefficients.

Enfin, le modèle de Masel suppose que tous les coefficients cinétiques du modèle sont constants. En particulier, le taux de production de la PrP^c ne dépend ni du temps, ni de la concentration en PrP (cellulaire ou résistante). Même si la grande majorité des modèles ne rapporte aucune modification d'expression du gène de la PrP, une sous-expression de *Prnp* a été observée après infection de cellules neuroendocriniennes en culture [192].

De même, les paramètres de polymérisation (*i.e.* le taux de dégradation μ , le taux de fragmentation β et le taux d'élongation τ des polymères de PrP^{res}) sont indépendants de la taille de l'agrégat convertisseur. Or des données récentes contredisent ces hypothèses. Les agrégats de PrP^{res} présentent des morphologies très hétérogènes [219, 323], contrairement à l'hypothèse d'une élongation se produisant aux extrémités d'une fibrille linéaire (et donc indépendante de la taille). De plus, le fractionnement des polymères de PrP^{res} selon leur taille (obtenus par purification à partir d'un homogénat de cerveau de hamster infecté) et leur inoculation à l'animal montre que le pouvoir infectieux des polymères dépend de leur taille [219]. Enfin, *in vivo*, les petits agrégats produits par PMCA présentent une infectiosité plus faible par rapport aux polymères de taille plus importante. L'effet inverse est observé après stabilisation des agrégats sur des particules de nitrocellulose, suggérant une dégradation plus importante des petits polymères [324].

1.4 Modèles alternatifs

Le modèle de Laurent ne prend en compte que les étapes initiales de conversion et le modèle de Masel ne détaille que les étapes suivantes de polymérisation. Slepoy, Mobley, Kulkarni et collègues ont proposé aux début des années 2000 des modèles stochastiques réunifiant conversion et polymérisation [297, 300, 302]. Basés sur des automates cellulaires à trois états (vide, PrP^c ou PrP^{res}), ils autorisent les particules à diffuser le long de la grille et à se transconformer. Ces modèles sont très robustes vis-à-vis des temps d'incubation (mesurés comme étant le temps mis par un noyau de PrP^{res} pour atteindre une taille donnée) caractéristiques des différentes maladies à Prions (en terme de doses ou d'étiologie sporadique et infectieuse). Mais leur définition stochastique (bien que plus réaliste) ne permet qu'une analyse numérique, basée sur des

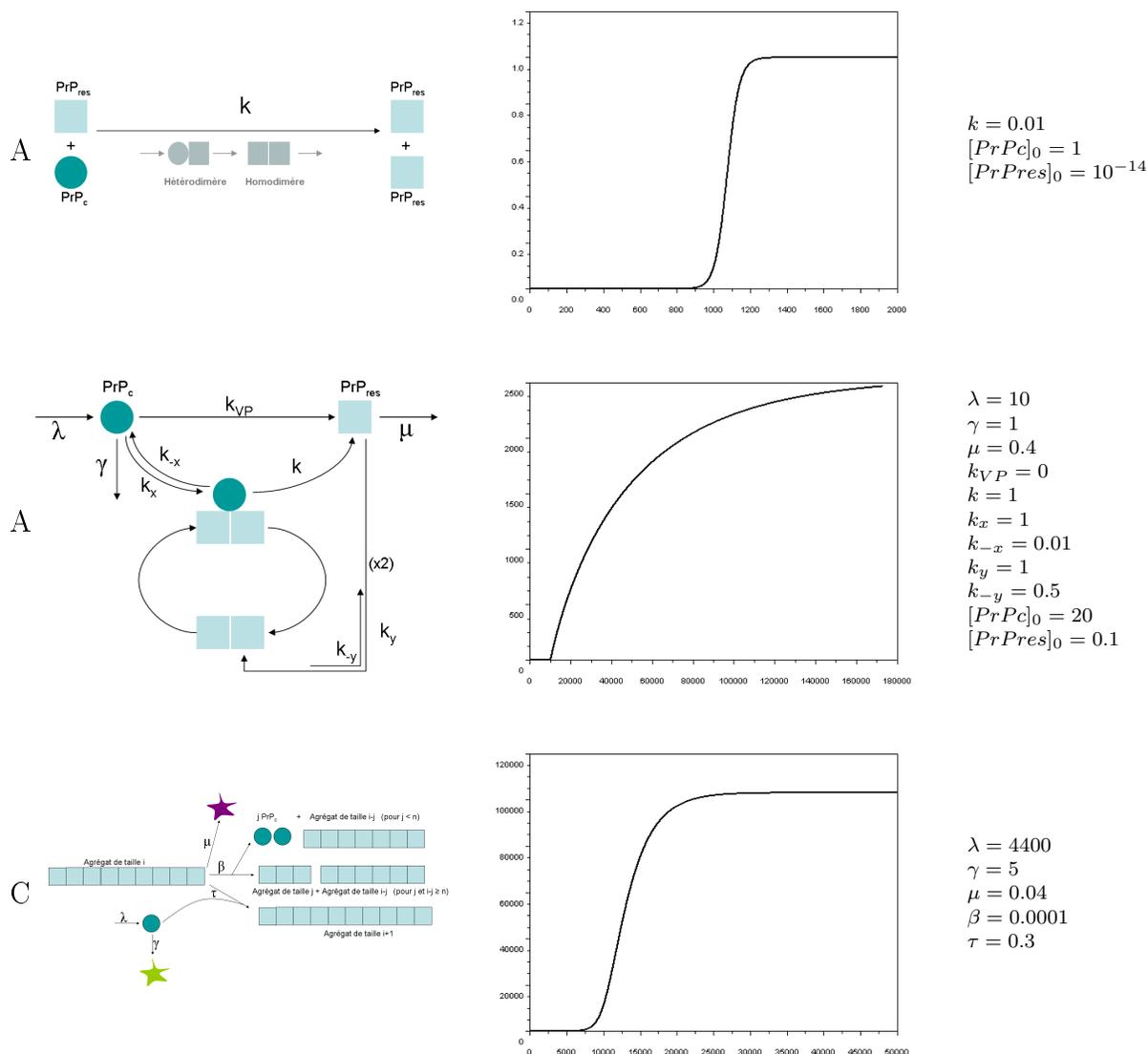


FIG. 4.6 – Cinétique d'évolution de la PrP. A. Modèle de Galdino (Hétérodimère). B. Modèle de Laurent (Dimère infectieux) C. Modèle de Masel. Les modèles plausibles biologiquement ont les mêmes comportements d'évolution (ici la cinétique d'évolution de la PrP). Ils ne peuvent donc pas être invalidés sur la bases des données expérimentales qualitatives existantes.

valeurs particulières de paramètres dont la significativité biologique est souvent inconnue.

2 Discrimination des modèles

Après élimination d'hypothèses invraisemblables, la modélisation mathématique sur la base des connaissances biologiques existantes aboutit à la définition de plusieurs modèles. Ces modèles sont tous aptes à reproduire des résultats expérimentaux connus, bien que ce soit pour des valeurs de paramètres dont la significativité biologique est souvent impossible à déterminer (voir Tableau 4.2 et Figure 4.6). Une façon d'aller plus loin dans la caractérisation des mécanismes est alors de faire appel à la capacité prédictive des modèles. La capacité prédictive des modèles mathématiques est couramment utilisée par les biologistes, dans le cas où les mécanismes modélisés sont bien caractérisés, comme un outil d'aide à la décision. Ce peut être par exemple pour prédire l'impact de stratégies d'intervention de santé publique [240] ou pour optimiser des traitements thérapeutiques si l'on dispose d'un modèle pharmacocinétique valide [325]. L'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques anti-Prions ont ainsi été comparées grâce à l'analyse des modèles : dans le cadre du modèle de polymérisation nucléée, Masel suggère que des stratégies visant à inhiber l'élongation des polymères serait plus efficace que des stratégies visant à fragmenter les agrégats ou à réduire la quantité de précurseur disponible (Tableau 4.1, [326]).

Dans le cas d'un mécanisme incertain, l'étape de modélisation permet également une exploration théorique rapide et complète des modèles, qui peut suggérer des expériences informatives sur le mécanisme de réplication. En effet, l'analyse théorique complète d'un modèle, comme l'analyse de stabilité des états d'équilibre ou le recours à la simulation numérique, permet d'informer sur les mécanismes aux limites et orienter l'expérimentation biologique. Plusieurs comportements différents selon les modèles de réplication ont ainsi été prédits et pourraient permettre de les discriminer.

2.1 Effet d'une augmentation locale de PrP^c

L'étude du modèle dynamique de Laurent montre que la transition de l'état sain à l'état pathologique peut être induite par une modification de n'importe quelle variable du modèle. En particulier, lorsqu'une cellule se trouve dans un état physiologique normal, une augmentation locale de la quantité de PrP^c (par le biais d'une diminution de sa dégradation ou d'une augmentation de sa synthèse) entraîne le déclenchement spontané de la maladie [201, 312]. A l'inverse, une diminution de la quantité locale de précurseur conduit au retour à l'état sain, avec un seuil de transition inférieur à celui de la transition sain \rightarrow pathogène (phénomène d'hystérésis, Figure 4.7).

Le modèle de Masel prévoit un comportement différent : dans la mesure où la conversion spontanée de la PrP^c en PrP^{res} n'est pas prise en compte, l'augmentation de la PrP^c n'a aucun effet en absence de PrP^{res} . En revanche, quand le système est à l'équilibre infecté, une diminution de la PrP^c conduit au retour à l'état d'équilibre sain.

Il existe des modèles cellulaires (les cellules RK13 [266]) et animaux [327] inductibles pour la

PrP^c. Dans ces modèles, diminuer la production de PrP^c conduit à un prolongement de la durée d'incubation [327]. De même, la diminution de la synthèse du précurseur conduit à l'élimination de l'infection dans les cellules neuroendocriniennes en culture [192]. En revanche, aucune ESST sporadique n'a été rapportée lors de l'induction de la PrP^c, en culture ou *in vivo*. Ces résultats

Stratégie proposée	d'après le modèle	Exemples
Diminution de la PrP^c Tous les modèles prenant en compte le métabolisme de la PrP ^c montrent qu'une diminution de la PrP ^c peut avoir un effet, curatif et préventif.	<i>Modèle de Laurent :</i> L'analyse de stabilité montre qu'un recyclage important de la PrP ^c conduit à la disparition de l'état d'équilibre pathologique (pas de déclenchement possible de la maladie). De même, en cas d'infection, augmenter ce turn-over conduit à la transition de l'état pathologique à l'état stable. Une analyse du temps de relaxation nécessaire pour aller d'un état à l'autre permettrait d'évaluer plus précisément ce rôle curatif.	Souris KO [96] ou déplétée en PrP après infection [327]. Expression d'ARNs interférents [328] PPS [329], Suramine [330], Amphotéricine B [331].
	<i>Modèle de Masel :</i> L'analyse des états d'équilibre du modèle donne les conditions de déclenchement d'une maladie à Prions : si a , alors l'état d'équilibre sain est globalement stable, c'est-à-dire que quelque soit la perturbation apportée, le système reviendra à l'état sain (effet préventif). En cas de déclenchement de la maladie, Masel souligne néanmoins la non-optimalité du traitement : la croissance de la PrP ^{res} ne dépend qu'en racine carrée (voir moins) de la concentration en PrP ^c , d'où une obligation de traiter à fortes doses.	
Clivage de la PrP membranaire ou modification du trafic intracellulaire de la PrP.	<i>Modèle de Payne :</i> La saturation des sites membranaires de la PrP conduit à une augmentation de la PrP intracellulaire, qui devient ainsi plus disponible pour la transconformation (augmentation simultanée du catalyseur et du substrat). Empêcher cette saturation pourrait ainsi ralentir fortement l'accumulation de PrP ^{res} .	Stimulation de l'endocytose de la PrP ^c : PPS [329]. Déstabilisation des rafts lipidiques, traitements anti-cholestérol : statines [332], mevinolin [333] Au contraire, la lactoferine diminue l'internalisation de la PrP et montre pourtant un effet anti-Prion [334], rendant le modèle peu vraisemblable.
	<i>Modèle de Masel :</i> fragmenter les agrégats de PrP ^{res} conduit à des oligomères de taille inférieure à la taille critique. L'étape de nucléation étant très lente, on ralentit ainsi la progression de la maladie. Le modèle montre qu'il existe une dose optimale, car les petits oligomères étant les plus infectieux, une dose insuffisante conduit à une multiplication des particules infectieuses. Cet effet est observé quelques soit l'hypothèse faite sur la fragmentation.	Rouge Congo [335, 336] Stabilisation par chaperonnes chimiques : DMSO [337], TMAO [338] Beta-sheet breaker [339].
Inhibition de la transconformation Tous les modèles suggèrent de façon évidente que l'inhibition de la transconformation est une stratégie thérapeutique efficace. En revanche, dans le cas du modèle de Masel, cette stratégie semble plus prometteuse que la diminution de la quantité de PrP ^c (doses efficaces plus faibles) et que l'induction de la fragmentation (risque important de mauvais dosage).	Tous les modèles suggèrent de façon évidente que l'inhibition de la transconformation est une stratégie thérapeutique efficace. En revanche, dans le cas du modèle de Masel, cette stratégie semble plus prometteuse que la diminution de la quantité de PrP ^c (doses efficaces plus faibles) et que l'induction de la fragmentation (risque important de mauvais dosage).	Dominants négatifs de la PrP [340] MBBAO-Erythromycine [271] glycosaminoglycane [341].

TAB. 4.1 – **Stratégie thérapeutiques issues de la modélisation.** Pour chacune, des exemples de molécules présentant un effet anti-Prions et dont le mécanisme d'action supposé est celui suggéré sont présentées (cette liste est non-exhaustive, voir [342] pour une revue détaillée).

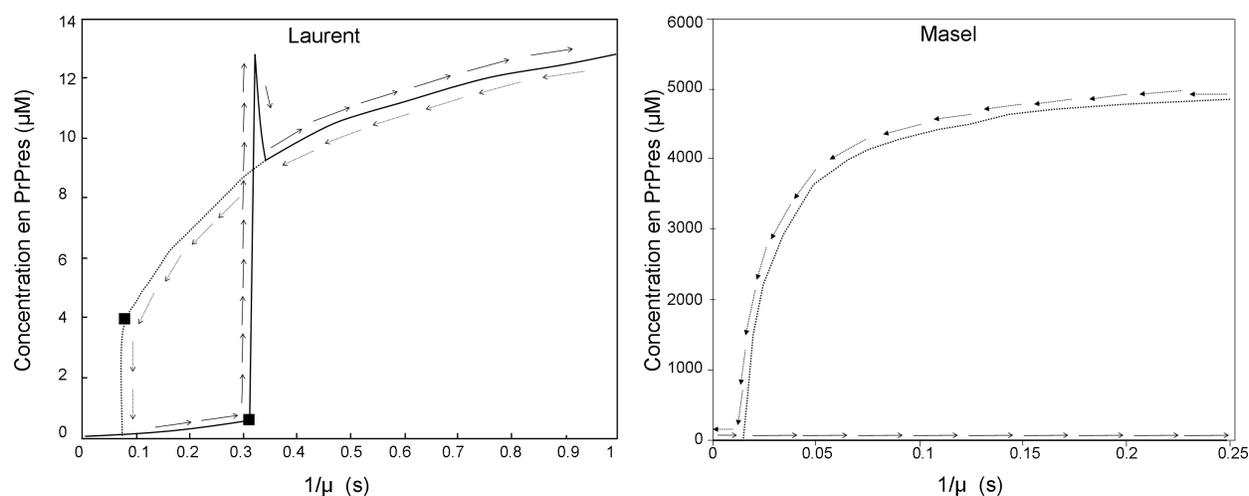


FIG. 4.7 – **Effet d'une augmentation de la PrP^c**. Quantité de PrP^{res} à l'équilibre, après variation de la quantité locale de PrP^c (due ici à une variation de sa dégradation). Courbe solide = effet d'une augmentation de la PrP^c en absence d'infection initiale. Courbe pointillée = effet d'une diminution de la PrP^c en présence d'infection initiale.

suggèrent que le modèle de Masel est plus vraisemblable, bien qu'on ne puisse pas exclure le fait que le déclenchement théorique observé dans le cas du modèle de Laurent se produise pour une augmentation de la quantité de PrP plus importante.

2.2 Effet de l'état d'agrégation initial de la PrP^{res}

L'analyse numérique de Pöschel et al [301] montre que dans le cas du mécanisme de polymérisation nucléée avec fragmentation, les conditions initiales influencent fortement la cinétique d'accumulation de la PrP^{res}. En particulier, plus les agrégats injectés sont petits, plus la cinétique d'accumulation de PrP^{res} est rapide (pour une quantité totale identique). Aucune différence n'est évidemment observée dans le cas du mécanisme de Laurent, puisque l'état d'agrégation n'est pas pris en compte (seule la quantité totale de PrP^{res} initiale influe sur la cinétique).

Cette expérience a par la suite été réalisée par Silveira et vient contredire les deux modèles dans une certaine mesure [219] : il montre en effet que les agrégats de 14 à 28 mères sont plus infectieux que les agrégats plus petits, contrairement aux prévisions de Pöschel ou de Laurent.

2.3 Distribution en taille des agrégats de PrP^{res}

L'analyse du modèle de polymérisation nucléée à coefficient constant prévoit une distribution en taille des polymères de PrP^{res} qui dépend fortement de la nature supposée de la fragmentation. Une dépolymérisation des agrégats (*i.e.* cassure uniquement aux extrémités) entraîne une répartition exponentielle de ces agrégats. Au contraire, une fragmentation linéairement répartie sur toute la longueur du polymère aboutit à une distribution unimodale en forme de cloche [301], centrée vers les petits agrégats. Cette distribution est alors peu sensible aux variations de paramètres [343].

La distribution en taille des agrégats de PrP^{res} dans des cerveaux de souris infectées a récemment été déterminée par sédimentation pour différentes souches de Prions. Différentes en fonction des souches, ces distributions en taille ne semblent toutefois pas unimodales, contrairement aux prévisions des modèles [221].

3 Des modèles pour orienter la compréhension biologique

Un intérêt majeur de la modélisation est également de permettre de décorrélérer les mécanismes élémentaires intervenant dans un processus complexe. En particulier, il est possible de faire varier un seul paramètre à la fois, afin de chercher le paramètre responsable d'un comportement observé.

3.1 Mise en évidence de comportements synergiques ou antagonistes

Des synergies ou des antagonismes non intuitifs expérimentalement peuvent être explicités par l'analyse d'un modèle, par le biais d'une relation mathématique. Par exemple, l'analyse de stabilité des états d'équilibre du modèle de Masel donne les conditions de déclenchement d'une infection en fonction des paramètres du modèle [305]. Une condition nécessaire au développement d'une ESST est :

$$\sqrt{\frac{\beta\lambda\tau}{\gamma}} > x_0\beta + \mu$$

avec les notations introduites précédemment (taux de production de la PrP^c λ , taux de dégradation de la PrP^c γ , taux de dégradation de la PrP^{res} μ , taux d'élongation des agrégats de PrP^{res} τ et taux de fragmentation des agrégats de PrP^{res} β).

Cette relation montre que le niveau de PrP^c (qui est une donnée critique connue pour la susceptibilité à l'infection) agit en compétition avec le niveau de fragmentation et d'élongation. Pour étudier le phénomène de susceptibilité à l'infection dans un contexte biologique donné (*i.e.* à quantité de PrP^c fixée), il est nécessaire de mesurer à la fois le taux d'élongation τ et le taux de fragmentation β .

En outre, cette relation permet d'élaborer des combinaisons thérapeutiques permettant de prévenir l'infection. Dans le cas d'un traitement unique, cette relation montre qu'une modification du métabolisme de la PrP^c (en diminuant son niveau de production ou en augmentant sa dégradation) est moins efficace qu'une augmentation de la dégradation de la PrP^{res} par exemple [326, 343].

3.2 Conditions d'occurrence des ESST sporadiques

L'origine des occurrences sporadiques des ESST semble être la conversion spontanée de la PrP^c en PrP^{res}. Afin de rendre compte de la faible incidence des formes sporadiques, on suppose que c'est un événement très rare (ou très lent au regard de la durée de vie d'un individu), mais conduisant systématiquement au déclenchement de la maladie. Les modèles mathématiques de réplication des Prions sont capables de reproduire l'incidence rare sous d'autres hypothèses,

ouvrant ainsi le champ des explications possibles :

(i) Les modèles de croissance bi-dimensionnelle des agrégats de PrP^{res} par automates cellulaires autorisent la conversion spontanée uniquement lorsque deux (ou plus) molécules de PrP^{c} sont en contact. En l'absence d'infection initiale, une incidence de la maladie d'environ 1 cas sur 10^6 [302] est retrouvée, ce qui est compatible avec l'incidence réelle des ESST sporadiques humaines.

(ii) Le modèle de Laurent suggère que la transformation spontanée de la PrP^{c} en PrP^{res} est un événement possible, qui n'est pas rare mais qui est immédiatement compensé par la dégradation de la PrP^{res} dans le cas d'un métabolisme normal de la PrP^{c} . Toutefois, une modification du métabolisme de la PrP^{c} (augmentation de la production ou baisse de la dégradation) entraîne une quantité plus importante de PrP^{c} , et par conséquent, une quantité plus importante de PrP^{res} "spontanée", qui n'est alors plus entièrement dégradée, d'où le déclenchement de la maladie [201]. Dans ce contexte, ce n'est plus la conversion de la PrP^{c} en PrP^{res} qui est un événement lent et rare, mais la modification du métabolisme de la PrP (ou de tout autre paramètre cinétique du modèle). Cette hypothèse va dans le sens d'une pathologie liée au vieillissement (âge tardif des occurrences sporadiques), via une altération des mécanismes liés au repliement et à la dégradation des protéines [344].

3.3 Divergence des mesures expérimentales du titre infectieux

Deux méthodes sont classiquement utilisées pour mesurer le titre infectieux d'un échantillon (Figure 4.8). La titration limite consiste à inoculer à l'animal différentes dilutions sériées de l'échantillon. La dilution qui tue 50% des animaux est appelée la LD_{50} : elle contient 1 unité infectieuse. De façon alternative, la mesure du temps d'incubation est également utilisée, basée sur la très grande reproductibilité du temps d'incubation. Des courbes standards donnant la relation temps d'incubation en fonction du titre infectieux ont été calibrées pour une souche donnée dans un modèle animal et pour une voie d'inoculation précise.

Néanmoins, ces deux méthodes ne sont pas toujours équivalentes. Par exemple, le titre infectieux mesuré par titration limite est multiplié par 100 après traitement de l'échantillon initial par des détergents et par 17 fois après sonication, alors que celui mesuré par le biais du temps d'incubation n'est multiplié que par 10 dans le cas des détergents, et reste inchangé après sonication [345–348]. La cause de ces divergences reste incomprise.

Masel et Jansen ont utilisé le modèle de polymérisation nucléée pour identifier précisément les grandeurs mesurées par chacune des 2 méthodes [348] :

$$\log(\text{INF}_{\text{dilution}}) = \text{cste} + \log(p) - \log(s_0)$$

$$\log(\text{INF}_{\text{incubation}}) = \text{cste} + \log(s_0 + s - 2n + 1) - \log(s_0)$$

où $\text{INF}_{\text{dilution}}$ et $\text{INF}_{\text{incubation}}$ représentent respectivement les infectiosités mesurées par titration limite et par temps d'incubation, p la probabilité qu'une particule infectieuse déclenche l'infection et s_0 la taille moyenne des agrégats de PrP^{res} dans l'échantillon à titrer. Les para-

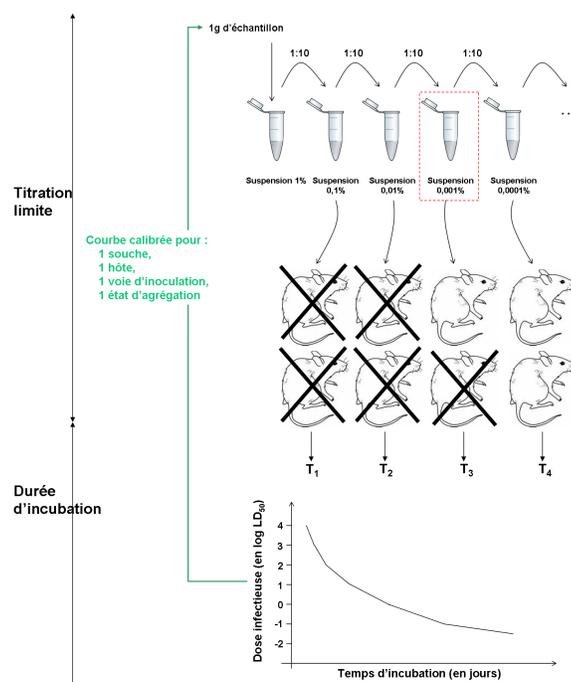


FIG. 4.8 – Méthodes de titration de l'infectiosité. La LD₅₀ est la dose qui tue 50% des animaux (ici, 10³ LD₅₀ par gramme de matériel infectieux, en pointillés rouges). La courbe d'incubation est calibrée d'après les résultats de la titration limite.

mètres s et n sont la taille moyenne et la taille minimale des agrégats de PrP^{res} dans l'animal test, ils dépendent de la relation entre l'hôte et la souche.

La figure 4.9 montre l'évolution de ces deux expressions en fonction de s_0 , la taille moyenne initiale des agrégats : on retrouve numériquement le fait que la mesure de l'infectiosité par le temps d'incubation est moins sensible à la sonication. Les deux expressions analytiques mettent en évidence l'origine de ces divergences : les deux méthodes ne mesurent pas la même grandeur. Dans le cas de la titration limite, la grandeur mesurée est directement proportionnelle au nombre d'agrégats de PrP^{res}. Ainsi, à une quantité totale de PrP^{res} donnée, diminuer la taille moyenne des agrégats conduit à une augmentation du nombre de particules infectieuses, et donc à une augmentation de l'infectiosité mesurée. En revanche, le temps d'incubation dépend non seulement du nombre de particules infectieuses, mais également de la taille de ces particules : dans ce cas, l'augmentation de l'infectiosité mesurée due à l'augmentation du nombre de particules infectieuses est contrebalancée dans une certaine mesure par un allongement de la durée d'incubation spécifique d'un agrégat.

Ainsi, la modélisation a permis d'explicitier l'origine des divergences expérimentales : pour être compatibles, les deux méthodes doivent être calibrées non seulement pour une espèce, une souche et une voie d'inoculation données, mais également pour un niveau d'agrégation donné. De plus en explicitant les grandeurs mesurées par l'une ou l'autre des deux méthodes, la modélisation souligne que ces deux méthodes ne sont pas du tout équivalentes. Lorsqu'il s'agit de mesurer le nombre de particules infectieuses (pour mesurer l'effet d'un traitement

décontaminant par exemple), la titration limite semble la plus adaptée. En revanche, la mesure du temps d'incubation semble capturer plus précisément la virulence d'un échantillon et semble ainsi plus adaptée à l'étude des phénomènes de souches.

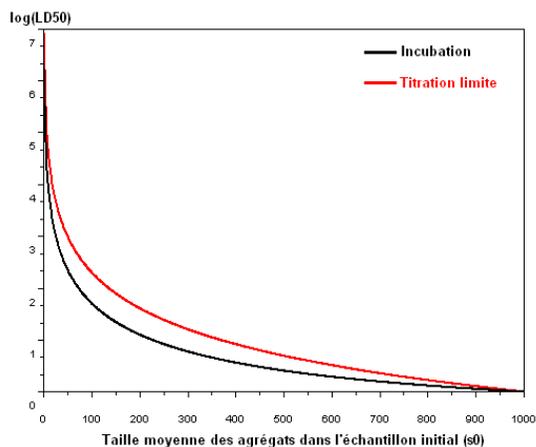


FIG. 4.9 – **Effet de la sonication sur l'infectiosité.** Modélisation de l'effet de la sonication sur les doses infectieuses mesurées selon les 2 méthodes (incubation en noir et titration limite en rouge). La sonication est modélisée par une diminution de la taille moyenne initiale des agrégats s_0 . L'infectiosité spécifique de chaque méthode est évaluée par les expressions : $\log(INF_{dilution}) = cste + \log(p) - \log(s_0)$ et $\log(INF_{incubation}) = cste + \log(s_0 + s - 2n + 1) - \log(s_0)$. La constante intervenant dans la mesure par titration est choisie arbitrairement à 0, celle intervenant dans la mesure par incubation est calibrée d'après la titration limite pour un inoculum de départ de taille moyenne $s_0 = 1000$. Les autres paramètres choisis pour la simulation sont : $s = 1000$, $n = 3$, $p = 0.07$. On constate que la mesure par durée d'incubation est moins sensible à l'effet de la sonication que la mesure par titration limite.

TAB. 4.2: Modèles de réplication des Prions

Auteur(s)	Equations/Modèles	Contexte biologique
Modèle de l'hétérodimère		
1996 Eigen [200]	$\frac{d[V]}{dt} = \lambda - (\gamma + k_{VP})[V] - \frac{k_T[V]}{K_M+[V]}[P],$ $\frac{d[P]}{dt} = -(\mu + k_{PV})[P] + k_{VP}[V] + \frac{k_T[V]}{K_M+[V]}[P].$	<p>Mécanismes : Métabolisme de la PrP, conversion spontanée et conversion catalytique</p> <p>Hypothèses : conditions d'application des équations de Micaëlis-Menten (PrP^C en excès devant la PrP^{res})</p> <p>Résultats : Les valeurs des paramètres compatibles avec la rareté des formes sporadiques sont irrelevantes biologiquement.</p>
2001 Galdino [308]	$\frac{d[P]}{dt} = k[V][P] = k(\rho - [P])[P].$	<p>Mécanismes/Hypothèses : Aetologie infectieuse uniquement. La quantité totale de PrP est maintenue constante.</p> <p>Résultats : profil d'accumulation de la PrP^{res} en forme de sigmoïde (phase d'incubation, suivie de la phase clinique rapide)</p>
1998 Payne, Krakauer [277] Matthaus [274]	$\frac{\partial V}{\partial t} = \delta_V \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \lambda - \gamma V - kVP,$ $\frac{\partial P}{\partial t} = \delta_P \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + kVP - \mu B.$	<p>Mécanismes/ Hypothèses : Diffusion de la PrP^{res} le long d'un domaine unidimensionnel (nerf). Le métabolisme de la PrP n'est pas pris en compte. Aetologie infectieuse uniquement.</p> <p>Résultats : Etude des conditions d'existence d'un front de propagation de l'infection. La compétition de souche est vue comme une compétition de ressources : une souche lente consommant les ressources peut ralentir une souche plus rapide.</p>
2000 Stumpf, Krakauer [276]	<p>Modèle cinétique associé à chaque cellule :</p> $\frac{dV_l}{dt} = \lambda_l - kV_l(t)P_l(t) - \gamma_l V_l(t),$ $\frac{dP_l}{dt} = kV_l(t)P_l(t) - \sum_{l,r} (\delta_{lr} P_l(t) - \delta_{rl} P_r(t)) - \eta P_l(t),$ $\frac{dW_l}{dt} = \eta P_l(t).$	<p>Mécanismes/ Hypothèses : Modélisation par automate cellulaire de la propagation de l'infection, dans un contexte infectieux uniquement. Le métabolisme de la PrP n'est pas pris en compte ; en revanche, la PrP^{res} peut s'agréger (formation de plaques amyloïdes). Seule la PrP^{res} non agrégée diffuse d'une cellule à l'autre.</p> <p>Résultats : la diffusion de la PrP^{res} influence fortement la formation de plaques amyloïdes. De même, une toxicité due à la déplétion en PrP^C aboutit à une faible formation de plaques, contrairement à un gain de toxicité de la PrP^{res}.</p>
1998 Payne, Krakauer [275]	$\frac{dV_m}{dt} = \chi_1(R - V_m - P_m)V_c - \chi_2 V_m - \gamma V_m,$ $\frac{dV_c}{dt} = -\chi_1(R - V_m - P_m)V_c + \chi_2 V_m - k_T V_c P_c / (K_M + P_c) + \lambda,$ $\frac{dP_m}{dt} = \pi_1(R - V_m - P_m)P_c - \pi_2 P_m - \mu P_m,$ $\frac{dP_c}{dt} = -\pi_1(R - V_m - P_m)P_c + \pi_2 P_m + k_t V_c P_c / (K_M + P_c).$	<p>Mécanisme / Hypothèses : Modélisation du trafic cellulaire de la PrP. Pour chaque isoforme, 2 compartiments sont séparés : les formes cytosoliques et membranaires. Le nombre de récepteurs membranaires de la PrP est supposé fini et constant.</p> <p>Résultats : dans un premier temps, la PrP^{res} s'accumule lentement, jusqu'à saturation des sites membranaires qui conduit à une accumulation soudaine et extrêmement rapide.</p>

Auteur(s)	Equations/Modèles	Contexte biologique
Modèle d'autocatalyse coopérative		
1996 Laurent [201, 311] Kacser, Small [313]	<p>Modèle phénoménologique :</p> $\frac{d[V]}{dt} = \lambda - \gamma[V] - \frac{k_{VP}(1+b[P]^r)}{1+a[P]^r} [V],$ $\frac{d[P]}{dt} = -\mu[P] + \frac{k_{VP}(1+b[P]^r)}{1+a[P]^r} [V].$	<p>Mécanismes : métabolisme de la PrP, conversion spontanée et conversion autocatalytique coopérative. Le premier modèle ne présente pas explicitement le rôle des différents partenaires impliqués. Le deuxième modèle, plus détaillé, suppose que les agrégats responsables de la conversion autocatalytique sont les dimères de PrP^{res}. Encore basé sur la théorie enzymatique, il ne détaille pas explicitement l'évolution des différentes espèces.</p>
1998 Laurent [298]	<p>Modèle du dimère infectieux :</p> $\frac{d[V]}{dt} = \lambda - \gamma[V] - k_{VP}[V] - \frac{k_{cat}[V]}{K_M+[V]} [P]^2,$ $\frac{d[P]}{dt} = -\mu[P] + k_{VP}[V] + \frac{k_{cat}[V]}{K_M+[V]} [P]^2.$	<p>Hypothèses : conditions d'application des équations de la théorie enzymatique coopérative (modèles 1 et 2).</p>
2001 Laurent, Kellershohn [314]	<p>Modèle du dimère infectieux (mécanistique) :</p> $\frac{dV}{dt} = \lambda - (k_{VP} + \gamma)V - [k_x V \bullet P_d - k_{-x} P_d V],$ $\frac{dP}{dt} = \lambda_P + k_{VP}V + k_{P_d}V + 2[k_{-y}P_d - k_{-y}P^2] - \mu P,$ $\frac{dP_d}{dt} = k_{P_d}V - [k_x V \bullet P_d - k_{-x} P_d V] - [k_{-y}P_d - k_{-y}P^2]$ $\frac{dP_d V}{dt} = [k_x V \bullet P_d - k_{-x} P_d V] - k_{P_d}V.$	<p>Résultats : Présence de 2 états d'équilibre, avec possibilité de transition de l'état sain à l'état pathologique (sous l'effet (i) d'une modification des paramètres cinétiques ou (ii) d'une injection de PrP^{res}). La transition spontanée (i) est réversible, la transition infectieuse (ii) est irréversible [314]. Ce phénomène de bistabilité reproduit les occurrences infectieuses et sporadiques possibles [201, 311], pour un intervalle restreint de paramètres [349]. De façon intéressante, l'état sain est caractérisé par un niveau de PrP^{res} non nul. Enfin, le modèle est compatible avec les temps d'incubation observés (long temps de relaxation de l'état sain à l'état pathologique) [314].</p>
1998 Laurent, Kellershohn [298, 315]	$\frac{d[V]}{dt} = \lambda - (k_{VP} + \gamma)[V] - \frac{k_{cat1}[P_d^*][V]}{K_{M1}+[V]} - \frac{k_{cat}[V]}{K_M+[V][P]^2} - \frac{k_{cat0}[P_{inoc}][V]}{K_{M0}+[V]},$ $\frac{d[P]}{dt} = -\mu[Y] + k_{VP}[V] + \frac{k_{cat}[V]}{K_M+[V][P]^2} + \frac{k_{cat1}[P_d^*][V]}{K_{M1}+[V]},$ $\frac{d[P^*]}{dt} = \frac{k_{cat0}[P_{inoc}][V]}{K_{M0}+[V]} - \mu^*[P^*],$ <p>avec $[P_d^*] = k_{ass}[P^*]^2/k_{diss}$.</p>	<p>Mécanisme / Hypothèses : modélisation du phénomène de souche. Existence d'un intermédiaire conformationnel P^* lorsque la PrP^c est convertie en PrP^{res} par la PrP^{res} du donneur (P_{inoc}). Les mécanismes sont modélisés par les équations classiques de théorie enzymatique.</p> <p>Résultats : reproduction du mécanisme de barrière d'espèce (en cas de contamination inférieure à un seuil donné) et du mécanisme d'adaptation de souche (stabilisation sur 3 passages).</p>
Modèle de polymérisation nucléée		
- Certaines contributions purement mathématiques seront détaillées au chapitre suivant, et ne sont donc pas présentées dans ici -		
1999 Masel, Jansen [322]	$u_{i+1} = u_i[V]/c.$	<p>Mécanisme/Hypothèses : modélisation de l'étape de croissance uniquement (pas de forme sporadique), selon un processus de polymérisation/dépolymérisation, décrit pour la première fois par Oosawa et Kasai [350]. Résultats : Fittage des données de conversion in vitro de Caughey et al [351]. Distribution exponentielle des agrégats selon leur taille.</p>

Auteur(s)	Equations/Modèles	Contexte biologique
1997 Finke, Watzky [317, 318]	$[V]_t = \frac{k_n/k_g + [V]_0}{1 + \frac{k_n}{k_g} e^{(k_n+k_g[V]_0)t}},$ $[P]_t = [P]_0 - \frac{k_n/k_g + [V]_0}{1 + \frac{k_n}{k_g} e^{(k_n+k_g[V]_0)t}}.$	<p>Mécanisme/Hypothèses : modélisation de l'état de nucléation (à une vitesse k_n) suivie de la phase de croissance (à une vitesse k_g), sans tenir compte de la fragmentation. La conversion spontanée est lente devant la conversion catalytique ($k_n \ll k_g$). Les espèces intervenant dans les différentes phases ne sont pas modélisées explicitement (description phénoménologique).</p> <p>Résultats : Fittage des courbes expérimentales de fibrilisation in vitro de 14 protéines amyloïdes, dont la PrP [318].</p>
1998 Nowak, Masel, Jan- sen [299, 304]	<p>Modèle microscopique discret :</p> $\frac{d}{dt}V(t) = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + 2\beta \sum_{i=1}^{n_0-1} \sum_{j>i} i u_j(t),$ $\frac{d}{dt}u_i(t) = -\mu u_i(t) - \beta(i-1)u_i - \tau V(t)(u_i(t) - u_{i-1}(t)) + 2\beta \sum_{j>i} u_j(t), \text{ pour } i \geq n_0.$ <p>Modèle macroscopique discret :</p> $\frac{d}{dt}V(t) = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + n_0(n_0-1)\beta U(t),$ $\frac{d}{dt}U(t) = -\mu U(t) + \beta P(t) - (n_0-1)\beta U(t),$ $\frac{d}{dt}P(t) = -\mu P(t) + \tau V(t)U(t) - n_0(n_0-1)\beta U(t).$ <p>Modèle microscopique continu (Greer [305]) :</p> $\frac{dV(t)}{dt} = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + 2 \int_{x_0}^{x_0} x \int_{x_0}^{\infty} \beta(y)\kappa(x,y)u(y,t)dydx,$ $\frac{\partial}{\partial t}u(x,t) + \tau V(t)\frac{\partial}{\partial x}u(x,t) = -\mu u(x,t) - \beta(x)u(x,t) + 2 \int_{x_0}^{\infty} \beta(y)\kappa(x,y)u(y,t)dy.$	<p>Mécanisme/Hypothèses : Une particule infectieuse est un agrégat de PrP. Les agrégats peuvent s'agrandir par ajout d'une PrP^C monomérique ou se fragmenter en 2 agrégats plus petits. Lorsqu'un agrégat est inférieur à une taille critique donnée, il se fragmente instantanément en monomères de PrP^C. Le métabolisme de la PrP (production et dégradation) est également pris en compte. Tous les paramètres du modèle sont supposés indépendants du temps et de la taille des agrégats. Pas de conversion spontanée possible.</p> <p>Résultats : le système possède 2 états d'équilibre, correspondant aux états sain et pathologique. La cinétique d'accumulation de la PrP^{res} est compatible avec celle observée dans le cerveau (croissance exponentielle, en cas de ressources illimitées) ou dans la rate (saturation à un plateau) [301]. La dépendance logarithmique du temps d'incubation en fonction de la dose inoculée initialement est également retrouvée. [305].</p>
2008 Kumar [299, 304]	$\frac{dV(t)}{dt} = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + 2 \int_{x_0}^{x_0} x \int_{x_0}^{\infty} \beta(y)\kappa(x,y)u(y,t)dydx,$ $\frac{\partial}{\partial t}u(x,t) + \tau V(t)\frac{\partial}{\partial x}u(x,t) = -\mu u(x,t) - \beta(x)u(x,t) + 2 \int_{x_0}^{\infty} \beta(y)\kappa(x,y)u(y,t)dy + \alpha_2 C(t)u(x,t),$ $\frac{dC(t)}{dt} = -\alpha_0 C(t) + \alpha_1 C(t) \int_{x_0}^{\infty} u(x,t)dx.$	<p>Mécanisme/Hypothèses : Même mécanisme que les modèles précédents, en rajoutant l'action de protéines chaperonnes, qui viennent dégrader la PrP^{res}. Les protéines chaperonnes sont produites de façon proportionnelle à la quantité de PrP^{res} dans le système, et dégradées.</p> <p>Résultats : le profil d'accumulation sigmoïdal de la PrP^{res} est reproduit, de façon retardée (d'autant plus que la quantité de protéines chaperonnes est importante).</p>
2006 Matthaus [274]	$\partial V/\partial t = D_V \partial^2 V/\partial^2 x + \lambda - \gamma V - \tau A \sum u_i + 2\beta \sum_{i=1}^{n_0-1} \sum_{j=i+1}^{\infty} i P_j,$ $\partial u_i/\partial t = D_{u_i} \partial^2 V/\partial^2 x + \tau V(u_{i-1} - u_i) - \mu u_i - \beta(i-1)u_i + \beta \sum_{j=i+1}^{\infty} u_j.$	<p>Mécanismes/ Hypothèses : Diffusion de la PrP^{res} le long d'un domaine unidimensionnel (par exemple un nerf). La diffusion dépend de la taille de l'agrégat.</p> <p>Résultats : Existence d'un front de propagation.</p>

Auteur(s)	Equations/Modèles	Contexte biologique
Modèles alternatifs		
2001 Slepoy, Moble, Kulkarni [297, 300, 302]	Modélisation par un automate cellulaire stochastique : chaque case d'une grille hexagonale peut prendre 3 états (vide, PrP^c ou PrP^{res}). La conversion de la PrP^c en PrP^{res} s'effectue selon différentes règles d'évolution (selon le nombre de voisins infectieux, selon leur répartition, etc...). Les différents complexes oligomériques peuvent également diffuser selon un processus de marche aléatoire (la vitesse de diffusion dépendant de la taille de l'agrégat).	<p>Mécanisme/Hypothèses : La concentration en PrP^c est supposée constante. Plusieurs règles de conversion ont été testées : la croissance via l'ajout d'un monomère [302] ou via l'ajout d'un oligomère [300]. Lorsque 2 PrP^c ou plus sont dans le même voisinage, il existe une possibilité de conversion spontanée.</p> <p>Résultats : Les modélisateurs se sont principalement attachés à étudier le temps d'incubation en fonction de la morphologie des agrégats. Notamment, (i) une conversion impliquant des monomères ou des dimères de PrP^{res} n'est pas compatibles avec les longs temps d'incubation observés dans les cas sporadiques; (ii) à partir du trimère infectieux, il est possible de reproduire les distributions des temps d'incubations observées pendant l'épidémie de BSE au Royaume-Uni en 1986; (iii) enfin, la relation entre le temps d'incubation et la dose d'inoculum initiale est reproduite très fidèlement (relation log-linéaire en cas à forte dose, avec une grande reproductibilité; déviation par rapport à la relation logarithmique et variabilité plus importante en cas de faible dose).</p>

TAB. 4.2: **Modèles de réplication des Prions.** Les notations introduites sont les différents modèles sont récapitulées tableau 4.3, page 85

Symbole	Description	Symbole	Description
Indices, Variables d'évolution			
t	Temps		
z	Espace	l, r	Espace (cellule)
x	Taille du polymère	i, j	Taille du polymère
Variables d'état			
V	Quantité de PrP ^c	P	Quantité de PrP ^{res}
V_c	Quantité de PrP ^c cytosolique	P_c	Quantité de PrP ^{res} cytosolique
V_m	Quantité de PrP ^c membranaire	P_m	Quantité de PrP ^{res} membranaire
ρ	Quantité totale de PrP	P_d	Quantité de PrP ^{res} dimérique
P^*	Quantité de PrP [*]	$P_d V$	Quantité du trimère PrP ^c -PrP ^{res} -PrP ^{res}
P_d^*	Quantité de PrP [*] dimérique	U	Quantité d'agrégats de PrP ^{res}
P_{inoc}	Quantité de PrP ^{res} inoculée	u_i	Quantité d'agrégats de PrP ^{res} de taille i
W	Quantité de PrP ^{res} agrégée en plaque amyloïde	C	Quantité de protéine chaperonnes
Paramètres			
k_{VP}	Conversion spontanée de la PrP ^c en PrP ^{res}	λ	Taux de production de la PrP ^c
k_{PV}	Conversion spontanée de la PrP ^{res} en PrP ^c	λ_P	Taux de production de la PrP ^{res}
k	Coefficient de conversion autocatalytique (par P)	γ	Taux de dégradation de la PrP ^c
k_T	Activité spécifique de conversion (de P)	μ	Taux de dégradation de la PrP ^{res}
k_{cat}	Activité spécifique de conversion (de P_d)	$\beta, \beta_i, \beta(x)$	Coefficient de fragmentation des agrégats de PrP ^{res}
k_{cat0}	Activité spécifique de conversion (de P_{inoc})	$\tau, \tau(x)$	Coefficient d'élongation des agrégats de PrP ^{res}
k_{cat1}	Activité spécifique de conversion (de P^*)	n_0, x_0	Taille critique de nucléation
K_M	Coefficient de Mickaëlis-Menten	k_n	Coefficient de nucléation
K_{M0}	Coefficient de Mickaëlis-Menten (de P_{inoc})	k_g	Coefficient de croissance
K_{M1}	Coefficient de Mickaëlis-Menten (de P^*)	δ_V	Coefficient de diffusion de la PrP ^c
k_x	Coefficient d'association de V à P_d	δ_P, δ_{P_i}	Coefficient de diffusion de la PrP ^{res}
k_{-x}	Coefficient de dissociation de V à P_d	R	Quantité maximale de récepteurs membranaire pour la PrP
k_y	Coefficient d'association de P à P	χ_1	Coefficient d'association de la PrP ^c à la membrane
k_{-y}	Coefficient de dissociation de P à P	χ_2	Coefficient de dissociation de la PrP ^c à la membrane
k_{ass}	Coefficient d'association de P^* à P^*	π_1	Coefficient d'association de la PrP ^{res} à la membrane
k_{diss}	Coefficient de dissociation de P^* à P^*	π_2	Coefficient de dissociation de la PrP ^{res} à la membrane
η	Taux d'agrégation de la PrP ^{res}	α_0	Taux de dégradation des chaperonnes
a, b, r	Paramètres de conversion catalytique par un dimère	α_1	Coefficient de dégradation de la PrP ^{res} par les chaperonnes
c	Concentration critique en PrP ^c	α_2	Coefficient de production des chaperonnes

TAB. 4.3 – Notations introduites au tableau 4.2, page 84.

Chapitre 5

Problématique et objectifs de la thèse

Actuellement, le risque de transmission des maladies à Prions de l'animal à l'homme par voie alimentaire semble maîtrisé, grâce aux mesures de protection des consommateurs (retrait des abats à risque, tests à l'abattoir, arrêt du recyclage des farines animales). En revanche, la transmission iatrogène, par le biais d'instruments chirurgicaux ou de produits sanguins, reste possible. Cinq cas de contamination par transfusion de produits sanguins ont été observés à ce jour en Grande-Bretagne, et l'absence d'outil de détection des maladies à Prions couplé au temps d'incubation très longs rend difficile l'évaluation du risque iatrogène. De plus, la possibilité de transmission des ESST animales à l'homme, mise en évidence par la transmission de l'ESB et l'émergence de la vMCJ, souligne le risque zootique potentiellement associé aux souches animales atypiques (BASE, Tremblante atypique) ou au Syndrome du Dépérissement Chronique. L'évaluation et le contrôle de ces risques nécessitent de mieux comprendre les mécanismes de réplication des Prions, à l'origine de la multiplication et de la dissémination de ces agents infectieux.

Les outils expérimentaux mis en place pour étudier ces mécanismes restent limités pour étudier les mécanismes moléculaires élémentaires impliqués. En effet, ces mécanismes sont la conséquence d'interactions moléculaires et de processus élémentaires rarement dissociables les uns des autres. En outre, ce sont des processus dynamiques : la cascade d'événements conduisant à un état donné est difficilement accessible. Pour tenter de pallier ces limites expérimentales, de nombreux modèles mathématiques ont été développés pour étudier différentes hypothèses sur le mécanisme de réplication des Prions. Complémentaires des outils expérimentaux, ils permettent d'étudier l'influence d'un seul paramètre élémentaire sur le comportement du système complexe. De plus, ils permettent de capturer la dynamique temporelle complète du système, de l'état initial à un état final (correspondant à l'état mesuré expérimentalement).

Parmi ces modèles, le modèle mathématique le plus complet à l'heure actuel suppose que tous les agrégats de PrP ont le même comportement de réplication, indépendamment de leur taille [299]. Or, la caractérisation des différentes espèces moléculaires de PrP^{res} (des courts oligomères jusqu'aux longs polymères) s'est intensifiée au cours des dernières années. Les données récentes montrent que ces espèces possèdent des propriétés biologiques spécifiques de leur taille [181, 219]. En particulier :

- les agrégats de PrP^{res} sont très hétérogènes en morphologie. Ils peuvent adopter des structures amorphes, sphériques ou fibrillaires selon les conditions de préparation [219, 323, 352].

- la difficulté de générer de l'infectiosité à partir de PrP recombinante pure suggère que des co-facteurs sont nécessaires au mécanisme de conversion de la PrP^c en PrP^{res} infectieuse. Par exemple, les glycosaminoglycanes semblent importants dans la formation et la stabilisation de la PrP^{res} [353]. Dans ce contexte, un taux de réplication identique pour tous les agrégats impliquerait que les interactions entre la PrP^{res} et les co-facteurs sont indépendantes de la structure, ce qui reste peu vraisemblable.

- des expériences récentes de fractionnement des polymères de PrP^{res} en fonction de leur taille montre que l'infectiosité *in vivo* [219, 221, 324] et le pouvoir de conversion *in vitro* [219] d'un polymère donné dépendent de sa taille. De plus, la taille des particules les plus infectieuses semble dépendre de la souche : notamment, une souche rapide semble être caractérisée par des polymères infectieux plus petits que des souches plus lentes [221].

Par conséquent, le premier objectif de notre travail est de généraliser le modèle de polymérisation nucléée pour prendre en compte des propriétés de réplication des agrégats de PrP dépendantes de leur taille, et d'en étudier les conséquences dynamiques sur la réplication des Prions.

Par ailleurs, les mécanismes de multiplication et de dissémination des Prions s'effectuent dans un environnement multicellulaire très hétérogènes. En effet, il existe une hétérogénéité de réplication en fonction des cellules. Par exemple :

- dans un contexte *in vivo*, les Prions se répliquent dans un nombre limité de types cellulaires du système nerveux central et du système lymphoïde (les neurones, les astrocytes, les cellules folliculaires dendritiques et potentiellement certaines populations macrophagiques).

- dans un système simplifié *in vitro*, toutes les cellules présentes au sein d'une même lignée ne répliquent pas les Prions [198]. En outre, les cellules qui accumulent les Prions peuvent présenter, au sein d'une même lignée, des compartiments d'accumulation distincts (épars dans tous le cytoplasme ou concentrés dans des structure de type agrésome [354]).

Malgré cette hétérogénéité, les données expérimentales utilisées pour comprendre les mécanismes de réplication sont souvent des données obtenues à partir d'organes entier ou de groupes de cellules. Moyennées sur toute la population cellulaire, elles ne prennent pas en compte les phénomènes d'hétérogénéité locale. Ces phénomènes locaux sont mieux caractérisés par les outils d'histologie et de cytologie. Toutefois, ces techniques n'ont pas accès à la dynamique ayant conduit à cette hétérogénéité particulière. Dans ce contexte, le deuxième objectif de notre travail est de développer un modèle mathématique permettant d'étudier l'influence de l'hétérogénéité cellulaires sur les mécanismes de réplication.

Deuxième partie

Implication de la dépendance en taille de l'infectiosité des agrégats de PrP

Chapitre 6

Généralisation du modèle de polymérisation nucléée

1 Introduction

De nombreux arguments expérimentaux appuient l'hypothèse de la nature protéique des agents infectieux, tels que la génération d'infectiosité à partir de protéines recombinantes [97], ou encore l'utilisation de techniques *in vitro* de conversion de la PrP^{res} (comme la PMCA) [320]. Toutefois, le mécanisme précis de conversion reste mal caractérisé. De plus, les Prions existent sous forme de différentes souches, caractérisées par une période d'incubation et un profil lésionnel spécifique d'une souche dans un hôte donné. Dans le cadre de l'hypothèse protéique, l'information de souche semble être portée par différentes conformations, qui conduisent à des propriétés biologiques et biochimiques différentes d'une souche à l'autre [104]. La caractérisation du mécanisme de conversion de la PrP^c en PrP^{res}, permettant l'existence de différentes souches au sein d'un même hôte (exprimant la même PrP), reste une question fondamentale pour la compréhension des maladies à Prions.

Comme pour d'autres protéines pouvant s'accumuler dans le cerveau (APP pour la maladie d'Alzheimer, α -synucléine pour la maladie de Parkinson), la PrP^{res} mal conformée a la capacité de polymériser et de former de longs agrégats fibrillaires. *In vivo*, ces agrégats se forment au cours du processus de transconformation, à des échelles de temps et de taille difficilement accessibles expérimentalement. C'est pourquoi de nombreux modèles mathématiques ont été proposés pour mimer la répliation des Prions [299, 305, 314]. Ils sont utiles pour explorer de façon rapide les conséquences d'une hypothèse biologique. Basé sur une agrégation fibrillaire en une dimension, le modèle mathématique de polymérisation nucléée de Masel est le plus complet et le plus accepté à l'heure actuelle [299]. Dans ce modèle, la particule infectieuse est un polymère de PrP^{res}, capable de s'agrandir par ajout d'un monomère de PrP^c, et de se multiplier par fragmentation en deux particules de taille plus petite (voir Figure 6.1). Chaque agrégat de PrP^{res} est en outre supposé avoir les mêmes comportements de répliation indépendamment de sa taille.

Des arguments expérimentaux récents sont en faveur d'une infectiosité dépendant de la taille des agrégats, non prise en compte dans les modèles précédents. Ils sont présentés dans le

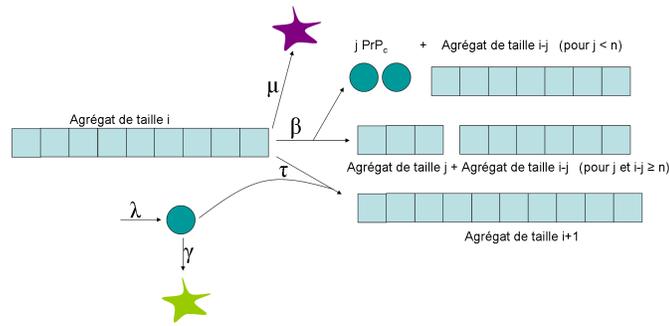


FIG. 6.1 – Mécanisme de polymérisation nucléée de Masel

chapitre précédent (Chapitre 5 5, page 86). Ainsi, l'objectif de notre travail est de généraliser le modèle de polymérisation nucléée de Masel pour prendre en compte une infectiosité dépendante de la taille des agrégats de PrP.

2 Etat de l'art sur le modèle de polymérisation nucléée

De façon plus générale, le modèle de polymérisation nucléée de Masel appartient à la famille bien décrites des modèles dynamiques d'agrégation, de fragmentation et de coagulation initiée par Smoluchowski [355]. Le modèle original proposé par Smoluchowski été introduit pour analyser la coagulation binaire de colloïdes (*i.e.* substances formées de particules très fines, homogènes) se déplaçant selon un mouvement brownien. Par la suite, différentes contraintes physico-chimiques ont été incorporées au modèle (fragmentation, condensation), conduisant à des champs d'application du modèle très variés, comme l'étude des aérosols [356], la formation des planètes en astrophysique [357], la science des polymères ou l'agrégation des plaquettes en hématologie [358]. Le modèle de Masel est également similaire aux modèles structurés en taille de dynamique cellulaire en présence d'une quantité finie de ressources [359–363].

Il existe à l'heure actuelle deux versions du modèle de polymérisation nucléée de Masel : une version discrète en taille [299] et une version continue en taille [305]. Ces deux modèles, ainsi que leurs propriétés connues, sont présentés ci-dessous.

2.1 Le modèle discret

2.1.1 Description du modèle

Le modèle de polymérisation nucléée de Masel a été décrit pour la première fois par M. Nowak et al. [304], puis par J. Masel et al. [299], sous la forme d'un modèle structuré en taille de façon discrète. Il décrit les processus élémentaires suivants (représentés Figure 4.5) :

- le système contient V molécules de PrP^c, générées à taux λ et dégradées à un taux γ .
- le système contient U polymères de PrP^{res}, dégradés à un taux μ . Le nombre de polymères de taille i est noté u_i , la quantité totale de molécules de PrP^{res} contenues dans les agrégats est notée P .

- chaque polymère linéaire de taille i s'agrandit par l'ajout d'un monomère à un taux $\tau = cste$ (*i.e.* le taux de croissance est indépendant de la taille de l'agrégat).

- chaque polymère de taille i peut se fragmenter en deux polymères de tailles inférieures. Le taux de fragmentation d'un polymère de taille i est proportionnel à sa taille, il est donné par $\beta_i = \beta i$ avec $\beta = cste$. En outre, la fragmentation est supposée uniforme sur tous les sites de coupure possibles.

- les particules de PrP^{res} de taille inférieure à une taille critique donnée sont instables et sont fragmentés instantanément en monomères de PrP^{c} . Ce processus est introduit pour prendre en compte l'étape de nucléation, très lente par rapport à l'étape de croissance (ici, l'étape de nucléation est supposée infiniment lente, ne se produisant jamais).

Cette cinétique conduit au système d'équations différentielles ordinaires couplées suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dV(t)}{dt} = \lambda - \gamma V(t) - \sum_{i=1}^{\infty} \tau u_i(t) V(t) + 2\beta \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{\infty} i u_j(t) \\ \frac{du_i(t)}{dt} = -\mu u_i(t) + \tau (u_{i-1}(t) - u_i(t)) V(t) + 2\beta \sum_{j=i+1}^{\infty} u_j(t), \text{ pour } i \geq n, \\ u_i(t) = 0 \text{ sinon.} \end{array} \right. \quad (6.1)$$

Ce système de dimension infinie peut-être réduit par sommation et est décrit par un système de trois équations différentielles [299, 304] :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dV(t)}{dt} = \lambda - \gamma V(t) - \tau U(t) V(t) + n(n-1)\beta U(t), \\ \frac{dU(t)}{dt} = -\mu U(t) + \beta P(t) - (2n-1)\beta U(t), \\ \frac{dP(t)}{dt} = -\mu P(t) + \tau U(t) V(t) - n(n-1)\beta U(t) \end{array} \right. \quad (6.2)$$

avec $U = \sum_i u_i$ la quantité totale de polymères de PrP^{res} et $P = \sum_i i u_i$ la quantité totale de PrP^{res} composant les fibrilles. On appellera par la suite *système microscopique* le système 6.1 (qui définit entièrement la répartition des polymères selon leur taille) et *système macroscopique* le système 6.2 (qui définit la quantité d'infection par deux grandeurs globales, macroscopiques).

2.1.2 Propriétés du système macroscopique

Les propriétés du système 6.2 ont principalement été étudiées numériquement. La figure 6.2 illustre la dynamique de la solution. Initialement, la quantité d'agrégats de PrP^{res} et la quantité totale de PrP^{res} croissent de façon exponentielle. Durant cette phase, la taille moyenne des agrégats augmente rapidement jusqu'à un plateau, et la quantité de PrP^{c} reste à son niveau avant infection. Les particules infectieuses devenant plus nombreuses, la quantité de PrP^{c} commence

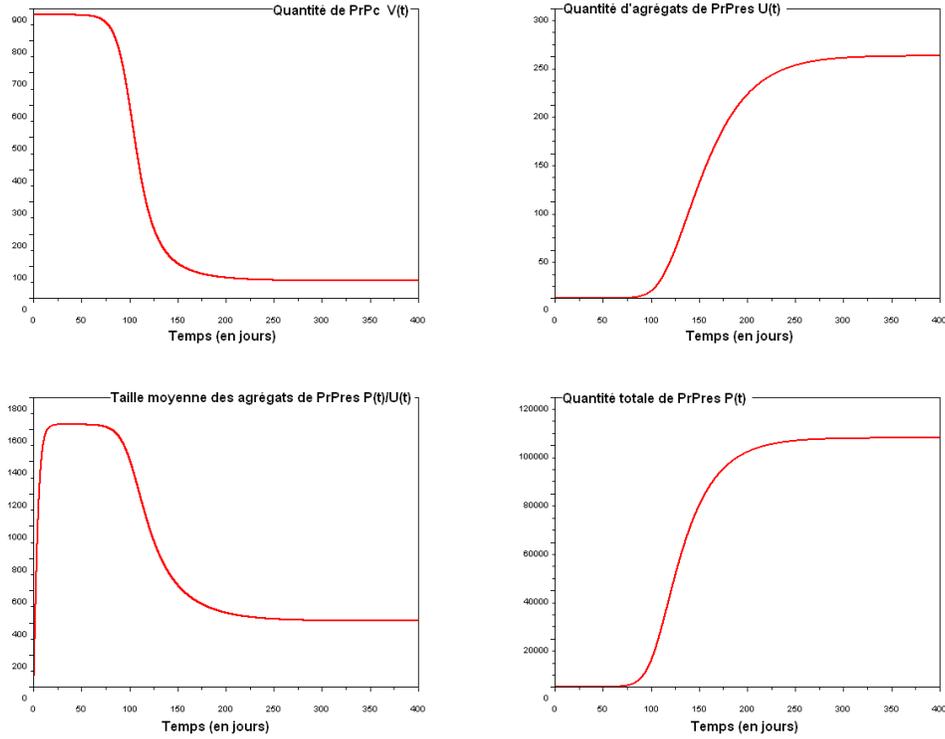


FIG. 6.2 – Dynamique du système de Masel 6.2, obtenue par intégration numérique, avec les paramètres suivant : $\lambda = 4400$ par jour, $\gamma = 5$ par jour, $\mu = 0.04$ par jour, $\beta = 0.0001$ par SAF/sq par jour, $\tau = 0.3$ par SAF/sq par jour et $n = 6$. Les conditions initiales sont données par $V(0) = \lambda/\gamma = 880$, $U(0) = 10^{-4}$ et $P(0) = 20U(0) = 2.10^{-3}$

à diminuer, ce qui ralentit la croissance des agrégats : la taille moyenne diminue. Le système se stabilise ensuite à un état d'équilibre.

Le système de Masel macroscopique 6.2 possède 2 états d'équilibre : l'état sain, caractérisé par l'absence de particules infectieuses, est donné par :

$$\begin{cases} V_{sain} = \lambda/\gamma, \\ U_{sain} = 0, \\ P_{sain} = 0. \end{cases} \quad (6.3)$$

et l'état pathologique par :

$$\begin{cases} V_{infect} = \frac{n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu}{\tau\beta}, \\ U_{infect} = \frac{\lambda\tau\beta - \gamma(n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu)}{\tau\mu(\mu + (2n-1)\beta)}, \\ P_{infect} = \frac{\lambda\tau\beta - \gamma(n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu)}{\tau\beta\mu}. \end{cases} \quad (6.4)$$

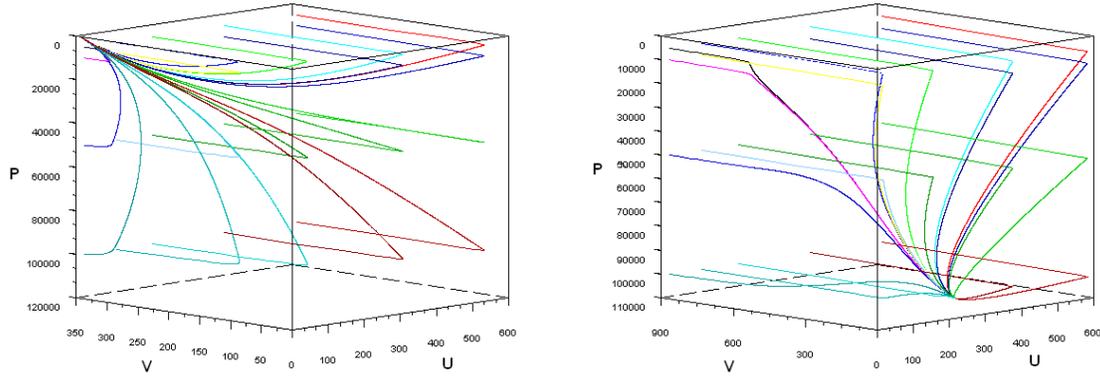


FIG. 6.3 – **Portrait de phase du système 6.2.** Les solutions $(U(t), V(t), P(t))$ correspondant à différentes conditions initiales convergent vers l'état d'équilibre sain globalement stable sous la condition $\frac{\lambda\tau\beta}{\gamma} < n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu$ (gauche) ou vers l'état d'équilibre pathologique globalement stable si $\frac{\lambda\tau\beta}{\gamma} > n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu$ (droite).

Paramètres : (gauche) $\lambda = 2400$ par jour, $\gamma = 7$ par jour, $\mu = 0.1$ par jour, $\beta = 0.00005$ par SAF/sq par jour, $\tau = 0.1$ par SAF/sq par jour et $n = 5$. (droite) $\lambda = 4400$ par jour, $\gamma = 5$ par jour, $\mu = 0.04$ par jour, $\beta = 0.0001$ par SAF/sq par jour, $\tau = 0.3$ par SAF/sq par jour et $n = 5$.

L'état d'équilibre infecté existe seulement si $\frac{\lambda\tau\beta}{\gamma} > n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu$. Le terme de droite représente la perte de particules infectieuses (par dégradation ou fragmentation en polymères instables), le terme de gauche représente la production de particules infectieuses (par agrandissement ou par fragmentation en polymères stables). Cette relation suggère que la quantité de PrP^c est un critère important pour le déclenchement d'une ESST [95]. La quantité critique nécessaire dépend étroitement des paramètres de dégradation, de fragmentation et de croissance des agrégats de PrP^{res} .

Quelques résultats théoriques sur l'existence de solutions ou sur la stabilité des états d'équilibre découlent directement des démonstrations de [305, 364, 365], faites pour un système similaire.

Proposition 1 *Existence, unicité et positivité d'une solution.*

Soient $\lambda, \gamma, \mu, \beta, \tau, n > 0$. Soit $X = \{(U, V, P) \in \mathbb{R}_+^3 : U \geq 0, V \geq 0, P \geq nU\}$. Pour chaque $(U(0), V(0), P(0)) \in X$, il existe une unique solution $(U(t), V(t), P(t))$ au problème 6.2 pour $t \geq 0$. De plus, $(U(t), V(t), P(t)) \in X$ pour tout $t \geq 0$.

Proposition 2 *Stabilité globale de l'état sain.*

Soient $\lambda, \gamma, \mu, \beta, \tau, n > 0$. Soit $X = \{(U, V, P) \in \mathbb{R}_+^3 : U \geq 0, V \geq 0, P \geq nU\}$. L'état d'équilibre sain donné par $V_{\text{sain}} = \lambda/\gamma, U_{\text{sain}} = P_{\text{sain}} = 0$ est globalement stable dans X pour le système 6.2 si $\frac{\lambda\tau\beta}{\gamma} < n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu$.

Proposition 3 *Stabilité globale de l'état pathologique*

Soient $\lambda, \gamma, \mu, \beta, \tau, n > 0$. Soit $X = \{(U, V, P) \in \mathbb{R}_+^3 : U \geq 0, V \geq 0, P \geq nU\}$. L'état d'équilibre pathologique donné par 6.4 est globalement stable dans X pour le système 6.2 si

$$\frac{\lambda\tau\beta}{\gamma} > n(n-1)\beta^2 + \mu^2 + (2n-1)\beta\mu.$$

2.1.3 Propriétés du système microscopique

Le système microscopique 6.1 de dimension infinie présente l'avantage important de renseigner sur la dynamique de toutes les espèces polymériques intervenant dans le processus de polymérisation des Prions. La figure 6.4 montre la dynamique de la distribution en taille des agrégats de PrP^{res} au cours du processus d'infection. Initialement, une distribution étroite de petits agrégats est inoculée. Au début de l'infection, cette distribution s'élargit vers les grandes tailles jusqu'à ce que les agrégats atteignent une taille critique où la fragmentation devient prépondérante sur la croissance. La taille moyenne des agrégats se stabilise alors, puis commence à décroître. En effet, la croissance des agrégats diminue au fur et à mesure de la consommation de la PrP^{c} , et la distribution en taille des agrégats se redécalle vers les petits agrégats. A l'équilibre, la distribution en taille des agrégats de PrP^{res} est étroite, située sur les agrégats de petites tailles. Elle est peu sensible à des variations de paramètres [343].

L'existence d'un état d'équilibre stable de la distribution en taille des agrégats est démontrée dans [301]. Cet état est défini itérativement par la relation suivante :

$$\tilde{u}_i = \frac{q_i - q_{i+1}}{q_n} \text{ avec } q_k = \left(k + \frac{\mu + \beta}{\beta}\right) e^{\frac{-\beta}{2\tau V_{\text{infect}}}\left(k + \frac{\mu + \beta}{\beta}\right)^2}$$

où \tilde{u}_i représente la proportion d'agrégats de taille i (distribution normalisée) et V_{infect} la quantité de PrP^{c} à l'équilibre.

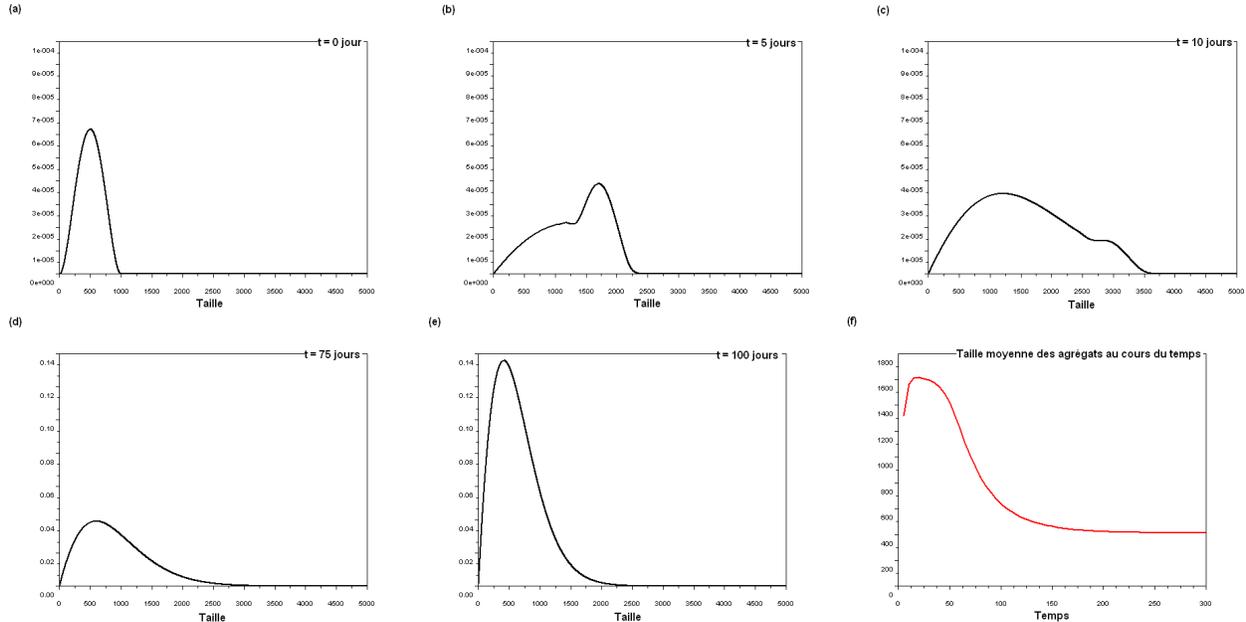


FIG. 6.4 – Dynamique du modèle de Masel microscopique. (a-e) Distribution en taille des agrégats de PrP^{res} à différents temps. (f) Evolution temporelle de la taille moyenne des agrégats. Les paramètres utilisés pour la simulation numérique sont extraits de [299] : $\lambda = 4400 \text{ jour}^{-1}$, $\gamma = 5 \text{ jour}^{-1}$, $\mu = 0.04 \text{ jour}^{-1}$, $\beta = 0.0001 \text{ SAF}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, $\tau = 0.3 \text{ SAF}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ et $n = 6$

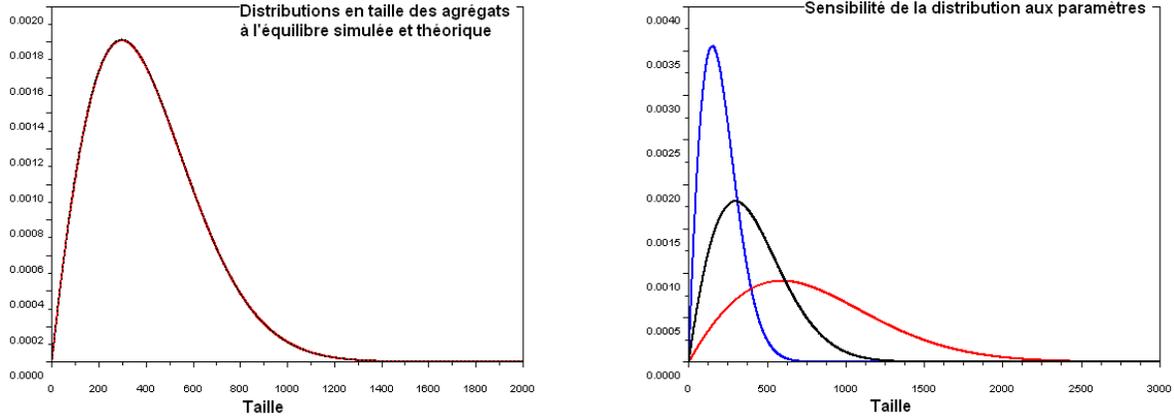


FIG. 6.5 – **Etat d'équilibre du système microscopique.** (*gauche*) Correspondance entre la distribution théorique obtenue par Pöschel (courbe en pointillés noirs) et la distribution obtenue par intégration numérique du modèle de Masel (courbe rouge). (*droite*) Sensibilité de la distribution en taille des agrégats à l'équilibre à des variations modérées de paramètres : chaque paramètre est divisé par 2 à tour de rôle. La distribution ne varie que pour une modification du taux de fragmentation (courbe rouge) et une modification du taux de dégradation de la PrP^{res} (courbe bleue). Dans les autres cas ($\lambda/2$, $\gamma/2$ et $\tau/2$), les distributions sont confondues avec la distribution de référence (courbe noire).

Les paramètres de référence utilisés sont extraits de [299] : $\lambda = 4400 \text{ jour}^{-1}$, $\gamma = 5 \text{ jour}^{-1}$, $\mu = 0.04 \text{ jour}^{-1}$, $\beta = 0.0001 \text{ SAF}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, $\tau = 0.3 \text{ SAF}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ et $n = 6$

2.2 Le modèle continu

Les espèces intervenant dans le processus de polymérisation sont des entités discrètes, ainsi le modèle de Masel à taille discrète est le modèle le plus naturel au sens biologique. Néanmoins, cette formulation aboutit à un système d'équations différentielles ordinaires (EDO) de dimension infinie. Pour s'affranchir de la dimension infinie sans perdre l'information sur la distribution en taille des agrégats de PrP et bénéficier d'un cadre théorique très développé, Greer a introduit une version continue du modèle de Masel discret, où la taille des fibrilles de PrP^{res} est modélisée par une variable continue x [305].

2.2.1 Description du modèle

Le modèle continu décrit les mêmes processus biologiques de polymérisation et fragmentation des Prions que le modèle de Masel discret (avec les mêmes propriétés de répllication indépendantes de la taille des agrégats de PrP^{res}); il consiste en une équation différentielle ordinaire (EDO) couplée cette fois à une équation aux dérivées partielles (EDP) :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dV(t)}{dt} = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t) \int_{x_0}^{\infty} \tau u(t, x) dx + 2 \int_0^{x_0} x \int_{x_0}^{\infty} \beta y \kappa(x, y) u(t, y) dy dx, \\ \frac{\partial u(t, x)}{\partial t} = -V(t) \tau \frac{\partial u(t, x)}{\partial x} - (\mu + \beta x) u(t, x) + 2 \int_x^{\infty} \beta y \kappa(x, y) u(t, y) dy, \\ u(t, x_0) = 0, u(0, x) = u_0(x) \geq 0, V(0) \geq 0. \end{array} \right. \quad (6.5)$$

avec $V(t)$ la quantité de PrP^c au temps t , $u(t, x)$ la densité de polymères de PrP^{res} de taille x au temps t , $t \geq 0$ et $0 < x_0 \leq x < \infty$. Le noyau de fragmentation $\kappa(x, y)$ donne la probabilité qu'un polymère de taille y qui se fragmente, se fragmente en un polymère de taille x et un de taille $y - x$. Il doit satisfaire les propriétés de conservation de la masse suivantes :

$$\int_0^y \kappa(x, y) dx = 1 \text{ et } \int_0^y x \kappa(x, y) dx = y/2. \quad (6.6)$$

Il est donné par $\kappa(x, y) = 1/y$, qui signifie (comme pour le modèle discret) que la fragmentation est uniformément répartie sur toute la longueur de l'agrégat de PrP^{res} .

Récemment, ce modèle a été complexifié par l'ajout de molécules chaperonnes participant à la dégradation des Prions [366] ou par l'ajout d'association possible entre deux polymères [367].

2.2.2 Propriétés du système

Le système EDP 6.5 peut se ramener par sommation à un système de trois équations différentielles ordinaires, similaires au système macroscopique discret en taille :

$$\begin{cases} \frac{dV(t)}{dt} = \lambda - \gamma V(t) - \tau U(t)V(t) + \beta x_0^2 U(t), \\ \frac{dU(t)}{dt} = -\mu U(t) + \beta P(t) - 2\beta x_0 U(t), \\ \frac{dP(t)}{dt} = -\mu P(t) + \tau U(t)V(t) - \beta x_0^2 U(t) \end{cases} \quad (6.7)$$

avec $U(t) = \int_{x_0}^{\infty} u(t, x) dx$ la quantité totale de fibrilles de PrP^{res} et $P(t) = \int_{x_0}^{\infty} x u(t, x) dx$ la quantité totale PrP^{res} . L'existence et l'unicité d'une solution positive de ce système est établie dans [305], ce qui permet de découpler le système 6.5, puisque $V(t)$ est connue pour tout $t \geq 0$.

Le système EDO 6.7 comme le système EDP 6.5 possèdent un état d'équilibre sain et un état d'équilibre infecté. Le comportement asymptotique du modèle EDO est étudié dans [305] : la stabilité globale de l'état sain et la stabilité locale de l'état infecté ont été montrées. Les résultats concernant l'état pathologique ont été améliorés dans [364] en stabilité globale. L'existence d'une solution au système EDP a été montrée dans [365]. Cette solution converge soit vers l'état d'équilibre sain, soit vers l'état d'équilibre pathologique selon la condition :

$$x_0 \beta + \mu < \sqrt{\lambda \beta \tau / \gamma}$$

Les hypothèses de paramètres de réplication constants ont été relâchées dans [368]. L'existence et l'unicité d'une solution au problème général a été démontrée sous les conditions τ indépendant de la taille du fibrille, κ général satisfaisant aux lois 6.6 de conservation de la masse et β et μ des fonctions arbitraires de x , bornées. Dans le cas non borné, il existe des solutions faibles. De la même façon, l'existence et l'unicité d'une solution (au sens classique ou au sens faible si les coefficients sont bornés ou non) est établie pour un taux d'élongation τ indépendant de la taille du fibrille [369, 370]. Dans tous les cas, l'état d'équilibre sain est

globalement stable [368–370]. Il est toutefois à noter que dans le cas non constant, l'existence d'un état d'équilibre pathologique reste un problème non résolu.

3 Taux d'élongation dépendant de la taille des agrégats

Dans cette section, nous généralisons les modèles de polymérisation nucléée discret et continu en taille, pour intégrer le caractère infectieux taille-dépendant. Dans les modèles mathématiques, l'infectiosité est un équilibre entre trois processus élémentaires, à savoir la fragmentation des Prions, leur élongation et leur dégradation, qui peuvent toutes les trois dépendre de la taille des polymères. Toutefois, le modèle général reste complexe à étudier. Après présentation des modèles généraux, nous nous intéressons uniquement au cas d'un taux d'élongation τ non constant. En effet, les connaissances sur les propriétés des agrégats restent insuffisantes à l'heure actuelle pour étudier différentes lois de fragmentation et pour dissocier les mécanismes élémentaires impliqués dans la répllication. En outre, τ semble être la mesure la plus directe du pouvoir convertisseur d'un polymère de taille donné, pour lequel il a récemment été démontré qu'il dépendait de la taille du polymère [219]. Les autres coefficients sont choisis, comme pour les modèles précédents.

3.1 Généralisation du modèle discret

3.1.1 Notations

$$\mathbf{U} = (u_1, \dots, u_N)^T \in \mathbb{R}^N$$

$$U = \sum_{i=1}^N u_i$$

Soit $\mathbf{U}, \mathbf{V} \in \mathbb{R}^N$, on note :

$\mathbf{U} < \mathbf{V}$ (resp. \leq) si $u_i < v_i$ (resp. \leq), $1 \leq i \leq N$.

$\mathbf{U} > \mathbf{V}$ (resp. \geq) si $u_i > v_i$ (resp. \geq), $1 \leq i \leq N$.

Soit $\mathbf{A} \in \mathcal{M}^N(\mathbb{R})$, on note $\mathbf{A} \geq 0$ si $A_{i,j} \geq 0$, $1 \leq i, j \leq N$,

$\langle x, y \rangle = \sum_i x_i y_i$ est le produit scalaire canonique de \mathbb{R}^n .

3.1.2 Description du modèle généralisé discret

Le système de Masel discret généralisé est donné par :

$$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = \lambda - \gamma V - V \sum_{i=n_0}^N \tau_i u_i + 2 \sum_{i=1}^{n_0-1} i \sum_{j>i} \beta_j \kappa_{i,j} u_j, \\ \frac{du_i}{dt} = -\mu_i u_i - \beta_i u_i + V(\tau_{i-1} u_{i-1} - \tau_i u_i) + 2 \sum_{j>i} \beta_j \kappa_{i,j} u_j, \quad (n_0 \leq i). \end{cases} \quad (6.8)$$

où toutes les constantes sont positives. V correspond à la quantité de PrP^c dans le système et u_i correspond à la quantité d'agrégats de taille i . λ et γ représentent respectivement les taux

de production et de dégradation de la PrP^c , μ_i le coefficient de dégradation des agrégats de PrP^{res} de taille i , β_i le coefficient de fragmentation des agrégats de PrP^{res} de taille i et $\kappa_{i,j}$ la probabilité qu'un agrégat de taille j qui se fragmente, se fragmente en un agrégat de taille i et un agrégat de taille $j - i$. Le coefficient d'élongation des agrégats de taille i est donné par τ_i .

Hypothèses sur les coefficients. Dans sa généralité, ce système est complexe à étudier. Pour la suite, nous nous intéressons uniquement au cas d'un taux d'élongation taille-dépendant. Les autres paramètres sont choisis comme pour le cas à coefficient constant (*i.e.* un taux de dégradation indépendante de la taille de l'agrégat, et un taux de fragmentation proportionnel à la taille de l'agrégat, uniformément répartie sur toute sa longueur) :

$$\mu_i = \mu, \beta_i = \beta, \kappa_{i,j} = 1/j$$

En outre, le paramètre n_0 avait été introduit initialement pour séparer la phase de nucléation très lente et la phase de polymérisation, plus rapide [299]. Cette distinction peut maintenant être prise en compte grâce à un taux d'élongation spécifique de chaque taille. Aussi, par soucis de simplicité, nous supposons par la suite que la taille minimale critique n_0 est égale à 1.

Le système est alors donné par :

$$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = \lambda - \gamma V - V \sum_{i=n_0}^N \tau_i u_i \\ \frac{du_i}{dt} = -\mu u_i - \beta_i u_i + V(\tau_{i-1} u_{i-1} - \tau_i u_i) + 2\beta \sum_{j>i} u_j, \quad (1 \leq i). \end{cases} \quad (6.9)$$

Réduction de la dimension du système et mise sous forme matricielle. Contrairement au modèle à paramètres constants, ce système de dimension infinie ne peut pas être réduit par sommation à un système fini de 3 équations différentielles ordinaires. Toutefois, en pratique, le nombre d'agrégats d'une taille donnée devient quasiment nul (la fragmentation compense l'élongation). Il est donc possible de se ramener à un système de dimension finie, en négligeant les agrégats de taille supérieure à une taille donnée N . Le système 6.9 est alors donné par :

$$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = \lambda - \gamma V - V \sum_{i=n_0}^N \tau_i u_i \\ \frac{du_i}{dt} = -\mu u_i - \beta(i-1)u_i + V(\tau_{i-1} u_{i-1} - \tau_i u_i) + 2\beta \sum_{j>i} u_j, \quad (1 \leq i < N) \\ \frac{du_N}{dt} = -\mu u_N - \beta(N-1)u_N + V\tau_{N-1} u_{N-1}. \end{cases} \quad (6.10)$$

L'équation supplémentaire sur u_N permet de rendre le système conservatif (*i.e.* pas de fuite de matière vers les agrégats de taille $i > N$), contrairement au système tronqué, dissipatif. Biologiquement, le système tronqué revient à faire l'hypothèse qu'à partir d'une taille donnée, les agrégats de PrP^{res} sont complètement inertes et ne participent plus au mécanisme de polymérisation/fragmentation. Le modèle conservatif (6.10) suppose que les agrégats de taille N

ne participent plus à la réaction de conversion (*i.e.* ne peuvent plus s'agrandir), mais peuvent encore se fragmenter pour alimenter les compartiments infectieux. Ce dernier cas intègre la possibilité pour les gros agrégats amyloïdes, inertes pour la conversion, de constituer un réservoir d'oligomères solubles infectieux. En outre, nous supposons également que $\tau_i > 0$ pour tout $n_0 \leq i < N$ (quitte à choisir N plus petit).

Mis sous forme matricielle, le système (6.10) est donnée par :

$$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = \lambda - \gamma V - V \sum_{i=n_0}^N \tau_i u_i \\ \frac{d\mathbf{U}}{dt} = \mathbf{M}_V(t)\mathbf{U}(t). \end{cases} \quad (6.11)$$

avec :

$$\mathbf{U}(t) = (u_1(t), \dots, u_N(t))^T,$$

$$\mathbf{M}_V(t) = \mathbf{A}^{(1)} + V(t)\mathbf{A}^{(2)}$$

$\mathbf{A}^{(1)}$ la matrice triangulaire supérieure, avec pour éléments diagonaux $\mathbf{A}_{i,i}^{(1)} = -\mu - \beta(i-1)$ et pour éléments non diagonaux $\mathbf{A}_{i,j}^{(1)} = 2\beta$, $j > i$,

$\mathbf{A}^{(2)}$ la matrice, avec pour seuls éléments non nuls $\mathbf{A}_{i,i}^{(2)} = -\tau_i$ pour $1 \leq i < N$ et $\mathbf{A}_{i,i-1}^{(2)} = \tau_{i-1}$ pour $2 \leq i \leq N$ (il est à noter que $\mathbf{A}_{N,N}^{(2)} = 0$),

$V(0) = V^0 > 0$ et $\mathbf{U}(0) = \mathbf{U}^0 \geq \mathbf{0}$ les conditions initiales, supposées connues.

3.1.3 Existence d'une solution positive

Le problème (6.10) est un problème de Cauchy pour un système différentiel d'ordre $N+1$. L'existence locale de la solution et son unicité est assurée par le théorème de Cauchy-Lipschitz puisque le second membre est une fonction C^1 de (\mathbf{U}, V) . Nous établissons ci-dessous l'existence globale de la solution, qui de plus reste positive.

Proposition 4 *Positivité de la solution*

Soit $(\mathbf{U}(t), V(t))$ une solution du système (6.10) définie sur un intervalle $[0, T]$ alors $\mathbf{U}(t) > \mathbf{0}$ et $V(t) > 0$

Proposition 5 *Existence de la solution*

La solution du système (6.10) existe pour tout $t \geq 0$.

Preuve de la proposition 4

Pour $t = 0$ la solution est positive par hypothèse.

Soit t_0 la plus petite valeur de t pour laquelle une composante de $\mathbf{U}(t)$ s'annule. $V(t)$ est solution d'une équation du premier ordre que nous réécrivons sous la forme

$$\frac{dV}{dt} = -(\gamma - \sum_i \tau_i U_i(t))V(t) + f(t)$$

avec, pour $t \in [0, T]$,

$$f(t) = \lambda > 0$$

La solution de cette équation s'écrit

$$V(t) = V(0) \exp\left(-\gamma t - \int_0^t \sum_i \tau_i U_i(t) dx\right) + \int_0^t \exp\left(-\gamma(\theta - t) - \int_\theta^t \sum_i \tau_i U_i(t) dx\right) f(\theta) d\theta$$

Tous les termes de cette expression sont positifs, donc $V(t) > 0$.

Montrons que l'on peut en déduire $\mathbf{U}(t) > 0$ sur $[0, t_0]$, contrairement aux hypothèses.

On peut réécrire le système linéaire dont \mathbf{U} est solution sous la forme

$$\frac{d\mathbf{U}}{dt} = (\mathbf{M}_V + \theta\mathbf{I})\mathbf{U} - \theta\mathbf{U}$$

Les coefficients extradiagonaux de la matrice \mathbf{M}_V étant positif ou nul, en choisissant θ assez grand, on a $\mathbf{M}_V + \theta\mathbf{I} \geq 0$, la diagonale étant strictement positive. Le vecteur $\mathbf{X} = \exp(\theta t)\mathbf{U}$ est solution du système

$$\frac{d\mathbf{X}}{dt} = (\mathbf{M}_V + \theta\mathbf{I})\mathbf{X}$$

avec $\mathbf{X}(0) = \mathbf{U}(0) \geq 0$.

Notons $D_{i,i}$ les coefficients diagonaux de la matrice $\mathbf{M}_V + \theta\mathbf{I}$. Soit $[0, t_0]$ le plus grand intervalle sur lequel toutes les composantes de $\mathbf{X}(t)$ sont positives. De l'inégalité

$$\frac{dX_i}{dt} \geq D_{i,i}X_i$$

il résulte (si t_0 est fini) que $X_i(t_0) > X_i(0) > 0$ et donc que $\mathbf{X}(t)$ reste strictement positif pour $t = t_0$, contrairement à l'hypothèse initiale.

◇

Preuve de la proposition 5

Soit D la matrice diagonale telle que

$$D_{i,i} = \mu + \beta i$$

et \mathbf{S}_V la matrice définie par

$$\mathbf{S}_V = \mathbf{D} - \frac{V}{2}(\mathbf{B} + \mathbf{B}^T)$$

On pose $\mathbf{C}_1 = (1, \dots, 1)^T \in \mathbb{R}^N$, il vient

$$\frac{\mathbf{M}_V + \mathbf{M}_V^T}{2} = -\mathbf{S}_V + \beta\mathbf{C}_1 \otimes \mathbf{C}_1$$

D'où

$$\frac{1}{2} \frac{d}{dt} \langle \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle = \left\langle \frac{d}{dt} \mathbf{U}, \mathbf{U} \right\rangle = \langle \mathbf{M}_V \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle = -\langle \mathbf{S}_V \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle + \beta \langle \mathbf{C}_1, \mathbf{U} \rangle^2$$

D'après la proposition 4, $V \geq 0$. La matrice S_V est alors définie positive car

$$\langle \mathbf{S}_V \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle = \sum_i D_{i,i} u_i^2 + \frac{1}{2} V \sum_{i=1}^{N-1} \tau_i (u_i - u_{i+1})^2$$

On en déduit que

$$\frac{1}{2} \frac{d}{dt} \langle \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle \leq \beta \langle \mathbf{C}_1, \mathbf{U} \rangle^2$$

Comme $\langle \mathbf{C}_1, \mathbf{U} \rangle^2 \leq N \langle \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle$ par l'inégalité de Cauchy-Schwarz il vient

$$\frac{1}{2} \frac{d}{dt} \langle \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle \leq \beta N \langle \mathbf{U}, \mathbf{U} \rangle^2$$

et donc

$$\langle \mathbf{U}(t), \mathbf{U}(t) \rangle \leq \langle \mathbf{U}(0), \mathbf{U}(0) \rangle \exp(2\beta N t) \quad (6.12)$$

La solution de (6.10) est bornée sur tout intervalle fini et peut donc être prolongée sur tout \mathbb{R} .
 \diamond

3.2 Généralisation du modèle continu

Cette section fait l'objet de deux articles présentés par la suite, seuls les principaux résultats sont donc présentés ici.

3.2.1 Description du modèle continu généralisé

Avec des coefficients dépendants de la taille des agrégats, le modèle continu généralisé est le suivant :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} V(t) = \lambda - V(t) \left(\gamma + \int_{x_0}^{\infty} \tau(x) u(x, t) dx \right) + 2 \int_0^{x_0} x \int_x^{\infty} \beta(y) \kappa(x, y) u(y, t) dy dx, \\ \frac{\partial}{\partial t} u(x, t) = -V(t) \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x) u(x, t)) - [\mu(x) + \beta(x)] u(x, t) + 2 \int_x^{\infty} \beta(y) \kappa(x, y) u(y, t) dy, \\ u(x_0, t) = 0, \end{cases} \quad (6.13)$$

avec des conditions initiales adaptées (par exemple, $V_0 = \lambda/\gamma$ et $u_0(x)$ une perturbation de l'état sain induite par inoculation de PrP^{res}). La quantité de PrP^c disponible pour la conversion est donnée par $V(t)$ et la quantité de polymères de PrP^{res} de taille x est donnée par $u(x, t)$. Les paramètres λ et γ représentent respectivement les taux de production et de dégradation de la PrP^c et $\mu(x)$ le taux de dégradation de la PrP^{res}. Le paramètre $x_0 \geq 0$ correspond à la taille minimale des agrégats de PrP^{res} infectieux, dont la valeur est inconnue. Toutefois, expérimentalement, aucun monomère de PrP^{res} n'a été observé, et les petits agrégats de taille inférieure à 5 ou 6 monomères semblent non infectieux [219]. Le passage au continu suppose que la taille d'un monomère de PrP^c est infiniment petite, et donc x_0 étant de l'ordre de quelques monomères, il sera souvent négligé par la suite (*i.e.* $x_0 = 0$).

Le terme de transport $V(t) \frac{\partial}{\partial x}(\tau(x)u(x,t))$ représente la croissance des polymères de PrP^{res} par fixation et conversion de la PrP^{c} . La taille augmente avec un taux d'extension $V(t)\tau(x)$, proportionnel au nombre de molécules de PrP^{c} disponibles $V(t)$, avec une capacité de conversion $\tau(x)$ dépendant la taille du polymère. Le taux de fragmentation d'un polymère de taille y est donné par $\beta(y) > 0$. La répartition en deux fragments de taille inférieure x et $y - x$ est donnée par $\kappa(x, y) \geq 0$. Elle doit satisfaire deux lois de conservations classiques signifiant que le nombre de polymères augmente au moment de la fragmentation, mais que le nombre total de molécules de PrP reste inchangé :

$$\int_0^y \kappa(x, y) dx = 1, \quad \int_0^y x \kappa(x, y) dx = \frac{y}{2}. \quad (6.14)$$

Hypothèses sur les coefficients. Comme précédemment, pour réduire la complexité du modèle (6.13), nous nous sommes principalement intéressés à l'étude d'un taux de conversion $\tau(x)$ non constant, les autres paramètres étant supposés indépendants de la taille des polymères. Le taux de fragmentation est supposé proportionnel à la taille du polymère et le taux de dégradation est indépendant de la taille :

$$\beta(x) = \beta_0 x, \quad \mu(x) \equiv \mu_0, \quad (6.15)$$

et la fragmentation est supposée uniformément répartie sur toute la longueur de l'agrégat :

$$\kappa(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{si } y \leq x_0 \text{ ou } y \leq x \\ 1/y & \text{si } y > x_0 \text{ et } 0 < x < y. \end{cases} \quad (6.16)$$

L'existence et l'unicité d'une solution faible est démontrée dans [368–370]. Nous nous intéressons par la suite à l'étude de la stabilité des états d'équilibre, qui peuvent renseigner sur les conditions nécessaires au déclenchement d'une ESST.

3.2.2 Conditions de déclenchements des ESST

Le modèle de polymérisation nucléée généralisé possède deux états d'équilibre possible : un état d'équilibre correspondant à l'état sain sans infection (donné par $(\bar{V} = \frac{\lambda}{\gamma}, \bar{u} \equiv 0)$) et un état d'équilibre correspondant au régime infecté résultant de la compétition entre la fragmentation et la polymérisation, limitée par un nombre fini de ressource (*i.e.* la PrP^{c}). Il est montré dans l'article 1 que cet état d'équilibre (noté (V_∞, u_∞)) ne peut exister que sous la condition :

$$\gamma V_\infty < \lambda, \quad (\text{équivalent à } V_\infty < \bar{V}). \quad (6.17)$$

Cette condition reste difficile à interpréter biologiquement, dans la mesure où le niveau de PrP^{c} V_∞ dépend de manière complexe des paramètres cinétiques de réplication. Toutefois, elle indique que la quantité de précurseur produite au cours du temps doit être suffisante pour autoriser le déclenchement d'une ESST.

La stabilité de l'état d'équilibre sain (lorsque l'état d'équilibre infecté n'existe pas) est étudiée sous des conditions très générales dans l'article 1 à l'aide d'une méthode duale et de la théorie de l'entropie relative généralisée, introduite récemment pour étudier les équations

Hypothèses mathématiques	Interprétation biologique
(1) - Article n°1. Stabilité locale de l'état sain. <i>L'injection d'une faible quantité de PrP^{res} (étiologie infectieuse) et/ou une légère altération du métabolisme de la PrP^c (étiologie sporadique) ne suffisent pas à déclencher une ESST.</i>	
(a) $\bar{V} < V_\infty$ (i.e. l'état d'équilibre infecté n'existe pas)	Cette condition dépend de tous les paramètres du modèle. Néanmoins, elle est généralement vérifiée lorsque la quantité de PrP ^c est faible (peu de production ou forte dégradation).
(b) $\Lambda(V)$ est une fonction décroissante de V	En régime continu, la vitesse d'accumulation de la PrP ^{res} est d'autant plus grande que la quantité de PrP ^c est importante
(c) $\exists K_1 > 0, \left \tau(x) \frac{\partial}{\partial x} \bar{\varphi}(x) \right \leq K_1 \bar{\varphi}(x)$	Le pouvoir de conversion des agrégats pour une taille donnée n'est pas infini (i.e. les étapes de fixation et/ou de conversion de la PrP ^c par la PrP ^{res} ne sont pas instantannées). De plus, pour les petites tailles d'agrégats, il est supposé très faible, voir nul. Cette dernière hypothèse est compatible avec le mécanisme de polymérisation nucléée complet (nucléation+élongation), où l'étape de nucléation est très lente.
(d) $\exists K_2 > 0, \tau(x) \leq K_2 \bar{\varphi}(x)$	
(2) - Article n°1. Stabilité globale de l'état sain. <i>L'injection d'une quantité quelconque de PrP^{res} (étiologie infectieuse) et/ou une altération du métabolisme de la PrP^c (étiologie sporadique) ne suffisent pas à déclencher une ESST.</i>	
Hypothèses (1) +	Le pouvoir de conversion des petits agrégats, supposé devenir nul lorsque la taille diminue, ne doit pas devenir nul trop rapidement.
(a) $\exists k > 0, \tau(x) \leq k \bar{\varphi}(x)$	La vitesse de décroissance de ce pouvoir de conversion imposée par cette condition n'est pas interprétable biologiquement.
(b) $\frac{\bar{V}}{\Lambda(V)} \ll \frac{k}{K_1 K_2}$?
(3) - Article n°1. Persistance "locale" de l'état infecté. <i>Lorsqu'une quantité de PrP^{res} est inoculée, l'individu conserve un niveau d'infection non nul, au moins pendant une durée relativement importante (infection subaiguë).</i>	
Hypothèses (1b, 1c et 1d) +	Cette condition dépend de tous les paramètres du modèle. Néanmoins, elle est généralement vérifiée lorsque la quantité de PrP ^c est importante (production élevée ou faible dégradation).
(a) $\bar{V} > V_\infty$ (i.e. l'état d'équilibre infecté existe)	
(4) - Article n°1. Persistance globale de l'état infecté. <i>Lorsqu'une quantité de PrP^{res} est inoculée, l'individu conserve définitivement un niveau d'infection non nul (infection chronique)</i>	
Hypothèses (3) +	?
(a) $K_1 \bar{V} < \Lambda(V) + \gamma$	
(b) $V(0) \leq \bar{V}$	La quantité de PrP ^c n'est pas modifiée au moment de l'inoculation de PrP ^{res} (i.e. pas de PrP ^c inoculée ou dilution très rapide de cette PrP ^c , ne modifiant pas la quantité de PrP ^c des sites de réplication)
(5) - Article n°2. Persistance globale de l'état infecté. <i>Lorsqu'une quantité de PrP^{res} est inoculée, l'individu conserve définitivement un niveau d'infection non nul (infection chronique)</i>	
Hypothèses (3), (4b) +	La quantité de polymères de PrP ^{res} , ainsi que leur taille, est limitée.
(a) $\int_0^\infty (1+x)u(t,x)dx$ est borné uniformément	

TAB. 6.1 – Conditions de déclenchement d'une ESST, avec les notations introduites dans l'article 1.

de transport en biologie [359]. La question de la persistance de l'infection (*i.e.* la quantité de $\text{PrP}^{\text{res}} u(x, t)$ reste non nulle) dans le cas où l'état d'équilibre infecté peut exister est démontrée dans l'article 1 sous des conditions très fortes, qui sont ensuite relâchées dans l'article 2. Ces études de stabilité ont été réalisées par B. Perthame et V. Calvez, co-auteurs des articles, c'est pourquoi nous ne développons pas ici les détails des techniques utilisées. En revanche, le tableau 6.1 résume les hypothèses mathématiques effectuées pour démontrer chaque résultat, et lorsque c'est possible, l'interprétation biologique de ces hypothèses.

4 Liens entre les modèles discrets et continus

4.1 Comparaison des deux approches

Nous avons généralisé à la fois les modèles de polymérisation nucléée discret et continu en taille, car les deux approches sont très complémentaires.

Le modèle de polymérisation discret en taille est le modèle le plus naturel, de part la nature intrinsèquement discrète des entités intervenant dans le processus de polymérisation des Prions (*i.e.* une molécule de PrP). Ce type de modèle a essentiellement été étudié via des simulations numériques, pour interpréter biologiquement la dynamique du modèle (estimation des paramètres cinétiques [299, 316], optimisation de la PMCA [343] ou encore comparaison des mesures expérimentales d'infectiosité [348]). Toutefois, ce formalisme discret ne bénéficie pas d'un cadre théorique très développé (au moins dans le cadre du modèle Prion) permettant de s'assurer de la validité des simulations numériques effectuées (en particulier, intervalle de paramètres pour lesquels le comportement numérique observé est valide).

Au contraire, le modèle continu permet une analyse théorique beaucoup plus générale. Il offre un cadre d'étude important, notamment avec les théories récentes sur l'entropie générale relative (EGR) [359]. En terme numérique, le modèle continu offre également un intérêt important, dans le sens où il permet d'étudier la répartition complète des espèces présentes selon leur taille, sans être obligé de suivre précisément toutes ces espèces : la discrétisation nécessaire à l'intégration numérique du modèle (par des différences finies notamment) n'implique pas nécessairement un maillage correspondant à la taille unité. En revanche, l'interprétation biologique des analyses théoriques reste encore limitée. En effet, les différentes démonstrations (sur l'existence d'une solution ou la stabilité des états d'équilibre) reposent souvent sur des conditions très techniques, faisant intervenir des grandeurs n'ayant pas d'équivalent biologique réel, et dont la pertinence est souvent difficile à établir. En outre, le passage d'un modèle discret à un modèle continu se justifie par dérivation asymptotique pour des modèles similaires de fragmentation-coagulation [360, 371]. Un passage à la limite du modèle discret généralisé a récemment été effectué par M. Doumic et al. [372] et révèle que le modèle généralisé continu présenté ici est équivalent au modèle discret dans une grande majorité des cas, ce qui valide le recours à ce modèle. Toutefois, pour des ordres de grandeurs particuliers, le modèle continu peut être différent du modèle défini ici, contrairement au modèle discret toujours valable. L'analyse conjointe des deux modèles est donc nécessaire.

4.2 Validation des hypothèses du modèle continu par le modèle discret

Les approches discrète et continue sont très complémentaires dans leurs applications (étude "biologique" versus analyse théorique), mais font également appel à des outils théoriques très différents, qui peuvent s'enrichir mutuellement. En effet, pour démontrer la stabilité des états d'équilibre à partir du modèle continu, il est nécessaire de supposer que la valeur propre dominante du système (qui représente la vitesse d'accumulation de la PrP^{res}) est une fonction décroissante de la quantité de PrP^{c} . Des exemples sont donnés dans l'article 1, montrant que cette hypothèse est valide pour des choix de coefficients taille-dépendants particuliers. Toutefois, le cas général reste à démontrer. Nous montrons dans cette section que la valeur propre dominante du système discret (qui représente l'opposé de la valeur propre dominante du système continu telle qu'elle est définie dans l'article 1) est une fonction croissante de la quantité de PrP^{c} .

4.2.1 Etude des valeurs propres de la matrice \mathbf{M}_V

Rappelons que le système discret généralisé à taux d'élongation taille-dépendant est donné par :

$$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = \lambda - \gamma V - V \sum_{i=n_0}^N \tau_i u_i \\ \frac{d\mathbf{U}}{dt} = \mathbf{M}_V(t)\mathbf{U}(t). \end{cases}$$

avec :

$$\mathbf{U}(t) = (u_1(t), \dots, u_N(t))^T,$$

$$\mathbf{M}_V(t) = \mathbf{A}^{(1)} + V(t)\mathbf{A}^{(2)},$$

$\mathbf{A}^{(1)}$ la matrice triangulaire supérieure, avec pour éléments diagonaux $\mathbf{A}_{i,i}^{(1)} = -\mu - \beta(i-1)$ et pour éléments non diagonaux $\mathbf{A}_{i,j}^{(1)} = 2\beta$, $j > i$,

$\mathbf{A}^{(2)}$ la matrice, avec pour seuls éléments non nuls $\mathbf{A}_{i,i}^{(2)} = -\tau_i$ pour $1 \leq i < N$ et $\mathbf{A}_{i,i-1}^{(2)} = \tau_{i-1}$ pour $2 \leq i \leq N$, et $\mathbf{A}_{N,N}^{(2)} = 0$,

$V(0) = V^0 > 0$ et $\mathbf{U}(0) = \mathbf{U}^0 \geq \mathbf{0}$ les conditions initiales, supposées connues.

Pour une quantité de PrP^{c} V fixée, étudier la dynamique du système revient à étudier les valeurs propres de la matrice \mathbf{M}_V . Pour cela, nous aurons besoin des deux lemmes suivants. Le lemme 1 précise un résultat classique.

Lemme 1 *Soit une matrice \mathbf{P} à diagonale strictement positive, à termes extradiagonaux non positifs, et telle que si $|i-j|=1$, $P_{i,j} < 0$. Si de plus \mathbf{P} est à diagonale strictement dominante (i.e. $\forall i, P_{i,i} > \sum_{j \neq i} |P_{i,j}|$), son inverse est à coefficients strictement positifs.*

Preuve du lemme 1

Il faut montrer que si $\mathbf{b} \geq 0 \in \mathbb{R}^N$ est un vecteur positif non nul, la solution \mathbf{x} du système

$$\mathbf{P}\mathbf{x} = \mathbf{b}$$

est strictement positive. Compte tenu des signes des coefficients la condition de diagonale dominance s'écrit

$$P_{i,i} + \sum_{j \neq i} P_{i,j} > 0$$

L'équation i du système peut se réécrire

$$(P_{i,i} + \sum_{j \neq i} P_{i,j})x_i + \sum_{j \neq i} P_{i,j}(x_j - x_i) = b_i$$

Soit i un indice tel que $x_i \leq x_j$, $1 \leq j \leq N$: le second terme est non positif puisque $P_{i,j} \leq 0$ si $j \neq i$, et le coefficient du premier terme est positif.

Si $x_i < 0$ cela implique $b_i < 0$, contrairement à l'hypothèse $\mathbf{b} \geq 0$.

Si $x_i = 0$ (donc $x_j \geq 0$, $j \neq i$) on a $\sum_{j \neq i} P_{i,j}x_j = b_i \geq 0$ et $P_{i,j} \leq 0$ ce qui implique en particulier que $P_{i-1,i}x_{i-1} = 0$ et $P_{i,i+1}x_{i+1} = 0$ et donc, compte tenu de l'hypothèse $P_{i,j} < 0$ si $|i - j| = 1$, $x_{i-1} = x_{i+1} = 0$. L'argument peut se répéter pour les indices $i - 1$ ou $i + 1$ ce qui entraîne $\mathbf{x} = 0$ contrairement à l'hypothèse \mathbf{b} non nul.

◇

Lemme 2 Soit \mathbf{M} une matrice telle que $M_{i,i} < 0$, $1 \leq i \leq N$, $M_{i,j} \geq 0$, $i \neq j$, et telle que si $|i - j| = 1$, $M_{i,j} > 0$. La matrice \mathbf{M} a une valeur propre réelle λ_1 simple, associée à un vecteur propre \mathbf{W}_1 positif unique à un facteur près, et si λ_i est une autre valeur propre de \mathbf{M} , $\lambda_1 > \text{Re}(\lambda_i)$.

Preuve du lemme 2

Montrons dans un premier temps que $\lambda_1 \geq \text{Re}(\lambda_i)$. La matrice \mathbf{M} a tous ses éléments non diagonaux positifs ou nuls, donc si $\theta > 0$ est assez grand, la matrice $\mathbf{M}_\theta = \mathbf{M} + \theta\mathbf{I}$ a tous ses éléments positifs ou nuls. D'après le théorème de Perron-Frobenius [373] \mathbf{M}_θ a donc une valeur propre réelle positive égale au rayon spectral $\rho(\mathbf{M}_\theta)$ et (au moins) un vecteur propre positif. On en déduit que $\lambda_1 = \rho(\mathbf{M}_\theta) - \theta$ est une valeur propre de \mathbf{M} et que les autres valeurs propres λ_i de \mathbf{M} vérifient

$$\text{Re}(\lambda_i + \theta) \leq |\lambda_i + \theta| \leq \lambda_1 + \theta$$

d'où

$$\text{Re}(\lambda_i) \leq \lambda_1 \tag{6.18}$$

Montrons maintenant que $\mathbf{W}_1 \geq 0$. Soit $\mathbf{P}_\theta = \theta\mathbf{I} - \mathbf{M}$. Les matrices \mathbf{P}_θ^{-1} et \mathbf{M} ont les mêmes vecteurs propres. Si λ_i est une valeur propre de \mathbf{M} , notons $\mu_i = \frac{1}{\theta - \lambda_i}$ la valeur propre correspondante de \mathbf{P}_θ^{-1} .

Soit $\theta > \lambda_1$. On a

$$\left| \frac{1}{\mu_i} \right| \geq \text{Re}\left(\frac{1}{\mu_i}\right) = \theta - \text{Re}(\lambda_i) \geq \theta - \lambda_1$$

d'après (6.18), et donc

$$|\mu_i| \leq \frac{1}{\theta - \lambda_1} = \mu_1 \quad (6.19)$$

La plus grande valeur propre en module de \mathbf{P}_θ^{-1} est donc μ_1 .

On peut choisir $\theta > 0$ assez grand pour que la matrice \mathbf{P}_θ soit diagonale dominante. Compte tenu des hypothèses sur \mathbf{M} , la matrice \mathbf{P}_θ vérifie alors toutes les hypothèses du lemme 1. La matrice \mathbf{P}_θ^{-1} est donc d'après le lemme 1 une matrice à coefficients strictement positifs. D'après le théorème de Perron-Frobenius la matrice \mathbf{P}_θ^{-1} admet, à un facteur près, un seul vecteur propre positif (strictement), associé à une valeur propre simple qui est réelle et supérieure en module à toutes les autres valeurs propres. D'après (6.19) cette valeur propre est μ_1 qui est donc associée à un vecteur propre strictement positif. Ce vecteur propre est aussi le vecteur propre \mathbf{W}_1 de \mathbf{M} associé à la valeur propre λ_1 qui est donc simple.

◇

La matrice \mathbf{M}_V vérifie les hypothèse de la du lemme 2. Nous avons donc la proposition suivante :

Proposition 6 *La matrice \mathbf{M}_V (resp. \mathbf{M}_V^T) a une valeur propre réelle $\lambda_1(V)$ simple, associée à un vecteur propre \mathbf{W}_1 (resp. $\overline{\mathbf{W}}_1$) positif unique à un facteur près, et si λ_i est une autre valeur propre de \mathbf{M}_V , $\lambda_1(V) > \text{Re}(\lambda_i)$.*

4.2.2 $\lambda_1(V)$ est une fonction croissante de V

Nous notons $\mathbf{W}_1(V)$ (resp. $\overline{\mathbf{W}}_1(V)$) les vecteurs propres réels positifs de \mathbf{M}_V (resp. \mathbf{M}_V^T) associés à la valeur propre réelle simple $\lambda_1(V)$ après les avoir normalisés par les conditions

$$\langle \mathbf{C}_1, \mathbf{W}_1(V) \rangle = 1 \text{ avec } \mathbf{C}_1 = (1, \dots, 1)^T$$

$$\langle \overline{\mathbf{W}}_1(V), \mathbf{W}_1(V) \rangle = 1$$

Le théorème des fonctions implicites implique alors que $\lambda_1(V)$, $\mathbf{W}_1(V)$ et $\overline{\mathbf{W}}_1(V)$ sont des fonctions différentiables de V . En dérivant l'identité

$$\mathbf{M}_V \mathbf{W}_1(V) = \lambda_1(V) \mathbf{W}_1(V)$$

et en la multipliant scalairement par $\overline{\mathbf{W}}_1(V)$, nous déduisons classiquement que

$$\frac{d\lambda_1}{dV}(V) = \left\langle \frac{d}{dV} \mathbf{M}_V \mathbf{W}_1(V), \overline{\mathbf{W}}_1(V) \right\rangle$$

Comme, par définition de \mathbf{M}_V , $\frac{d}{dV} \mathbf{M}_V = \mathbf{B}$, on en déduit le lemme suivant :

Lemme 3 *La valeur propre maximale $\lambda_1(V)$ de la matrice \mathbf{M}_V est une fonction dérivable de V et*

$$\frac{d\lambda_1}{dV}(V) = \langle \mathbf{B} \mathbf{W}_1(V), \overline{\mathbf{W}}_1(V) \rangle$$

Or si $\mathbf{W} \in \mathbb{R}^N$

$$\mathbf{B}^T \mathbf{W} = (\tau_1(W_2 - W_1), \tau_2(W_3 - W_2), \dots, \tau_{N-1}(W_N - W_{N-1}), 0)^T$$

D'après le lemme 4 ci-dessous, on a :

$$\mathbf{B}^T \overline{\mathbf{W}}_1(V) \geq 0$$

Seule la dernière composante de ce vecteur est nulle, les autres sont strictement positives. On en déduit que

$$\frac{d\lambda_1}{dV}(V) = \langle \mathbf{W}_1(V), \mathbf{B}^T \overline{\mathbf{W}}_1(V) \rangle > 0$$

et donc la proposition, qui est le résultat attendu :

Proposition 7 *La plus grande valeur propre $\lambda_1(V)$ de la matrice \mathbf{M}_V est une fonction réelle strictement croissante de V .*

Notons que cette propriété n'est valable que pour le cas du système conservatif. Des simulations numériques directes pour le système tronqué montrent une décroissance à l'infini de la valeur propre.

Il reste à monter le lemme :

Lemme 4 *Les composantes du vecteur $\overline{\mathbf{W}}_1$ sont des fonctions strictement croissantes de l'indice*

$$(\overline{\mathbf{W}}_1)_i < (\overline{\mathbf{W}}_1)_{i+1}, \quad 1 \leq i < N$$

Preuve du lemme 4

Par hypothèse, si le vecteur $\mathbf{W} = (w_1, \dots, w_N)^T$ est un vecteur propre de la matrice \mathbf{M}_V^T associée une valeur propre λ , il vérifie

$$\begin{cases} -\mu w_i - \beta(i-1)w_i + V\tau_i(w_{i+1} - w_i) + 2\beta \sum_{j<i} w_j = \lambda w_i, & (1 \leq i < N) \\ -\mu w_N - \beta(N-1)w_N + 2\beta \sum_{j<N} w_j = \lambda w_N \end{cases} \quad (6.20)$$

Posons $x_i = w_i - w_{i-1}$ pour $i \geq 2$ et $x_1 = w_1$ et

$$\mathbf{X} = (x_1, \dots, x_N)^T.$$

En soustrayant, pour $i = 2, \dots, N$ l'équation $i-1$ à l'équation i , il vient pour $i < N$

$$-\mu x_i - \beta((i-1)w_i - (i-2)w_{i-1}) + V(\tau_i x_{i+1} - \tau_{i-1} x_i) + 2\beta w_{i-1} = \lambda x_i$$

ou

$$-\mu x_i - \beta((i-1)w_i - (i-1)w_{i-1}) + V(\tau_i x_{i+1} - \tau_{i-1} x_i) + \beta w_{i-1} = \lambda x_i$$

ou encore

$$-\mu x_i - \beta(i-1)x_i + V(\tau_i x_{i+1} - \tau_{i-1} x_i) + \beta \sum_{j<i} x_j = \lambda x_i$$

Pour $i = N$, il vient

$$-\mu x_N - \beta(N-1)x_N - V\tau_{N-1}x_N + \beta \sum_{j<N} x_j = \lambda x_N$$

Enfin, pour $i = 1$, nous conservons la première équation de (6.20), qui s'écrit aussi

$$-\mu x_1 + V\tau_1 x_2 = \lambda x_1$$

Posons

$$\mathbf{X} = (x_1, \dots, x_N)^T$$

et notons \mathbf{P} la matrice dont les coefficients diagonaux sont

$$P_{i,i} = -\mu - \beta(i-1) - V\tau_{i-1}, \quad 1 \leq i \leq N$$

et dont les éléments hors diagonaux non nuls sont

$$P_{i,i+1} = V\tau_i, \quad 1 \leq i < N$$

$$P_{j,i} = \beta, \quad 1 \leq j < i \leq N$$

Le vecteur \mathbf{X} est un vecteur propre de la matrice \mathbf{P} pour la valeur propre λ .

En inversant la transformation de \mathbf{W} en \mathbf{X} on montre de même que si \mathbf{X} est un vecteur propre de \mathbf{P} , alors le vecteur \mathbf{W} est un vecteur propre de \mathbf{M}_V^T pour la même valeur propre. Les matrices \mathbf{P} et \mathbf{M}_V^T ont donc les mêmes valeurs propres. Or la matrice \mathbf{P} vérifie toutes les conditions de la proposition 2, elle a donc une valeur propre maximale réelle simple associée à des vecteurs propres strictement positifs ou négatifs. Soit $\overline{\mathbf{W}}_1$ le vecteur propre de la matrice \mathbf{M}_V^T , associée à la plus grande valeur propre λ_1 ; $\overline{\mathbf{W}}_1$ définit un vecteur \mathbf{X}_1 qui est donc associé à la plus grande valeur propre de \mathbf{P} , le vecteur \mathbf{X}_1 est donc colinéaire à un vecteur strictement positif. Comme la première composante $(\mathbf{X}_1)_1 = (\overline{\mathbf{W}}_1)_1$ est strictement positive, le vecteur \mathbf{X}_1 est strictement positif, ou encore, puisque

$$\mathbf{X}_1 = ((\overline{\mathbf{W}}_1)_1, (\overline{\mathbf{W}}_1)_2 - (\overline{\mathbf{W}}_1)_1, \dots, (\overline{\mathbf{W}}_1)_N - (\overline{\mathbf{W}}_1)_{N-1})^T$$

les composantes de $\overline{\mathbf{W}}_1$ sont strictement croissantes par rapport à l'indice.

◇

5 Effet d'un taux de conversion non constant sur la dynamique de réplication

5.1 Conversion taille-dépendante et distribution en taille des agrégats de PrP^{res}

Suite à l'analyse théorique des comportements du système à l'équilibre, nous avons cherché à évaluer numériquement dans quelle mesure un pouvoir de conversion dépendant de la taille de

l'agrégat influe sur la dynamique du modèle. Nous avons limité notre étude à deux dépendances en taille : une dépendance sigmoïdale, pour laquelle les agrégats de petites tailles sont moins convertisseurs que les agrégats de grandes tailles, et une dépendance en forme de cloche, pour laquelle une taille d'agrégats intermédiaire est favorisée. Ces deux profils sont caractérisés par une augmentation de l'infectiosité à partir d'une taille d'agrégat donnée, ce qui mime le fait que les oligomères les plus petits sont non infectieux [219]. Dans la mesure où l'infectiosité des gros agrégats est mal connue, les profils choisis correspondent aux cas extrêmes d'une décroissance de l'infectiosité rapide à partir d'une certaine taille (*i.e.* les gros agrégats ne sont pas convertisseurs) ou d'une infectiosité constante à partir d'une taille donnée.

Dans un premier temps, nous avons évalué la vitesse d'accumulation de la PrP^{res} lorsque différentes tailles d'agrégats sont initialement inoculées (pour une même quantité de PrP^{res} totale). Dans le cas d'un pouvoir de conversion constant, nous reproduisons les résultats obtenus précédemment par d'autres équipes [301] : plus les agrégats injectés sont petits, plus la vitesse d'accumulation de la PrP^{res} est élevée. Ces résultats non surprenants sont dus au fait que pour une même quantité de PrP^{res} , les particules infectieuses sont d'autant plus nombreuses qu'elles sont petites, le pouvoir convertisseur global étant dans ce cas proportionnel au nombre de particules infectieuses. En revanche, dans le cas d'un pouvoir de conversion taille-dépendant, il existe une taille optimale pour laquelle l'accumulation de PrP^{res} est la plus rapide. Ces résultats reproduisent qualitativement les résultats expérimentaux de conversion *in vitro* et d'inoculation à l'animal effectués par Silveira *et al.* [219]. Ces résultats sont une donnée supplémentaire en faveur de paramètres de répliation taille-dépendants. (*voir Article 1, Figure 3*).

En outre, nous avons observé que pour des conditions initiales données, le profil cinétique d'accumulation de la PrP^{res} totale est relativement insensible à la dépendance en taille du pouvoir de conversion. En revanche, la répartition en taille des agrégats au cours du temps varie en fonction du pouvoir de conversion choisi : par exemple, un coefficient de conversion constant conduit à une distribution en cloche, très robuste [343] et un coefficient de conversion concentré sur une taille donnée conduit à une distribution bimodale (Figure 6.6 et *Article 1, Figure 2*). Les distributions multimodales, générées par un taux d'élongation non constants, se rapprochent des distributions expérimentales non uniformes obtenue par sédimentation des agrégats de PrP^{res} contenus dans un cerveau. [221].

De plus, nous avons observé théoriquement que la distribution en taille des agrégats varie différemment lors d'une variation élémentaire des paramètres de répliation (*voir Article 2, Figures 4, 5 et 7*). Ajouté au résultat précédent, ces données théoriques suggèrent que la distribution en taille des agrégats de PrP^{res} est l'une des grandeurs mesurables expérimentalement les plus informatives sur les mécanismes élémentaires de conversion, au contraire de la cinétique d'accumulation de la PrP^{res} qui ne varie pas en fonction du taux d'élongation choisi.

5.2 Distribution en taille des agrégats de PrP^{res} et Souches de Prions

L'information de souche de Prions semble être portée par différentes conformations de la PrP^{res} [103, 104, 375]. Toutefois, il reste encore à déterminer de quelle manière la conformation d'une souche influence son mécanisme de répliation (par exemple, les souches les moins stables semblent plus infectieuses [375]). Il a récemment été démontré que les propriétés de répliation

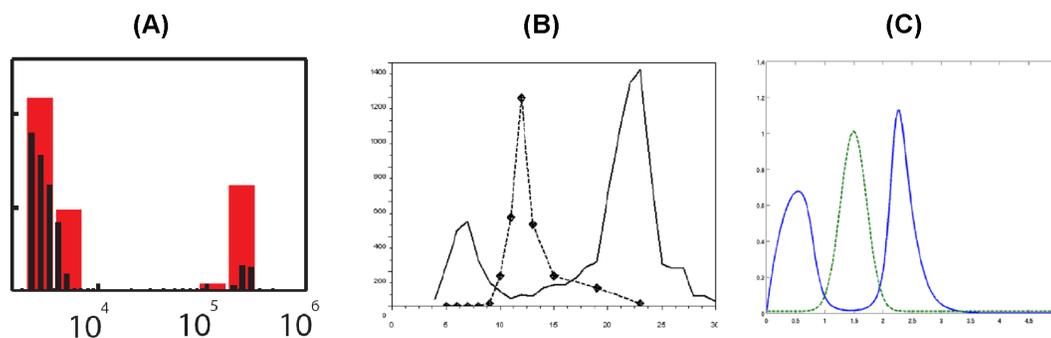


FIG. 6.6 – Exemples de distribution en taille des agrégats de PrP^{res}. (A) Distribution expérimentale des Prions de levures SUP35NM, obtenue par *Burst Analysis Spectroscopy* après fibrillation *in vitro*. D'après [374]. (B) Distribution expérimentale des agrégats de PrP^{res} purifiés à partir d'un cerveau de hamster infecté pas la souche 263K, puis soniqués (courbe pleine). Pouvoir de conversion *in vitro* des agrégats en fonction de leur taille (courbe pointillé). D'après [219]. (C) Distribution théorique des agrégats de PrP^{res} en fonction de leur taille (courbe bleue) obtenue par simulation numérique du modèle de Masel généralisé avec un coefficient d'élongation en forme de cloche (courbe verte).

taille-dépendantes des agrégats sont impliquées dans le mécanisme de souche. En effet, les particules les plus infectieuses semblent être plus petites dans le cas des souches rapides que dans le cas des souches lentes [221]. Notre modèle est compatible avec des observations expérimentales connues :

- diminution de la vitesse d'accumulation des Prions lorsque la taille des particules convertissantes augmente [221] (*voir Article 2, Figure 5*);
- diminution de la vitesse d'accumulation des Prions lorsque la fragmentation des Prions diminue [375] (*voir Article 2, Figure 7*).

Par ailleurs, au cours des différentes simulations numériques, nous avons observé une dynamique temporelle de la distribution en taille des agrégats similaire au mécanisme d'adaptation de souche (*voir Chapitre 1, page 35*). En effet, dans un premier temps, une phase transitoire se produit, pendant laquelle une distribution préférentielle se met en place, alors que la PrP^{res}

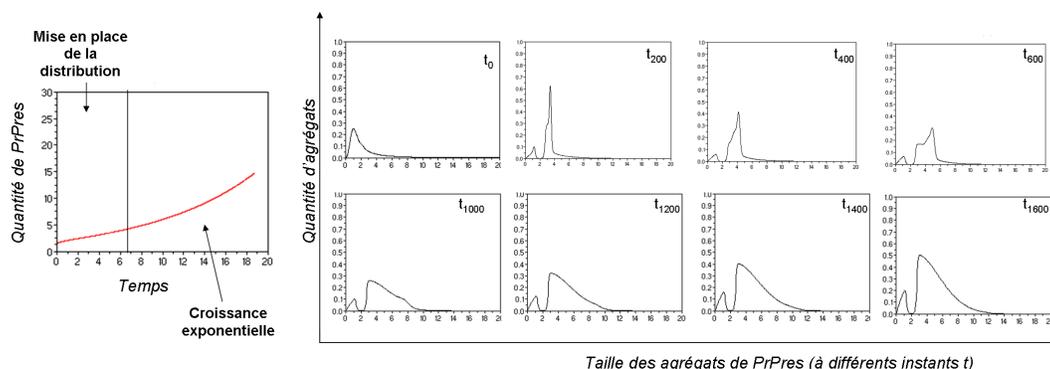


FIG. 6.7 – Evolution temporelle de la distribution en taille des agrégats, obtenue pour un coefficient d'élongation en forme de cloche.

s'accumule peu. Une fois cette distribution établie, elle n'évolue plus et la PrP^{res} s'accumule de façon exponentielle. Enfin, cette distribution évolue de nouveau dans les phases tardives de l'infection, lorsque la concentration en PrP^{c} devient trop faible et que l'accumulation de PrP^{res} arrive à un plateau (Figure 6.7). Ainsi, quand la distribution initiale des agrégats n'est pas "adaptée" à la distribution préférentielle, l'accumulation de PrP^{res} est ralentie. La distribution en taille préférentielle est imposée par les paramètres cinétiques du modèle, qui sont le reflet de la relation hôte-pathogène. Lorsqu'une souche est inoculée à un nouvel hôte, ces paramètres sont modifiés, et un délai semble alors nécessaire pour que la distribution en taille initiale (imposée par l'hôte initiale) s'adapte (*voir article 1, Figure 122*). Ce résultat suggère que la distribution en taille des agrégats pourrait porter une information biologique et jouer un rôle dans le mécanisme de souche.

6 Discussion

Au cours de cette étude, nous avons généralisé le modèle de réplication des Prions de Masel pour tenir compte des données expérimentales récentes, qui suggèrent que les agrégats de PrP^{res} possèdent des propriétés de réplication spécifiques de leur taille. Expérimentalement, cette dépendance en taille semble s'appliquer sur tous les paramètres cinétiques de réplication [219, 324, 375]. En particulier, le pouvoir de conversion *in vitro* est connu pour dépendre de la taille des agrégats [219]. C'est pourquoi nous avons limité notre analyse à un coefficient τ d'extension non constant, qui représente le pouvoir convertisseur d'une particule de taille donnée (*i.e.* sa capacité à fixer et à transconformer une molécule de PrP^{c} en PrP^{res}).

Dans un premier temps, nous avons analysé théoriquement les conditions d'initiation de la réplication, à travers l'étude de la stabilité de l'état d'équilibre sain. Un état sain stable signifie biologiquement que quelle que soit la perturbation imposée au système (par exemple, une injection de PrP^{res} ou une modification temporaire du métabolisme de la PrP^{c}), l'individu sera capable de lutter contre l'infection et reviendra à l'état non infecté. Nous avons démontré la stabilité globale de l'état sain, sous certaines hypothèses théoriques sur les paramètres cinétique de réplication. Ces hypothèses très théoriques n'ont pas toujours de signification biologique précise, toutefois, lorsqu'il est possible de trouver un équivalent biologique, elles sont très informatives sur les conditions de déclenchement d'une maladie à Prions. En particulier, nous avons démontré que lorsque le niveau de PrP^{c} est trop faible, l'état sain est globalement stable. En revanche, lorsque celui-ci est plus important, l'état infecté (transmis par inoculation de PrP^{res}) persiste au cours du temps. Cette condition sur le niveau d'expression du précurseur est connue pour influencer la susceptibilité à l'infection par des Prions [95]. Dans le cadre plus général des amyloïdoses, elle pourrait expliquer pourquoi seules les maladies à Prions semblent infectieuses. Par exemple, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la protéine APP est d'abord clivée en peptides $A\beta$ qui s'accumulent sous forme amyloïde par un mécanisme de polymérisation nucléée similaire aux Prions [114]. Dans les conditions normales, le clivage très particulier de la protéine APP pourrait conduire à une quantité de précurseur amyloïde trop faible pour autoriser le déclenchement infectieux de la maladie d'Alzheimer.

Dans un second temps, nous avons effectuée une analyse numérique du modèle généralisé,

pour étudier l'influence d'un coefficient de croissance des polymères non constant sur la dynamique du système. Au vue de cette analyse, la quantité relative de chaque type d'agrégats semble être la donnée qualitative la plus représentative de la répartition du pouvoir infectieux. De plus, notre analyse suggère que la distribution en taille des agrégats de PrP^{res} pourrait être le reflet de la relation hôte-pathogène spécifique d'une souche de Prions. En effet, la comparaison de ces distributions pour différentes souches de Prions pourraient permettre d'identifier le(s) paramètre(s) élémentaire(s) de répliation le(s) plus critique(s) pour le phénomène de souche.

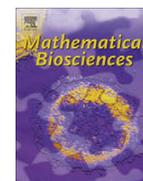
Par ailleurs, nous avons observé que la distribution en taille des agrégats pourrait jouer un rôle important dans le mécanisme d'adaptation de souches, et par conséquent, dans le phénomène de souche lui-même. L'adaptation de souche est supposée être la conséquence d'un changement progressif de la conformation des fibrilles au cours des passages successifs dans le nouvel hôte [122]. Notre analyse suggère qu'un autre mécanisme est également envisageable : il pourrait s'agir d'une adaptation de la proportion des polymères de différentes tailles. Cette hypothèse semble compatible avec les résultats expérimentaux connus. Par exemple, l'utilisation de polymères conjugués luminescents montre une modification progressive de la fluorescence émise au cours de l'adaptation de souche [122]. Il est tout à fait possible que la modification de la proportion des différents agrégats conduise à un changement de fluorescence émise. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la distribution en taille des agrégats de PrP au cours de l'adaptation progressive chez un nouvel hôte.

Ainsi, la perspective de ces résultats est l'établissement de la distribution en taille des agrégats de PrP^{res} dans différents contextes (fibrillation *in vitro* à partir de PrP recombinante, PMCA, culture cellulaire, *in vivo*) et pour différentes souches des Prions. Couplées à des techniques mathématiques de problèmes inverses (visant à estimer les paramètres cinétiques du modèle à partir de la connaissances du modèle et de la distribution en taille [372]), ces distributions devraient alors permettre d'inférer les mécanismes élémentaires de répliation, de façon plus rapide qu'un fractionnement fin des différents polymères, suivi d'une inoculation à l'animal des différentes fractions pour mesurer l'infectiosité de chaque particule (ne donnant pas accès aux propriétés élémentaires de répliation) [219, 221]. Une limite de notre modèle pour l'étude des mécanismes *in vivo* est la formulation acellulaire du modèle. En effet, les souches ne sont pas seulement caractérisées par des données cinétiques (*i.e.* un temps d'incubation), mais aussi par des données spatiales dans un environnement hétérogène (*i.e.* un tropisme cellulaire particulière). Le contexte acellulaire ne permettant pas de prendre en compte ces phénomènes locaux, nous introduisons dans les chapitres suivants différents formalismes permettant d'étudier l'influence d'un contexte multicellulaire sur la dynamique de répliation des Prions.

7 Articles

Article 1 : N. Lenuzza, V. Calvez, D. Oelz, J.-P. Deslys, P. Laurent, F. Mouthon et B. Perthame, *Size distribution dependence of Prion aggregates infectivity*, Mathematical Biosciences. 217 (2009) 88-99.

Article 2 : N. Lenuzza, V. Calvez, M. Doumic, J.-P. Deslys, F. Mouthon et B. Perthame, *Prion dynamics with size dependency : strain phenomena*, accepté dans Journal of Biological Dynamics.



Size distribution dependence of prion aggregates infectivity

Vincent Calvez^{a,1}, Natacha Lenuzza^{b,d,1}, Dietmar Oelz^c, Jean-Philippe Deslys^b, Pascal Laurent^d,
Franck Mouthon^{b,2}, Benoît Perthame^{e,*,2}

^aDépartement de Mathématiques et Applications, École Normale Supérieure, CNRS UMR8553, 45 rue d'Ulm, F-75230 Paris Cedex 05, France

^bCEA-Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies, Route du Panorama, Bat. 60, F-92265 Fontenay-aux-Rose, France

^cUniversität Wien, Fakultät für Mathematik, Nordbergstrasse 15/C/7, 1090 Wien, Austria

^dEcole Centrale Paris, Laboratoire MAS, Grande Voie des Vignes, F-92290 Châtenay-Malabry, France

^eUniversité Pierre et Marie Curie-Paris 6, Institut Universitaire de France, UMR 7598 LJLL, BC187, 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2008

Received in revised form 8 October 2008

Accepted 10 October 2008

Available online 1 November 2008

Keywords:

Prion kinetics

Polymerization process

Size repartition

Duality method

ABSTRACT

We consider a model for the polymerization (fragmentation) process involved in infectious prion self-replication and study both its dynamics and non-zero steady state. We address several issues. Firstly, we extend a previous study of the nucleated polymerization model [M.L. Greer, L. Pujo-Menjouet, G.F. Webb, A mathematical analysis of the dynamics of prion proliferation, *J. Theoret. Biol.* 242 (2006) 598; H. Engler, J. Pruss, G.F. Webb, Analysis of a model for the dynamics of prions II, *J. Math. Anal. Appl.* 324 (2006) 98] to take into account size dependent replicative properties of prion aggregates. This is achieved by a choice of coefficients in the model that are not constant. Secondly, we show stability results for this steady state for general coefficients where reduction to a system of differential equations is not possible. We use a duality method based on recent ideas developed for population models. These results confirm the potential influence of the amyloid precursor production rate in promoting amyloidogenic diseases. Finally, we investigate how the converting factor may depend upon the aggregate size. Besides the confirmation that size-independent parameters are unlikely to occur, the present study suggests that the PrPsc aggregate size repartition is amongst the most relevant experimental data in order to investigate this dependence. In terms of prion strain, our results indicate that the PrPsc aggregate repartition could be a constraint during the adaptation mechanism of the species barrier overcoming, that opens experimental perspectives for prion amyloid polymerization and prion strain investigation.

Crown Copyright © 2008 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are fatal, infectious, neurodegenerative diseases. They include bovine spongiform encephalopathies (BSE) in cattle, scrapie in sheep and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in human [1]. The infectious agents responsible for disease transmission, known as prions, present some unusual biological properties (as a high resistance to inactivation by heat or radiation). According to the ‘protein-only hypothesis’, prions may consist in a misfolded protein (called PrPsc), without any nucleic acid. This hypothesis suggests that PrPsc replicates in a self-propagating process, by converting the normal form of PrP (called PrPc for Prion Protein cellular) into PrPsc (for

Prion Protein scrapie) [2]. Many evidences are in favor of an autocatalytic replication of PrPsc, as the generation of infectivity from recombinant proteins [3] or the use of in vitro PrPsc conversion systems, such as the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) technique [4].

However, the precise mechanism of conversion remains unclear. Moreover, prion infectious agent can exist under different strains, characterized by their incubation period and their lesion profile in brains [5]. In the framework of the protein-only hypothesis, it is supposed that strain diversity is supported by various conformation states of PrPsc, that leads to various biological and biochemical properties [6,7]. A critical challenge of prion biology consists in elucidating the mechanism of conversion of PrPc into PrPsc, and therefore how a diversity of strains may exist in the same host (expressing the same PrP molecule).

To investigate the conversion of PrPc in PrPsc, many relevant mathematical modeling of prion replication have been proposed [8–11]. Their major aim is to demonstrate that essential features of prion disease can be explained by purely physico-chemical mechanisms, as supposed by the protein-only hypothesis. In

* Corresponding author.

E-mail addresses: vcalvez@dma.ens.fr (V. Calvez), natacha.lenuzza@cea.fr (N. Lenuzza), dietmar.oelz@univie.ac.at (D. Oelz), jean-philippe.deslys@cea.fr (J.-P. Deslys), pascal.laurent@ecp.fr (P. Laurent), franck.mouthon@cea.fr (F. Mouthon), benoit.perthame@upmc.fr (B. Perthame).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These authors contributed equally to supervise this work.

addition, mathematical modeling allows studying the effect of every elementary process in a separate manner [12], what is difficult to do experimentally.

The early proposed model is the heterodimer one. It is based on the conformational change of PrPc into PrPsc after the formation of a heterodimeric complex ($\text{PrPc} + \text{PrPsc} \rightarrow \text{PrPc}^* \text{PrPsc} \rightarrow \text{PrPsc}^* \text{PrPsc} \rightarrow 2 \text{PrPsc}$). This model does not take into account the aggregation of PrPsc, and thereby fails to explain the association between infectivity and aggregated PrP. Some other mechanisms have been proposed, which are interested in PrP aggregation [9,10,13–15]. Based on fibrillar aggregation, the model which seems by now broadly accepted is the one of nucleated polymerization [9,16,17]. In this approach, PrPsc is considered to be a polymeric form of PrPc. Polymers can lengthen by addition of PrPc monomers, and they can replicate by splitting into smaller fragments. Greer et al. [18] recently improved the model to include a mean saturation effect by the whole population of polymers onto the lengthening process (called general incidence), and polymer joining (through a Smoluchowski coagulation equation). Another improvement is proposed in [19] where an intermediate state of converted PrP is introduced.

In these models, each aggregate has the same replicative behavior regardless to its size (modelled by constant kinetic parameters). However, some indirect evidences suggest that this hypothesis could be relaxed. Indeed, PrPsc aggregates are very heterogeneous in morphology: in several preparation conditions, either amorphous, spherical or fibrillar aggregates have been observed [20–22]. Moreover, the difficulties to generate infectivity from PrPsc with pure recombinant PrPc suggest that co-factors are necessary to the conversion mechanism of PrPc in infectious PrPsc (for instance, glycosaminoglycans may be important in the formation or stabilization of PrPsc [23]). A replication rate identical for every aggregate size, as supposed in previous models, would imply that interactions between PrPsc and other co-factors are structured-independent. However, it seems unlikely that differently structured aggregates possess the same biological or biophysical properties. More direct evidences are also in favor of a non-constant behavior. Recent experimental analysis of relation between infectivity and size distribution of PrPsc aggregates (for PrPsc purified from infected brain [20] or for PrPsc produced by PMCA [24,25]) contradicts this uniform behavior of PrPsc aggregates. For instance, Weber et al. found a bell-shaped-like dependence of infectivity on particle size in an infectivity assay using N2a cells [25,26]. Taken together, these considerations suggest that the infectivity of PrPsc aggregates could be dependent on its aggregation state, i.e. its size in the theoretical systems.

The aim of our study is to generalize previous models to take into account the infectivity prion size-dependence. In mathematical models, infectivity is a balance between three elementary processes (namely fragmentation, degradation/sequestration and polymerization). Although we cannot exclude a size-dependent stability (assumed as a variable degradation rate or a variable fragmentation factor for large size), we have made the choice of a non-constant extension rate. Indeed, conversion activity, which is the most direct measure of our extension rate, is heterogeneous with regards to prion aggregates size [20,27]. Furthermore, the hypothesis of a constant extension rate rests on the fibrillar aspect of PrPsc aggregates (i.e. polymerization occurs only at two ends of the polymer) [9,16,17]. However, so far, PrPsc-containing fibrils have not been found in infected brain tissues. The brain derived scrapie-associated fibrils (SAF) and Prion Rods may assemble during homogenization, extraction or purification and thus, be preparation artifacts [28,29].

Thus, the major goal of the present work is to generalize Masel and co-workers' model of nucleated polymerization by taking a non-constant conversion rate, and to investigate the potential

implications of the resulting prion aggregates size distribution in the strain phenomenon.

The paper is organized as follows: in Section 2 we recall and review the model of Masel et al. and its continuous version [16] which is going to be used. We introduce our main improvement, namely a size-dependent lengthening factor related to non-uniform infectivity rate; and we discuss the eigenvalue problem which is a key tool to analyze the model. In Section 3 we prove the stability of the zero steady state in the disease free regime (generalizing partially a result in Greer et al. [16]). Finally, in Section 4 we study numerically the influence of different parameters on the dynamics of our model, in a prion strain perspective.

2. The continuum model

The following set of coupled differential equations has been introduced by Masel et al. [9] in order to model the polymerization (aggregation, fragmentation) process involved in infectious prion self-replication. It describes the dynamics of the quantity of PrPc $V(t)$, coupled with the evolution of aggregates of PrPsc $u_i(t)$ made of i elementary proteins,

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} V(t) = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t) U(t) + 2\beta \sum_{i=1}^{n_0-1} \sum_{j>i} i u_j(t), \\ \frac{d}{dt} u_i(t) = -\mu u_i(t) - \beta(i-1)u_i - \tau V(t)(u_i(t) - u_{i-1}(t)) + 2\beta \sum_{j>i} u_j(t) \\ \text{for } i \geq n_0. \end{cases} \quad (1)$$

The index n_0 denotes the minimal size of PrPsc polymers. The quantity $U(t) = \sum u_i(t)$ is the total amount of prion aggregates. The constant parameters $\lambda, \gamma, \tau, \beta, \mu$ are, respectively, the basal synthesis rate of PrPc, the degradation rate of PrPc, the conversion rate of PrPc into PrPsc (autocatalytic process following the mass action law), the fragmentation coefficient, and the degradation rate of PrPsc.

Analysis is simpler in the framework of continuous size of prions because analytical tools can serve to find simpler formulations. Accordingly, Greer et al. [16] introduce a continuous version of the discrete system (1) where they use the variable $x \in (0, +\infty)$ to denote the size of aggregates instead of the index $i \in \mathbb{N}$. This procedure can be justified by asymptotic derivations of continuous models from discrete models, see [30,31]. The continuous model reads, with possibly non-constant coefficients,

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} V(t) = \lambda - V(t) \left(\gamma + \int_{x_0}^{\infty} \tau(x) u(x, t) dx \right) \\ \quad + 2 \int_0^{x_0} x \int_x^{\infty} \beta(y) \kappa(x, y) u(y, t) dy dx, \\ \frac{\partial}{\partial t} u(x, t) = -V(t) \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x) u(x, t)) \\ \quad - [\mu(x) + \beta(x)] u(x, t) + 2 \int_x^{\infty} \beta(y) \kappa(x, y) u(y, t) dy, \\ u(x_0, t) = 0, \end{cases} \quad (2)$$

together with appropriate initial conditions (e.g. $V_0 = \lambda/\gamma$, and $u_0(x)$ is a non-negative perturbation of the zero state) and with $u(x, t) = 0$ for $x \leq x_0$. This is a well established family of models used for describing aggregation, fragmentation and possibly coagulation in polymer dynamics. It also appears in size structured cell dynamics with finite resources [32–35]. Well-posedness, in the class of weak solutions, has been addressed by [36–38]. A general introduction to methods related to this type of model can be found in [39].

The transport term $V(t) \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x) u(x, t))$ accounts for the growth in size of polymers by aggregation of converted normal proteins. Their size increases with the (extension) rate $V(t)\tau(x)$, propor-

tional to the available PrPc molecules $V(t)$, with a conversion ability $\tau(x)$ depending on the size of the polymer according to the experimental evidences presented in the introduction. The fragmentation rate for a polymer of size y , is $\beta(y) > 0$. The repartition of the two fragments of (smaller) sizes x and $y - x$ is given by $\kappa(x, y) \geq 0$. It should thus satisfy the two usual laws [19,33,40] expressing that the number of fragments increases but keeping the total molecular mass unchanged (recall the factor 2 in the right-hand side of (2))

$$\int_0^y \kappa(x, y) dx = 1, \quad \int_0^y x\kappa(x, y) dx = \frac{y}{2}. \quad (3)$$

We may incorporate a minimal size of infectious PrPsc aggregates $x_0 \geq 0$, whose value remains unknown. Experimentally, no monomer of PrPsc has been isolated yet. In addition, small aggregates have been shown not to be infectious [20] (even-though they have to enter the actual modeling) and thus the assumption of a critical size of nucleation x_0 has been emphasized. However, the continuous model holds under the assumption that the monomer size can be neglected as opposed to possibly numerous large polymers (such that $x_0 \simeq 0$). Therefore, we keep $x_0 \geq 0$ in the following but we sometimes neglect it ($x_0 = 0$) in order to simplify the presentation.

The system (2) keeps an important biochemical property: the prion molecules are properly transferred from one configuration to another (inducing no loss of mass during fragmentation or polymerization). This enhances the following macroscopic laws involving the total quantity of polymers $U(t)$ and the total mass of PrPsc fixed by the polymers $P(t)$ defined as

$$U(t) = \int_{x_0}^{\infty} u(x, t) dx, \quad P(t) = \int_{x_0}^{\infty} xu(x, t) dx. \quad (4)$$

In fact, using assumption (3), equation (2) yields the balance laws,

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} U(t) &= \int_0^{\infty} [\beta(x) - \mu(x)]u(x, t) dx \quad (\text{in the case } x_0 = 0), \\ \frac{d}{dt} (V(t) + P(t)) &= \lambda - \gamma V(t) - \int_{x_0}^{\infty} x\mu(x)u(x, t) dx, \end{aligned} \quad (5)$$

which asserts that the only possible creation or loss of PrP is due to the dynamics of PrPc (net production + degradation) and the natural sequestration of PrPsc.

2.1. General assumptions on the coefficients

In its entire generality, model (2) is rather difficult to attack even though some qualitative behaviors can be described as in Section 3. We aim to reduce the complexity of this system in order to extract some relevant informations and concentrate on the conversion rate $\tau(x)$ for reasons mentioned earlier. At this stage of knowledge of the biochemical process, the available microscopic experimental data are insufficient to investigate different fragmentation laws in details. Indeed, we are not able to dissociate the three elementary processes (degradation/sequestration, splitting and polymerization) implicated in prion replication. We have made the choice of varying the conversion rate $\tau(x)$ as a first step, whereas Silveira et al. [20] clearly indicate that large polymers are more stable than small ones (this could be assumed as a reduced degradation rate or a saturated fragmentation factor for large sizes).

We recall a simple but natural choice for the coefficients, following [16]: the fragmentation rate is assumed to be proportional to the fragment size and the degradation rate does not depend of the size, that is,

$$\beta(x) = \beta_0 x, \quad \mu(x) \equiv \mu_0, \quad (6)$$

and the probability distribution of fragments of size x is chosen to be uniform with respect to the length of the split polymers of size y :

$$\kappa(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } y \leq x_0 \text{ or } y \leq x \\ 1/y & \text{if } y > x_0 \text{ and } 0 < x < y. \end{cases} \quad (7)$$

Last, but not least, the conversion rate $\tau(x)$ may also be assumed to be constant:

$$\tau(x) \equiv \tau_0. \quad (8)$$

In this situation, the stable distribution of aggregates, as well as the possible asymptotic behaviors has been completely classified [9,16] (see Section 2.4). We refer to this choice (6)–(8) as the *constant coefficients case*.

With respect to previous modeling studies [9,16], the main purpose of our work is to take into account more general assumptions for the coefficients. We explain how steady states can be obtained, and we partially analyze their stability properties. For the discussion, we focus on the case where only the conversion rate $\tau(x)$ differs from the ‘constant coefficients case’. We try to foresee consequences in terms of qualitative behavior: which stable size distributions can be reached? What specific features do the dynamics exhibit? What are the possible biological interpretations?

2.2. A related eigenvalue problem

When \mathbf{V} is frozen, it is convenient to introduce the aggregation/fragmentation operator

$$\begin{aligned} \mathcal{L}_{\mathbf{V}} u(x) &:= \mathbf{V} \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x)u(x)) + (\mu(x) + \beta(x))u(x) \\ &\quad - 2 \int_x^{\infty} \beta(y)\kappa(x, y)u(y) dy. \end{aligned}$$

It has a dominant eigenvalue $\Lambda(\mathbf{V})$ (the opposite of the growth rate, also named *negative fitness* referring to population dynamics), associated to a non-negative eigenfunction. In other words there is a unique solution $\mathcal{U}(\mathbf{V}; x)$ to

$$\begin{cases} \mathcal{L}_{\mathbf{V}} \mathcal{U}(\mathbf{V}; \cdot)(x) = \Lambda(\mathbf{V}) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x), \\ \mathcal{U}(\mathbf{V}; x_0) = 0, \quad \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) \geq 0, \quad \int_{x_0}^{\infty} \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx = 1. \end{cases} \quad (9)$$

Such solutions have been shown to exist, and the integrability condition implies an exponential decay at infinity, see [33,34,41].

These eigenlements help to give the qualitative behavior of the linear equation

$$\frac{\partial}{\partial t} u(x, t) + \mathcal{L}_{\mathbf{V}} u = 0.$$

It has been thoroughly studied using the generalized relative entropy (GRE) method (see [33, and references therein]). In a short, the distribution $u(x, t)$ tends to align along the dominant eigenfunction $\mathcal{U}(\mathbf{V}; x)$ up to an exponential rescaling by the negative growth rate. It is proved that the time asymptotic regime is $u(x, t) \approx \varrho \exp(-\Lambda(\mathbf{V})t) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x)$ with ϱ a factor depending on the initial data. We refer to this regime as the ‘exponential phase’.

We can derive a useful formula for the eigenvalue $\Lambda(\mathbf{V})$. The decay conditions at infinity ensure that the following integrations-by-parts can be justified (we assume $x_0 = 0$ below). Integrating (9) successively against 1 and x , gives

$$\begin{aligned} \int_0^{\infty} (\mu(x) + \beta(x)) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx - 2 \int_0^{\infty} \int_x^{\infty} \beta(y)\kappa(x, y) \mathcal{U}(\mathbf{V}; y) dy dx \\ = \Lambda(\mathbf{V}) \int_0^{\infty} \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & -\mathbf{V} \int_0^\infty \tau(x) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx + \int_0^\infty (x\mu(x) + x\beta(x)) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx \\
 & - 2 \int_0^\infty \int_x^\infty \beta(y) \kappa(x, y) \mathcal{U}(\mathbf{V}; y) dy dx = A(\mathbf{V}) \int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx.
 \end{aligned}$$

Using (3) we obtain as a direct consequence,

$$\begin{aligned}
 A(\mathbf{V}) &= \int_0^\infty (\mu(x) - \beta(x)) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx \\
 &= \frac{-\mathbf{V} \int_0^\infty \tau(x) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx + \int_0^\infty x\mu(x) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx}{\int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx}. \tag{10}
 \end{aligned}$$

2.3. Discussion of the possible equilibria and corresponding dynamics

As pointed out already by Greer et al. [16], there are in general two steady states of the dynamics driven by (2). The first equilibrium is disease free, and we refer to it as the 'zero steady state':

$$\bar{V} = \frac{\lambda}{\gamma}, \quad \bar{u} \equiv 0. \tag{11}$$

As stressed in the setting of (2), we consider in general initial data which are close to this non-infected state. This results in an exponential phase after some transitory regime, the 'pre-exponential phase'. Indeed the linearized system around $(\bar{V}, 0)$ writes as follows (for $x_0 = 0$ and $\tilde{V}(t) = V(t) - \bar{V}$),

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} \tilde{V} = -\gamma \tilde{V} - \bar{V} \int_0^\infty \tau(x) u(x, t) dx + \text{higher order terms,} \\ \frac{\partial}{\partial t} u(x, t) = -\mathcal{L}_{\bar{V}} u + \text{h.o.t.} \end{cases} \tag{12}$$

Due to the particular triangular form of the linearized problem, the principal eigenvalue $A(\bar{V})$ drives the growth of the system. It is thus a crucial quantity in order to get a qualitative picture of the system: is the disease free state stable or unstable (see Section 3)? What is the speed of the infection at early times (see Section 4 and Fig. 3)? The early stages of infection are highly relevant biologically, because the observable quantities seem to be measured at the very beginning of the infection after inoculation. Discussing the biological implications of the current modeling (Section 4), we shall always assume we remain in the pre-exponential and exponential phases even though the full non-linear dynamics can be much more intricate.

As we are also interested in long-time dynamics resulting in a balance between polymerization and fragmentation, we stress that another steady state (V_∞, u_∞) is possible for the system (2), being non-trivial and satisfying:

$$\begin{cases} V_\infty \left(\gamma + \int_{x_0}^\infty \tau(x) u_\infty(x) dx \right) = \lambda + 2 \int_0^{x_0} x \int_x^\infty \beta(y) \kappa(x, y) u_\infty(y) dy dx, \\ V_\infty \frac{d}{dx} (\tau(x) u_\infty(x)) + (\mu(x) + \beta(x)) u_\infty(x) = 2 \int_x^\infty \beta(y) \kappa(x, y) u_\infty(y) dy \end{cases} \tag{13}$$

with sufficient decay conditions at infinity. This non-trivial equilibrium ($u_\infty \neq 0$) corresponds to the infection regime, and can be understood as follows. The equilibrium distribution u_∞ arises as an eigenfunction associated to the eigenvalue $A(V_\infty) = 0$ (9). In fact, this characterizes both the level of PrPc (V_∞) and the shape of the polymer distribution $\mathcal{U}(V_\infty; x)$. The complete description of the steady-state relies on knowing the total number of polymers. This missing factor is determined thanks to the first equation of (13). Interestingly enough, the value V_∞ does not depend on the differential equation driving $V(t)$. In particular it does not depend on λ and γ .

Consider the case $x_0 = 0$ for simplicity. The infectious steady state is given according to the rule:

$$A(V_\infty) = 0, \quad u_\infty(x) = \varrho_\infty \mathcal{U}(V_\infty; x), \tag{14}$$

where ϱ_∞ denotes the total number of polymers. Such a steady state does not always exist [16]. In fact, according to the first equation of system (13), we have

$$V_\infty \left(\gamma + \varrho_\infty \int \tau(x) \mathcal{U}(V_\infty; x) dx \right) = \lambda$$

or, equivalently

$$\varrho_\infty = \frac{\lambda V_\infty^{-1} - \gamma}{\int \tau(x) \mathcal{U}(V_\infty; x) dx} > 0.$$

This points out a constraint for the non-trivial steady state (V_∞, u_∞) to exist, namely it is required that

$$\gamma V_\infty < \lambda, \quad (\text{equivalently } V_\infty < \bar{V}). \tag{15}$$

The stability of these steady states is one of the issues we address later.

2.4. The case of constant coefficients

For 'constant coefficients' (6)–(8), the stability has been fully analyzed in [16,17] and the situation is rather simple. As soon as the non-trivial equilibrium (V_∞, u_∞) exists, it is stable. Otherwise the disease free equilibrium is stable. This argument relies on the reduction of the infinite dimensional system to a three-dimensional ordinary differential system on (U, P, V) due to remarkable cancellations.

We have the opportunity to recall their results under the viewpoint of the eigenvalue $A(\cdot)$ in (9). This eigenvalue can be explicitly computed from (10) which yields,

$$A(\mathbf{V}) = \mu_0 - \beta_0 \frac{\int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx}{\int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx} = \frac{-\tau_0 \mathbf{V} + \mu_0 \int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx}{\int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx}.$$

Eliminating the quantity $\int_0^\infty x \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx = \sqrt{\tau_0 \mathbf{V} / \beta_0}$, we obtain

$$A(\mathbf{V}) = \mu_0 - \sqrt{\tau_0 \beta_0} \mathbf{V}. \tag{16}$$

Notice that it is a decreasing function of \mathbf{V} (this property is in fact crucial in the subsequent analysis).

We recover that the non-zero steady state corresponds to $V_\infty = \mu_0^2 / (\tau_0 \beta_0)$ and, following the constraint (15), it exists if and only if $\gamma \mu_0^2 < \lambda \tau_0 \beta_0$. Then, the mean length of polymers is simply given:

$$\frac{\int_0^\infty x u_\infty(x) dx}{\int_0^\infty u_\infty(x) dx} = \frac{\mu_0}{\beta_0}. \tag{17}$$

From [16], we know that it is globally asymptotically stable. On the contrary, when it does not exist, the zero steady state is globally asymptotically stable.

3. Stability

We have seen previously that there are two possible steady states of the non-linear system (2), setting the alternative between a disease free and an infected system and depending upon the prion production and degradation rates λ, γ . For 'constant coefficients', Greer et al. [16] could study their stability using the possible reduction of the system to three coupled ordinary differential equations driving the macroscopic quantities $(V(t), U(t), P(t))$. Below we investigate the same question for more general coefficients. Our main assumption is the monotonicity property of the eigenvalue (9) which has been discussed above. This assumption is expected to be satisfied fairly generally (see Fig. 1). We give in Section 3.3 below a class of coefficients for which we can indeed compute the eigenvalue and show that it is indeed decreasing. We set $x_0 = 0$ for the sake of simplicity throughout this section and assume

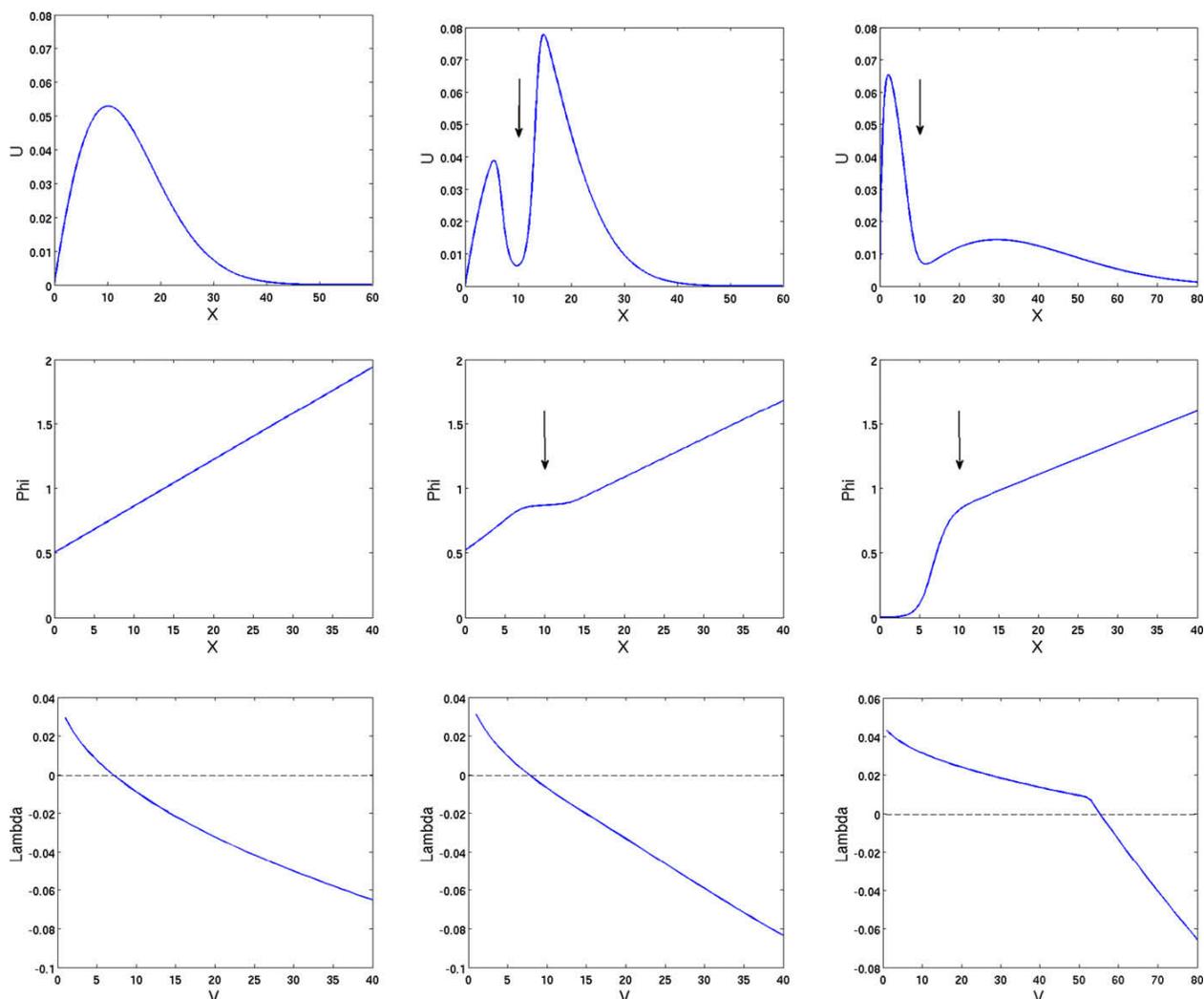


Fig. 1. Eigenvalue problem for the microscopic distribution. (Top) Principal eigenfunction $\mathcal{U}(V; \cdot)$ solution of the problem (9) for respectively, a constant, a bell-shaped and a sigmoidal conversion factor $\tau(x)$. The arrow indicates the location of the sharp transition in the conversion factor $\tau(x)$. (Middle) Corresponding adjoint eigenfunction $\varphi(V; \cdot)$ solution of the problem (19). Notice that it is in any case an increasing function, as assumed in Section 3. (Bottom) Principal eigenvalue $\Lambda(\cdot)$ as a function of the PrPc (frozen) level \mathbf{V} . Observe that it is in any case a decreasing function, as assumed in Section 3. Coefficients are $\mu(x) \equiv 5 \times 10^{-2}$, $\beta(x) = 3 \times 10^{-2}x$, and respectively, $\tau(x) \equiv 1 \times 10^{-2}$, $\tau(x) = 1 \times 10^{-2} + 1 \times 10^{-1}e^{-(x-10)^{2/4}}$ and $\tau(x) = 1 \times 10^{-3} + 5 \times 10^{-2}e^{x-10}/(1 + e^{x-10})$. For the top and middle figures we set $\mathbf{V} = \bar{\mathbf{V}} = 600$. Values are quoted from [12].

The eigenvalue $\Lambda(\cdot)$ is a decreasing function of the (frozen) PrPc level \mathbf{V} . (18)

The adjoint problem. It emerges from the Generalized Relative Entropy method that the adjoint eigenvalue problem plays a central role when computing evolution of linearized problems, e.g. it defines the invariant measure of equation [33,35]. As such it enters as a natural weight for various estimates. This problem reads as the following adjoint equation for the adjoint eigenfunction $\varphi(\mathbf{V}, x)$,

$$\begin{cases} -\mathbf{V}\tau(x)\frac{\partial}{\partial x}\varphi(\mathbf{V};x) + (\mu(x) + \beta(x))\varphi(\mathbf{V};x) \\ -2\int_0^x \beta(x)\kappa(y,x)\varphi(\mathbf{V};y)dy = \Lambda(\mathbf{V})\varphi(\mathbf{V};x) \\ \varphi(\mathbf{V};x) \geq 0, \int_0^\infty \mathcal{U}(\mathbf{V};x)\varphi(\mathbf{V};x)dx = 1. \end{cases} \quad (19)$$

The existence theory for such a problem has been addressed in [35] and we do not consider the question of existence problem. We state a series of useful (and reasonable) assumptions concerning this adjoint problem for computing purposes. Recall the notation $\bar{\mathbf{V}} = \lambda/\gamma$

for the PrPc level at the disease free state (11). Recall also that the PrPc level at the conditional infected steady state, denoted as V_∞ , is defined by $\Lambda(V_\infty) = 0$ according to (14). We denote $\bar{\varphi} = \varphi(\bar{\mathbf{V}}; \cdot)$ and assume that there are two constants K_1 and K_2 such that

$$\left| \tau(x)\frac{\partial}{\partial x}\bar{\varphi}(x) \right| \leq K_1\bar{\varphi}(x), \quad \text{and} \quad \tau(x) \leq K_2\bar{\varphi}(x). \quad (20)$$

This assumption generally holds true because $\bar{\varphi}$ grows linearly at infinity according to general abstract properties proved in [33,35,41]. See Fig. 1 and Section 3.3 for explicit examples.

3.1. Stability of the zero state for $\bar{\mathbf{V}} < V_\infty$

We first tackle the stability of the disease free steady state.

Theorem 1 (Local stability). *Suppose that assumptions (18) and (20) hold true. Assume that $\bar{\mathbf{V}} < V_\infty$. Then, in equation (2), the zero steady state $(\bar{\mathbf{V}}, 0)$ is locally non-linearly stable.*

We recall that in the case at hand ($\bar{V} < V_\infty$), there does not exist a non-zero steady state because (15) cannot be fulfilled with $\varrho_\infty > 0$.

Proof. According to Assumption (18), the condition $\bar{V} < V_\infty$ ensures that $\Lambda(\bar{V}) > 0$. We consider a perturbation of the ground state $V(t) = \bar{V} + \tilde{V}(t)$ and $u(x, t) = 0 + \tilde{u}(x, t)$ (note that \tilde{u} is non-negative following the well-posedness theory in [36,37], whereas we have no information concerning the sign of \tilde{V} a priori).

Because $\bar{V} = \lambda/\gamma$, the non-linear system for this perturbation writes

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} \tilde{V}(t) = -\tilde{V}(t)(\gamma + \int_0^\infty \tau(x)\tilde{u}(x, t) dx) - \bar{V} \int_0^\infty \tau(x)\tilde{u}(x, t) dx, \\ \frac{\partial}{\partial t} \tilde{u}(x, t) = -\bar{V} \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x)\tilde{u}(x, t)) - \tilde{V}(t) \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x)\tilde{u}(x, t)) \\ \quad - (\mu(x) + \beta(x))\tilde{u}(x, t) + 2 \int_x^\infty \beta(y)\kappa(x, y)\tilde{u}(y, t) dy. \end{cases} \quad (21)$$

Following the duality method in [42], we test the equation on \tilde{u} in (21) against the adjoint eigenfunction $\bar{\varphi}$:

$$\frac{d}{dt} \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx = -\Lambda(\bar{V}) \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + \tilde{V}(t) \times \int_0^\infty \left(\frac{\partial}{\partial x} \bar{\varphi}(x) \right) \tau(x)\tilde{u}(x, t) dx.$$

On the other hand, multiplying the first differential equation in (21) by the sign of \tilde{V} , we get:

$$\frac{d}{dt} |\tilde{V}(t)| \leq -|\tilde{V}(t)| \left(\gamma + \int_0^\infty \tau(x)\tilde{u}(x, t) dx \right) + \bar{V} \int_0^\infty \tau(x)\tilde{u}(x, t) dx.$$

We obtain, choosing α large enough such that $\delta := \Lambda(\bar{V}) - K_2\bar{V}/\alpha > 0$,

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right) &\leq -\alpha\Lambda(\bar{V}) \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + \alpha K_1 |\tilde{V}(t)| \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx \\ &\quad - \gamma |\tilde{V}(t)| - |\tilde{V}(t)| \int_0^\infty \tau(x)\tilde{u}(x) + K_2\bar{V} \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx \\ &\leq -\min \left(\Lambda(\bar{V}) - \frac{K_2\bar{V}}{\alpha}, \gamma \right) \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right) \\ &\quad + \alpha K_1 |\tilde{V}(t)| \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx \leq -\min(\delta, \gamma) \\ &\quad \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right) + \frac{K_1}{2} \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right)^2. \end{aligned}$$

From this differential equation we conclude that, when $\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)|$ is initially small enough, then the right-hand side is negative. Therefore, it decays for all times with the asymptotic exponential rate

$$\left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right) \leq C_\varepsilon e^{-(\min(\delta, \gamma) - \varepsilon)t} \quad \forall \varepsilon > 0. \quad \square$$

We can also state the following variant of Theorem 1 under stronger assumptions.

Theorem 2 (Global stability). *Additionally to the hypotheses of Theorem 1, assume that $\tau(x) \geq k\bar{\varphi}(x)$ for some constant $k > 0$ and that $\bar{V}/\Lambda(\bar{V})$ is small enough compared to $k/(K_1K_2)$. Then, in equation (2), the zero steady state $(\bar{V}, 0)$ is globally non-linearly stable. In other words all solutions get extinct.*

As opposed to those of Theorem 1, the assumptions of Theorem 2 are difficult to check directly because the coefficients are intricate here. They mean that we are close to the case

$\mu(x) \equiv \mu_0, \beta(x) \equiv \beta_1$ and $\tau(x) \equiv \tau_0$ because $\bar{\varphi}$ is constant in this case and therefore we can choose $K_1 = 0$ in Assumption (20) (see Section 3.3).

Proof. With these additional assumptions, we may keep one negative term in the last computation and arrive to,

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right) &\leq -\alpha\Lambda(\bar{V}) \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + \alpha K_1 |\tilde{V}(t)| \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx \\ &\quad - \gamma |\tilde{V}(t)| - |\tilde{V}(t)| \int_0^\infty \tau(x)\tilde{u}(x, t) + K_2\bar{V} \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx \leq -\min \\ &\quad \times \left(\Lambda(\bar{V}) - \frac{K_2\bar{V}}{\alpha}, \gamma \right) \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right) \\ &\quad + (\alpha K_1 - k) |\tilde{V}(t)| \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx \leq -\min \left(\Lambda(\bar{V}) - \frac{K_2\bar{V}}{\alpha}, \gamma \right) \\ &\quad \times \left(\alpha \int_0^\infty \tilde{u}(x, t)\bar{\varphi}(x) dx + |\tilde{V}(t)| \right). \end{aligned}$$

This last inequality will hold if we can find $\alpha > K_2\bar{V}/\Lambda(\bar{V})$ such that $\alpha K_1 < k$, which is precisely our smallness assumption. Then we have exponential decay of the solution. \square

3.2. Persistence for $\bar{V} > V_\infty$

The same kind of method allows us to study the opposite case when another steady state exists. In this case we prove that the solution cannot go extinct using an argument initiated in [42]. We have the following theorem.

Theorem 3 (Instability, persistence). *Suppose again that assumptions (18) and (20) hold true. Assume that $V_\infty < \bar{V}$. Then the zero steady state $(\bar{V}, 0)$ is unstable in the sense that solutions cannot stay near $(\bar{V}, 0)$ for long times.*

Assume in addition that $K_1\bar{V} < \Lambda(\bar{V}) + \gamma$ and that the initial perturbation satisfies $V(0) \leq \bar{V}$, then the solution persists: namely V stays away \bar{V} and $\int_0^\infty u(t, x) dx$ stays away from 0 uniformly in time.

Proof. We use the notations $v(t) = \bar{V} - V(t)$ and $w(t) = \int_0^\infty u(x, t)\bar{\varphi}(x) dx$ and the assumption $V_\infty < \bar{V}$ leads to $\Lambda(\bar{V}) < 0$.

To prove the first statement, we introduce ε_0 such that

$$\frac{2K_1K_2\varepsilon_0\bar{V}}{\gamma + K_2\varepsilon_0} \leq |\Lambda(\bar{V})|. \quad (22)$$

We shall prove that the subset

$$\mathcal{S}_\varepsilon = \left\{ (V, u) : |\bar{V} - V| < \frac{K_2\varepsilon\bar{V}}{\gamma + K_2\varepsilon} \text{ and } \int_0^\infty u(x)\bar{\varphi}(x) dx < \varepsilon \right\}$$

is not stabilized across the trajectories of (2) for any $\varepsilon < \varepsilon_0$. Following the proof of Theorem 1, we have on the one hand

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} v(t) + \gamma v(t) &= V(t) \int_0^\infty \tau(x)u(x, t) dx, \\ 0 &\leq \int_0^\infty \tau(x)u(x, t) dx \leq K_2w(t). \end{aligned} \quad (23)$$

Consequently, for trajectories that remain in the set \mathcal{S}_ε on the time interval $[t_0, t]$, we obtain the following estimate

$$0 \leq \frac{d}{dt} v(t) + \gamma v(t) \leq -K_2\varepsilon v(t) + K_2\varepsilon\bar{V},$$

and thus

$$v(t_0)e^{-\gamma(t-t_0)} \leq v(t) \leq v(t_0)e^{-(\gamma+K_2\varepsilon)(t-t_0)} + \frac{K_2\varepsilon\bar{V}}{\gamma+K_2\varepsilon}, \quad |v(t)| < \frac{2K_2\varepsilon\bar{V}}{\gamma+K_2\varepsilon}.$$

On the other hand, we can again combine the equation(19) defining the adjoint eigenfunction $\bar{\varphi}$ and the equation in (2) driving u , to obtain

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}w(t) &= -v(t) \int_0^\infty \tau(x) \frac{\partial}{\partial x} \bar{\varphi}(x)u(x,t) dx + |\Lambda(\bar{V})|w(t) \\ &\geq -K_1|v(t)|w(t) + |\Lambda(\bar{V})|w(t) \\ &\geq \left(-\frac{2K_1K_2\varepsilon\bar{V}}{\gamma+K_2\varepsilon} + |\Lambda(\bar{V})| \right)w(t) \\ &\geq 2K_1K_2\bar{V} \left(\frac{\varepsilon_0}{\gamma+K_2\varepsilon_0} - \frac{\varepsilon}{\gamma+K_2\varepsilon} \right)w(t). \end{aligned} \tag{24}$$

Consequently, for $\varepsilon < \varepsilon_0$, the exponential growth induced by the differential inequality shows there is no way to ensure the condition $\int_0^\infty u(x,t)\bar{\varphi}(x) dx < \varepsilon$ for long time intervals. This proves the first statement.

In order to prove persistence of the solution, first examine (23); from the additional condition $V(0) \leq \bar{V}$ we obtain that $v(t) > 0$ for all positive times. We can rewrite (23) and (24) as

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}v(t) \leq -\gamma v(t) + K_2\bar{V}w(t), \\ \frac{d}{dt}w(t) \geq [-K_1v(t) + |\Lambda(\bar{V})|]w(t). \end{cases}$$

Introduce the notation $\delta = \Lambda(\bar{V}) + \gamma - K_1\bar{V} > 0$. We compute the evolution of the ration between v and w :

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left(\frac{w(t)}{v(t)} \right) &\geq \frac{w(t)}{v(t)} \left(-K_1v(t) + |\Lambda(\bar{V})| + \gamma - K_2\bar{V} \frac{w(t)}{v(t)} \right) \\ &\geq \frac{w(t)}{v(t)} \left(\delta - K_2\bar{V} \frac{w(t)}{v(t)} \right), \end{aligned}$$

from which we deduce the uniform bound from below: $w(t)/v(t) \geq \min(w(0)/v(0), \delta/(K_2\bar{V}))$. Notice that $w(t)$ lies asymptotically above δ/\bar{V} . Consequently we have,

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}w(t) &\geq w(t) \left(|\Lambda(\bar{V})| - \frac{K_1}{\min(w(0)/v(0), \delta/(K_2\bar{V}))} w(t) \right), \\ w(t) &\geq \min \left(w(0), \frac{|\Lambda(\bar{V})| \min(w(0)/v(0), \delta/(K_2\bar{V}))}{K_1} \right). \end{aligned}$$

Therefore, the initial perturbation persists away from the disease-free stationary state. \square

3.3. A class of examples

In order to clarify the assumptions and properties stated before, we give a class of coefficients in equation (2) where the different eigenlements can be explicitly computed. In each case we will see that $\Lambda(\mathbf{V})$ is indeed a decreasing function of \mathbf{V} (Assumption (18), and that Assumption (20) reduces to the fact that $\tau(x)$ is bounded.

We first report from [33,41] the case where $\tau(x) \equiv \tau_0, \mu(x) \equiv \mu_0$ and $\beta(x) \equiv \beta_1$ are constants. We obtain the solution to the adjoint problem (19),

$$\Lambda(\mathbf{V}) = \beta_1, \quad \varphi(\mathbf{V}; x) \equiv 1.$$

The eigenlements are usually difficult to evaluate in the direct problem (9) but can be easily computed in the adjoint equation (19). Indeed, searching for an affine solution $\varphi(\mathbf{V}; x) = 1 + x/L$, we find, using the structure properties of $\kappa(x, y)$ (3),

$$-\frac{\mathbf{V}\tau(x)}{L} + \mu(x) \left(1 + \frac{x}{L} \right) - \beta(x) = \Lambda(\mathbf{V}) \left(1 + \frac{x}{L} \right). \tag{25}$$

Hence another class where one can compute $\Lambda(V)$ corresponds to $\beta(x) = \beta_0x$, and $\tau(x) \equiv \tau_0, \mu(x) \equiv \mu_0$ are constant (the 'constant coefficients case'). We get first

$$-\beta_0L^2 + \tau_0\mathbf{V} = 0.$$

Therefore, we obtain $L(\mathbf{V}) = \sqrt{\tau_0\mathbf{V}/\beta_0}$ and $\Lambda(\mathbf{V}) = \mu_0 - \beta_0L(\mathbf{V})$, as in Section 2. Observe that $\Lambda(\mathbf{V})$ is a decreasing function of \mathbf{V} as asserted in Assumption (18).

We leave to the reader to check that $\Lambda(\mathbf{V})$ is also decreasing for the more general situation where $\beta(x) = \beta_1 + \beta_0x, \tau(x) = \tau_0 + \tau_1x$ and $\mu(x) \equiv \mu_0$ is constant. Indeed we deduce from (25) the following two relations:

$$\Lambda(\mathbf{V}) - \mu_0 + \frac{\mathbf{V}\tau_0}{L} + \beta_1 = 0, \quad \text{and} \quad \frac{\Lambda(\mathbf{V}) - \mu_0}{L} + \frac{\mathbf{V}\tau_1}{L} + \beta_0 = 0.$$

And thus $Z = \Lambda(\mathbf{V}) - \mu_0$ solves

$$(Z + \beta_1)(Z + \mathbf{V}\tau_1) = \mathbf{V}\tau_0\beta_0, \quad Z + \beta_1, Z + \mathbf{V}\tau_1 < 0,$$

the last constraint being due to the condition $L > 0$.

More generally, observe from (10) that the following conditions are fulfilled:

$$\Lambda(0) = \mu_0, \quad \Lambda(\mathbf{V}) \leq \mu_0.$$

Notice that the problem for $\mathbf{V} = 0$ is degenerate and that the eigenfunction is singular at $x = 0$ [32].

On the other hand, we deduce for the same reason that, if $\min \tau(x)/x > 0$, then we have

$$\Lambda(\infty) = -\infty.$$

Consequently there exists at least one non-zero steady state.

4. Non-constant conversion rate and PrPsc aggregate size-distribution

The microscopic parameters of the model are quite difficult to assess experimentally, whereas the macroscopic outputs of our model (i.e. namely the kinetics of PrPsc accumulation or the PrPsc aggregate repartition according to their size) can be obtained more easily. We aim to gain some insight into reasonable scenarios for the converting activity through a macroscopic procedure. In particular we aim to understand how the conversion factor $\tau(x)$ may depend upon the aggregate size. This question is fully motivated by recent studies which clearly account for such an influence of the polymer length [20,27]. Since the actual size distribution of the conversion factor $\tau(x)$ is still unknown, several size dependences have been tested and are depicted in Fig. 2.

4.1. Total PrPsc accumulation

First, we can observe in Fig. 2 that for a given initial PrPsc aggregate size, kinetic PrPsc accumulation profiles (i.e. $P(t)$) are similar, and thus, cannot be used to distinguish between a constant, a bell-shaped or a sigmoidal conversion factor $\tau(x)$ (all the other coefficients remaining equal).

We have also load the evolution problem (2) with a very peculiar initial condition being localized at a given length y_0 , with a normalized quantity of PrPsc. The total amount of PrPsc obtained in a fixed time is depicted in Fig. 3. This procedure mimics the experi-

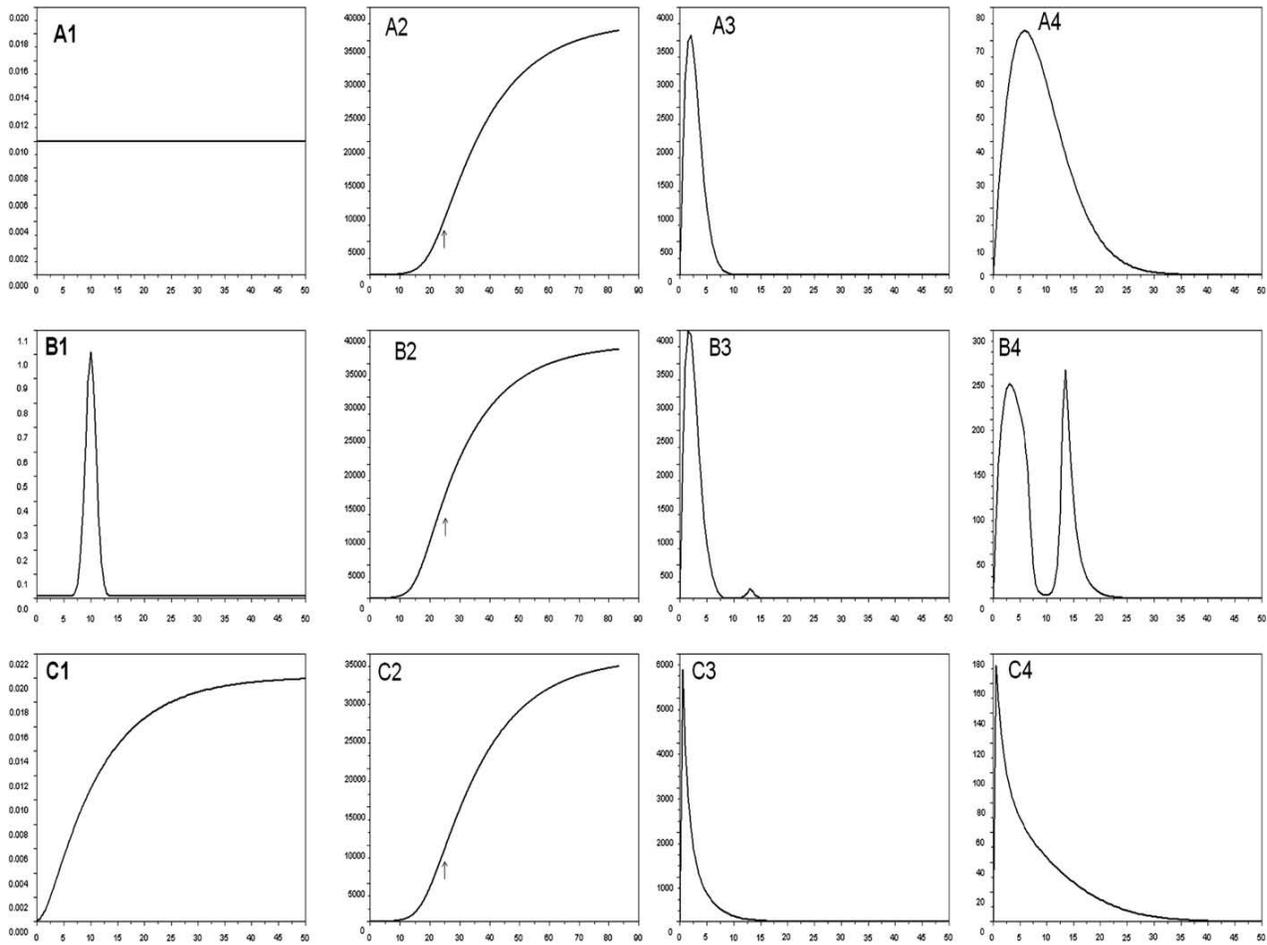


Fig. 2. Prion replication for various size-dependent conversion rate $\tau(x)$. Three different shapes are depicted here: (A) a constant conversion rate $\tau = 0.01$, (B) a bell-shaped conversion rate $\tau = 0.01 + \exp(-0.5 \times x - 10)^2$ and (C) a sigmoidal conversion rate $\tau = 0.0001 + 0.02 \times (1 + 1/(10 - 2) \times (2 \times \exp(-x/2) - 10 \times \exp(-x/10)))$, where x stands for aggregate size. The other parameters are kept constant and have been quoted from Rubenstein et al. [12]: $\lambda = 2400$ per day, $\gamma = 4$ per day, $\mu = 0.047$ per day, and $\beta = 0.03 \times x$ per day. (A1, B1, C1) Size distribution of τ (abscissa = PrPsc aggregates size; ordinate = rate τ). (A2, B2, C2) Time evolution of total PrPsc amount (abscissa = time (in days); ordinate = PrPsc (per day)). The arrow represents time $t=25$ days, the end of the exponential phase of growth of PrPsc. (A3, B3, C3) PrPsc aggregates size distribution at equilibrium (abscissa = PrPsc aggregates size; ordinate = PrPsc aggregates number). (A4, B4, C4) PrPsc aggregates size distribution at $t=25$ days (abscissa = PrPsc aggregates size; ordinate = PrPsc aggregates number).

mental protocol used in [20] to study the size distribution of converting activity.

In case of a conversion factor $\tau(x) \equiv \tau_0$ independent of the aggregate size, the guess is simple: the more numerous are the polymers (that is the smaller is the common length y_0), the more efficient is the infection at the early stage (in the pre-exponential phase). When increasing y_0 (the total mass of PrPsc being fixed), it takes some time to fragment large aggregates into smaller ones, and the dynamics are delayed before the eventual alignment along the principal eigenfunction (in the exponential phase). This can be viewed in Fig. 3 (left).

However, in case of a sigmoidal conversion factor, the qualitative behavior is dramatically different. When increasing the initial aggregates' size, the infection goes through a maximal efficiency for an intermediate length (Fig. 3). This is due to the inhomogeneous converting activity: it balances the disadvantage of having less but larger polymers (the total mass of PrPsc being fixed). In case of a bell shaped conversion factor, one can also observe such a qualitative behavior, to a less extent (data not shown). These data strongly resemble to those obtained experi-

mentally in [20], and confirm that a constant extension rate seems unlikely to occur.

4.2. PrPsc size-distribution

Direct numerical simulations show that the PrPsc size-distribution is mainly affected by a non-constant conversion rate $\tau(x)$ (at the equilibrium as in the exponential growth, see Fig. 2), a fact that cannot be observed on the accumulation profiles. Therefore, we analyze how it is possible to extract information from the size distribution.

4.2.1. A differential formulation

Recall from Section 2 that the infected steady state (V_∞, u_∞) is realized as the principal eigenfunction corresponding to the unique root of $A(\cdot)$. In this paragraph we present an alternative (simpler) formulation of the stationary problem (13), based on a second order differential equation. Note that we strongly use the peculiar choice for the fragmentation kernel $\kappa(x, y)$ (7).

Differentiating the equation for the microscopic distribution (13) we obtain,

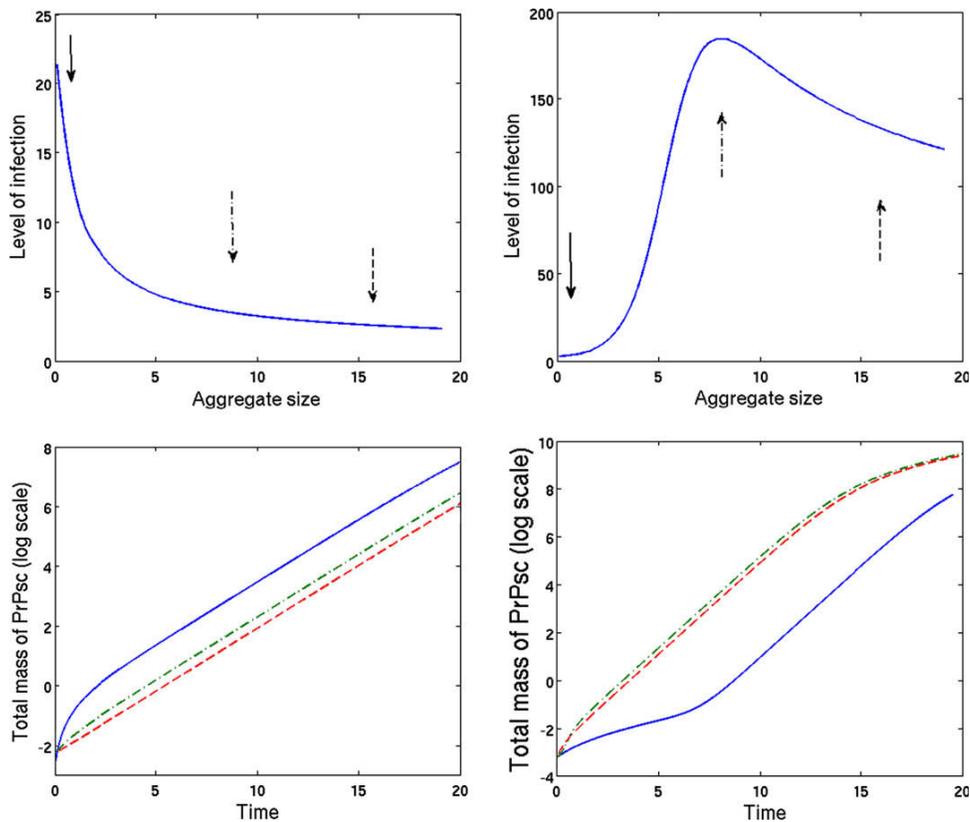


Fig. 3. In silico experiments to capture the features of the conversion factor. (Top) We report the quantity of PrPsc for a reference time t^* in the exponential phase ('level of infection'), as a function of the initial aggregate size (in the numerical experiments, all polymers have the same length initially, for a normalized total mass of PrPsc). (Left) In case of a constant conversion rate $\tau(x) \equiv 1 \times 10^{-2}$, this illustrates the delay in the infection dynamics that occurs when increasing initial size. (Right) In case of a sigmoidal conversion rate $\tau(x) = 1 \times 10^{-3} + 5 \times 10^{-2} e^{x-10} / (1 + e^{x-10})$, the dynamics reach a maximal efficiency for intermediate sizes. (Bottom) Time evolution of the total mass of PrPsc (log scale) for three different sizes of initial aggregates corresponding to the two preceding scenarios: $y_0 = 1$ (full line), $y_0 = 8$ (dashed line), $y_0 = 16$ (dash-dotted line). One clearly distinguishes the different phases: pre-exponential phase (dynamics of the linearized system (12)), exponential phase (microscopic distribution aligned along the principal eigenfunction). . . The fragmentation rate is $\beta(x) \equiv 3 \times 10^{-2} x$ and the degradation rate is $\mu(x) \equiv 0$ to avoid the artifact of large aggregates being rapidly degraded (in fact this is a minor effect: one can choose $\mu(x) \equiv 5 \times 10^{-2}$, data not shown).

$$\begin{aligned}
 V_\infty \frac{d^2}{dx^2} (\tau(x) u_\infty(x)) + \frac{d}{dx} ((\mu(x) + \beta(x)) u_\infty(x)) &= \frac{d}{dx} \left(2 \int_x^\infty \beta(y) \frac{1}{y} u_\infty(y) dy \right), \\
 V_\infty \frac{d^2}{dx^2} (\tau(x) u_\infty(x)) + \frac{d}{dx} ((\mu(x) + \beta(x)) u_\infty(x)) + 2 \frac{\beta(x)}{x} u_\infty(x) &= 0.
 \end{aligned}
 \tag{26}$$

This differential equation is complemented by the boundary conditions,

$$u_\infty(x_0) = 0, \quad V_\infty \frac{d}{dx} \Big|_{x=x_0} (\tau(x) u_\infty(x)) = 2 \int_{x_0}^\infty \frac{\beta(y)}{y} u_\infty(y) dy. \tag{27}$$

The first order initial condition can be replaced by sufficient decay conditions at infinity (for instance, one moment is required for the distribution $u_\infty(x)$, at least). The problems (26) and (27) are linear with respect to u_∞ : the missing factor ϱ_∞ (namely the total number of polymers) is determined using the first equation of (13), as in Section 2.

The advantages of the differential reformulation (26) are two-folds. Firstly it provides a more efficient numerical scheme to compute the stationary distribution u_∞ because it avoids convolutions. Secondly, it dramatically simplifies the inverse problem (computing the conversion factor $\tau(x)$ from the knowledge of the distribution u_∞). According to (13), one should evaluate the eigenvalue function $\Lambda(\cdot)$, and find the root V_∞ (for example using a robust dichotomy method, based on the decreasing property of $\Lambda(\cdot)$).

Alternatively, one can perform a shooting method to solve (26), matching the required decay at infinity for instance. On the other hand, the inverse problem which consists in finding $\tau(x)$ from the stationary distribution $u_\infty(x)$ (given the other coefficients $V_\infty, \mu(x)$ and $\beta(x)$) can be solved explicitly, integrating twice (26). However, one shall take care of the decay conditions at infinity when integrating by parts.

In some particular situations, simple mathematical considerations based on the reformulation (26) allow us to deduce some qualitative information relating the microscopic distribution and the conversion factor $\tau(x)$. In this paragraph we assume $\mu(x) \equiv \mu_0$ and $\beta(x) = \beta_0 x$ for the sake of clarity.

The second order formulation (26) is reminiscent of the standard one-dimensional Fokker-Planck equation. In fact, if we drop the last term of order 0, it becomes

$$V_\infty \frac{d}{dx} \left(\tau(x) \frac{d}{dx} v(x) \right) + \frac{d}{dx} (v(x) \frac{d}{dx} \psi(x)) = 0,$$

where v denotes the unknown (instead of u_∞ to avoid confusions). This accounts for an inhomogeneous diffusion with an effective confinement potential given by $\psi(x) = V_\infty \tau(x) + \mu_0 x + \frac{1}{2} \beta_0 x^2$ and its solution is $v(x) = v_0 e^{\phi(x)}$ with $\phi'(x) = -\psi'(x) / (V_\infty \tau(x))$. In the case of a sharp bell function $\tau(x)$ one can clearly see the splitting effect of the 'potential' $\tau(x)$ in comparison to the 'constant coefficients

case' which reduces to a gaussian distribution: the natural expectation is thus a bimodal distribution.

We can go further and find necessary conditions on τ leading to a bimodal microscopic distribution u_∞ , i.e. the distribution has two peaks, as in Fig. 1 (top)). We evaluate the derivatives in the microscopic equilibrium equation (26),

$$V_\infty \left(\tau(x) \frac{d^2}{dx^2} u_\infty(x) + 2 \frac{d}{dx} \tau(x) \frac{d}{dx} u_\infty(x) + \frac{d^2}{dx^2} \tau(x) u_\infty(x) \right) \\ \mu_0 \frac{d}{dx} u_\infty(x) + \beta_0 x \frac{d}{dx} u_\infty(x) = -3\beta_0 u_\infty(x).$$

A bimodal size distribution u_∞ possesses a critical point x^* where it is convex. Evaluating above expression at x^* leads to $V_\infty \tau_{xx}(x^*) u_\infty(x^*) < -3\beta_0 u_\infty(x^*)$. A necessary condition on $\tau(x)$ for the existence of such a critical point is therefore

$$\inf_{x>0} V_\infty \frac{d^2}{dx^2} \tau(x) < -3\beta_0.$$

It is rather intricate because V_∞ itself depends on $\tau(x)$. But it gives a first insight of the desirable conditions, meaning that $\tau(x)$ should have a peak which is concave enough.

4.3. Size distribution and strain adaptation

The analysis performed above is mainly interested in long-time dynamics resulting in an equilibrium. However, during the time course of incubation period and clinical stage of prion diseases, PrPsc accumulation in brain seems to follow an exponential dynamic until the death. Consequently, we focus here on the dynamic of PrPsc size distribution in the early stages of the polymerization process named 'exponential phase'. As mentioned in Section 2, for a given level of V , we expect that the PrPsc size distribution tends to align along the eigenfunction $\mathcal{U}(V; x)$ (the 'exponential phase'). But when the initial distribution of polymers is not proportional to this eigenfunction, it induces some delay for this distribution to reach the appropriate shape, which slows down the process of prion accumulation (the 'pre-exponential phase').

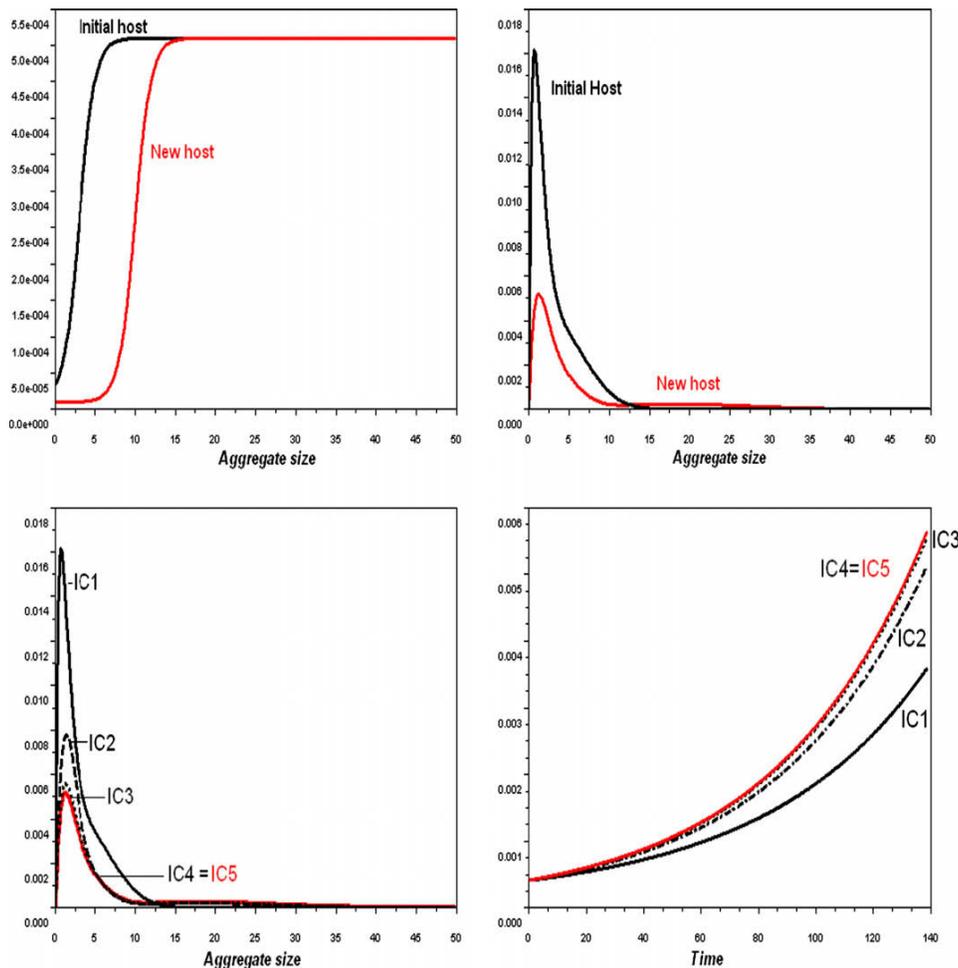


Fig. 4. Prion strain adaptation. A strain is passed from one specie, to another one. It is supposed here that changing the host leads to different conversion and fragmentation rates, the other model parameters being equal. The effect is to significantly change the size distributions. (Top, left) Size distribution of the conversion rate. (Top, right) Corresponding preferential size distribution, i.e. the eigenfunction $\mathcal{U}(V_\infty; x)$. (Bottom, left) Five initial PrPsc size-distributions have been tested in the new host. IC1 corresponds to the eigenfunction of the initial host. Each other initial condition (IC) corresponds to the final distribution obtained for the previous IC, normalized to obtain the same initial PrPsc total amount. In each case, V is initially equal to λ/γ , corresponding to the PrPc level without infection (abscissa = PrPc aggregates size; ordinate = PrPc aggregates number). (Bottom, right) Corresponding PrPsc accumulation kinetics (abscissa = time; ordinate = PrPsc total amount). Parameters used for the numerical simulation – Host 1: $\tau = 0.00001 + .0005 \times \exp(x(x-3))/(1 + \exp(x-3))$ per day; $\beta = 0.03x$ per day – Host 2: $\tau = 0.00001 + .0005 \times \exp(x(x-10))/(1 + \exp(x-10))$ per day; $\beta = 0.003x$ per day – Hosts 1 and 2: $\lambda = 2400$ per day, $\gamma = 4$ per day, $\mu = 0$ per day.

This property is clearly observed on numerical simulations and mimics the strain adaptation mechanism, where primary inoculation is associated with more prolonged incubation period than subsequent passages in the same type of hosts [43]. This phenomenon is illustrated in Fig. 4. Indeed, the eigenfunction depends upon the various parameters of the model. In particular, it depends upon the relation between the host and the prion strain as the conversion rate τ and the fragmentation rate β . When a strain is inoculated to a new host, these parameters are changed and this leads to a new eigenfunction in the equation. We can observe on the numerical simulation that the closer is the initial host distribution to the new one, the faster the accumulation is.

5. Conclusion and perspectives

Our motivation for this work is to better understand the mechanism of prion replication by nucleated polymerization. Experiments argue are in favor of size-dependent properties of PrPsc aggregates (from small oligomer to large polymers), such as the identification of distinct morphologies [20,22] or the analysis infectivity. We therefore generalized existing mathematical model of prion replication to take into account aggregate size-dependent parameters, thus extending previous studies [9,16,17]. We made the choice of varying the extension rate τ for several reasons. First, *in vitro* conversion abilities, which is the most direct measure of τ , is heterogeneous with regards to prion aggregates size [27,20]. Furthermore, the hypothesis of a constant extension rate rests on the fibrillar aspect of PrPsc aggregates (i.e. polymerization occurs only at two ends of the polymer) [9,16,17]. However, PrPsc-containing fibrils are supposed to be preparation artifacts [28,29]. The other parameters are also expected to be size dependent, however, the model is rather difficult to attack. For further modifications concerning model (2), we suggest to take into account saturation in the fragmentation rate for large fibrils, as noticed in [20].

First, we have analyzed the stability of the steady states in a general framework. The difficulty arising here is that we cannot reduce the study to a set of Ordinary Differential Equations, as it is the case in [16,18]. Under general assumptions on the coefficients, the asymptotic stability of the healthy state (i.e. no prion aggregates) is established when the PrPc is low. We also prove that this healthy state is unstable when the PrPc production rate is high enough. This is in accordance with the asymptotic stability of the non-zero steady state for 'constant coefficients' proved in [16], even though a perfect dichotomy between the two results is left open in the general case. Biologically, these results can be interpreted as the propensity of PrPsc aggregates to give rise to prion disease depends on the amount of PrPc. This effect is known for prion diseases, where PrPc is necessary for infection [44]. However, in the more general context of understanding why some amyloids are infectious and others are not, it therefore could be useful to investigate the amount of amyloidogenic precursors.

Furthermore, we have investigated numerically in what sense a non-constant conversion rate may influence the mechanism of prion replication. Whereas changing the extension rate shape leads to similar PrPsc accumulation kinetics, the resulting equilibrium size-distributions are qualitatively very different. It is worth noticing that experimental distribution of PrP may not correspond to a steady state of the system since the biological process is dramatically stopped with the animal death. Therefore, the considerations about the stationary distribution might be not biologically relevant. Nevertheless, we also observe different distribution generically along the temporal dynamics.

Based on this dynamics, we have expressed a possible explanation of the prion strain adaptation mechanism. Prion adaptation occurs during subsequent serial passages in the new host and leads

to a reduction (until stabilization) of the incubation period. Nowadays, a large body of the literature suggests that differences between prion strains lie in the diversity of structures of PrPsc aggregates [6,7,43,45–50]. However, the biophysical basis of strain adaptation is not well understood. Here, we just suppose that replicative parameters are different from one host to another one (due to different cofactors or different matches between donor PrPc and PrPsc conformation for instance). We show that progressive changes of the macroscopic PrPsc size distribution only can account for the adaptation. One limit to our approach is that prion strains are not only characterized by a precise incubation time but also by a specific cellular tropism. It would be of interest to introduce some mathematical formalism taking into account cell heterogeneity in the brain and the resulting local PrPsc distributions.

Taken together, our results emphasizes the potential importance of the size distribution of PrPsc aggregates, which could be very informative on prion replication mechanism. Therefore, we have shown that, in particular cases, qualitative shape of size-distribution permits deducing some information about the most converting PrPsc aggregates. These results remain purely theoretical. However, the achievement of experimental size distribution of PrPsc aggregates could allow us to approximate faithfully the inverse problem in order to obtain the size dependence of the conversion rate from the PrPsc repartition. It would therefore be possible to deduce replicative parameters, with no supplementary experiments (such as bioassays to assess incubation time for each aggregate size). Notably, we therefore would be able to determine the most infectious compartments. This knowledge is a critical step for therapeutic perspectives (where PrPsc aggregates have to be stabilized in other compartment) as for diagnostic tools, such protein misfolding amplification (PMCA) [4]. PMCA goal is to quickly synthesize *in vitro* large amounts of PrPsc starting with minute amounts of prions. The yield of this technique is very sensitive to experimental procedures. Then size distribution of infectivity could help to optimize PMCA protocols, notably by adapting incubation and sonication steps to fall into the most converting size compartment of PrPsc aggregates.

Acknowledgments

This work has been achieved during a visit of D.O. within the DEASE project (Marie Curie Early Stage Training multi-Site (mEST) of the EU, MEST-CT-2005-021122).

We would like to sincerely thank J. Silveira, A. Hughson and B. Caughey for their experimental data about PrP distribution. We are also grateful to M. Doumic for fruitful discussions. This work would not have been achieved without the help of H. Zaag.

References

- [1] A. Aguzzi, Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis, *J. Neurochem.* 97 (2006) 1726.
- [2] S.B. Prusiner, M.R. Scott, S.J. DeArmond, F.E. Cohen, Prion protein biology, *Cell* 93 (1998) 337.
- [3] G. Legname, I.V. Baskakov, H.-O.B. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, Synthetic mammalian prions, *Science* 305 (2004) 673.
- [4] J. Castilla, P. Saa, C. Hetz, C. Soto, *In vitro* generation of infectious scrapie prions, *Cell* 121 (2005) 195.
- [5] H. Fraser, A.G. Dickinson, Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation, *J. Comp. Pathol.* 83 (1973) 29.
- [6] N.J. Cobb, W.K. Surewicz, Prion strains under the magnifying glass, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 882.
- [7] R. Morales, K. Abid, C. Soto, The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 681.
- [8] M. Eigen, Prionics or the kinetic basis of prion diseases, *Biophys. Chem.* 63 (1996) A1.
- [9] J. Masel, V.A.A. Jansen, M.A. Nowak, Quantifying the kinetic parameters of prion replication, *Biophys. Chem.* 77 (1999) 39.

- [10] D.L. Mobley, D.L. Cox, R.R.P. Singh, R.V. Kulkarni, A. Slepoy, Simulations of oligomeric intermediates in prion diseases, *Biophys. J.* 85 (2003) 2213.
- [11] R.J.H. Payne, D.C. Krakauer, The paradoxical dynamics of prion disease latency, *J. Theoret. Biol.* 191 (1998) 345.
- [12] R. Rubenstein, P.C. Gray, T.J. Cleland, M.S. Piltch, W.S. Hlavacek, R.M. Roberts, J. Ambrosiano, J.-I. Kim, Dynamics of the nucleated polymerization model of prion replication, *Biophys. Chem.* 125 (2007) 360.
- [13] F.E. Cohen, K.M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R.J. Fletterick, S.B. Prusiner, Structural clues to prion replication, *Science* 264 (1) (1994) 530.
- [14] J.T. Jarrett, P.T. Lansbury, Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell* 73 (1993) 1055.
- [15] R.V. Kulkarni, A. Slepoy, R.R. P Singh, D.L. Cox, F. Pazmandi, Theoretical modeling of prion disease incubation, *Biophys. J.* 85 (2003) 707.
- [16] M.L. Greer, L. Pujo-Menjouet, G.F. Webb, A mathematical analysis of the dynamics of prion proliferation, *J. Theoret. Biol.* 242 (2006) 598.
- [17] H. Engler, J. Pruss, G.F. Webb, Analysis of a model for the dynamics of prions II, *J. Math. Anal. Appl.* 324 (2006) 98.
- [18] M.L. Greer, P. Van den Driessche, L. Wang, G.F. Webb, Effects of general incidence and polymer joining on nucleated polymerization in a model of prion proliferation, *SIAM J. Appl. Math.* 68 (1) (2007) 154.
- [19] J. Pruss, L. Pujo-Menjouet, G.F. Webb, R. Zacher, Analysis of a model for the dynamics of prions, *Discrete Cont. Dyn. Syst. Ser. B* 6 (1) (2006) 215.
- [20] J.R. Silveira, G.J. Raymond, A.G. Hughson, E.R. Richard, V.L. Sim, S.F. Hayes, B. Caughey, The most infectious prion protein particles, *Nature* 437 (2005) 257.
- [21] M. Jeffrey, C.M. Goodsir, M.E. Bruce, P.A. McBride, J.R. Fraser, In vivo toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 23 (1997) 93.
- [22] D. El Moustaine, V. Perrier, L. Smeller, R. Lange, J. Torrent, Full-length prion protein aggregates to amyloid fibrils and spherical particles by distinct pathways, *FEBS J.* 275 (2008) 2021.
- [23] A.D. Snow, T.N. Wight, D. Nochlin, Y. Koike, K. Kimata, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Germstmann–Straussler Syndrome, Creutzfeldt–Jakob Disease and Scrapie, *Lab. Invest.* 63 (1990) 601.
- [24] P. Weber, A. Giese, N. Piening, G. Mitteregger, A. Thomzig, M. Beekes, H.A. Kretschmar, Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 257.
- [25] P. Weber, A. Giese, N. Piening, G. Mitteregger, A. Thomzig, M. Beekes, H.A. Kretschmar, Generation of genuine prion infectivity by serial PMCA, *Vet. Microbiol.* 123 (2007) 346.
- [26] P. Weber, L. Reznicek, G. Mitteregger, H. Kretschmar, A. Giese, Differential effects of prion particle size on infectivity in vivo and in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2008) 924.
- [27] B. Caughey, D.A. Kocisko, G.J. Raymond, P.T. Lansbury, Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state, *Chem. Biol.* 2 (1995) 808.
- [28] M.P. McKinley, R.K. Meyer, L. Kenaga, F. Rahbar, R. Cotter, A. Serban, S.B. Prusiner, Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis, *J. Virol.* 65 (1990) 1340.
- [29] J. Tatzelt, D.F. Groth, M. Torchia, S.B. Prusiner, S. J DeArmond, Kinetics of prion protein accumulation in the CNS of mice with experimental scrapie, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (1999) 1242.
- [30] M. Escobedo, P. Laurençot, S. Mischler, Fast reaction limit of the discrete diffusive coagulation–fragmentation equation, *Commun. Partial Differ. Equat.* 28 (2003) 1113.
- [31] P. Laurençot, S. Mischler, From the discrete to the continuous coagulation–fragmentation equations, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh Sect. A* 132 (2002) 1219.
- [32] M. Escobedo, S. Mischler, M. Rodriguez Ricard, On self-similarity and stationary problem for fragmentation and coagulation models, *Ann. Inst. H. Poincaré Anal. Non-Linéaire* 22 (2005) 99.
- [33] B. Perthame, *Transport Equations in Biology: Frontiers In Mathematics*, Birkhäuser, Basel, 2007.
- [34] P. Michel, Existence of a solution to the cell division eigenproblem, *Math. Models Methods Appl. Sci.* 16 (2006) 1125.
- [35] P. Michel, S. Mischler, B. Perthame, General relative entropy inequality: an illustration on growth models, *J. Math. Pure Appl.* 84 (2005) 1235.
- [36] P. Laurençot, C. Walker, Well-posedness for a model of prion proliferation dynamics, *J. Evol. Equ.* 7 (2007) 241.
- [37] G. Simonett, C. Walker, On the solvability of a mathematical model for prion proliferation, *J. Math. Anal. Appl.* 324 (1) (2006) 580.
- [38] C. Walker, Prion proliferation with unbounded polymerization rates, in: *Proceedings of the Sixth Mississippi State – UBA Conference on Differential Equations and Computational Simulations*, Starkville, Mississippi, USA, *Electronics Journal of Differential Equations Conference*, vol. 15, 2007.
- [39] J. Pruss, R. Schnaubelt, R. Zacher, *Mathematische Modelle in der Biologie, Deterministische Homogene Systeme*, Mathematik Kompakt, Birkhauser, Basel, 2008.
- [40] J.A.J. Metz, O. Diekmann, *The Dynamics of Physiologically Structured Populations*, Lecture Notes in Biomathematics, Springer, Berlin, 1986.
- [41] B. Perthame, L. Ryzhik, Exponential decay for the fragmentation or cell-division equation, *J. Differ. Equations* 210 (2005) 155.
- [42] J.A. Carrillo, S. Cuadrado, B. Perthame, Adaptive dynamics via Hamilton–Jacobi approach and entropy methods for a juvenile-adult model, *Math. Biosci.* 205 (2007) 137.
- [43] J. Collinge, A.R. Clarke, A general model of prion strains and their pathogenicity, *Science* 318 (2007) 930.
- [44] H. Bueler, A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, C. Weissmann, Mice devoid of PrP are resistant to scrapie, *Cell* 73 (1993) 1339.
- [45] J. Safar, H. Wille, V. Itri, D. Growth, H. Serban, M. Torchia, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, Eight prion strains have PrPsc molecules with different conformations, *Nat. Med.* 4 (1998) 1157.
- [46] G. Legname, H.-O.B. Nguyen, D. Peretz, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 19105.
- [47] C.J. Sigurdson, K.P. R Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, M. Polymenidou, P. Schwarz, M. Leclerc, P. Hammarstrom, K. Wuthrich, A. Aguzzi, Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers, *Nat. Meth.* 4 (2007) 1023.
- [48] N. Makarava, C.I. Lee, V.G. Ostapchenko, I.V. Baskakov, Highly promiscuous nature of prion polymerization, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 36704.
- [49] A.M. Thackray, L. Hopkins, M.A. Klein, R. Budjoso, Mouse-adapted ovine scrapie prion strains are characterized by diferent cofomers of PrPsc, *J. Virol.* 81 (2007) 12119.
- [50] A. Aguzzi, Unravelling prion strains with cell biology and organic chemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 11.

RESEARCH ARTICLE

Prion dynamics with size dependency—strain phenomena

V. Calvez^{a1}, N. Lenuzza^{be1}, M. Doumic^c, J-P Deslys^b, F. Mouthon^{b2} and B. Perthame^{*cd2}

^aUMPA, ENS-Lyon, 46, allée d'Italie, 69000 Lyon, France; ^bCEA-Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies, Route du Panorama, Bat. 60, 92265 Fontenay-aux-Roses, France; ^cINRIA Paris-Rocquencourt, Bang, BP105, 78153 Le Chesnay Cx, France; ^dUPMC-Paris 6, Laboratoire J.-L. Lions, BC187, 4, pl. Jussieu, 75252 Paris Cx 05, France; ^eEcole Centrale Paris, Laboratoire MAS, Grandes Voies des Vignes, 92295 Chatenay-Malabry, France

(October 2008)

Models for the polymerization process involved in prion self-replication are well established and studied ([10, 13, 26]) in the case where the dynamics coefficients do not depend on the size of polymers. However, several experimental studies indicate that the structure and size of the prion aggregates are determinant for their pathological effect. This motivated the analysis in [4] where the authors take into account size dependent replicative properties of prion aggregates.

We first improve a result concerning the dynamics of prion aggregates when a pathological state exists (high production of the normal protein). Then we study the strain phenomena and more specifically we wonder what specific replicative properties are determinant in strain propagation. We propose to interpret it also as a dynamical property of size repartitions.

Keywords: Prion kinetics, polymerization process, size repartition, duality method, strain phenomena.

AMS Subject Classification: 35B35, 45K05, 92C45

1. Introduction

The prion protein is known to be at the origin of fatal neurodegenerative diseases as Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in human and Bovine Spongiform Encephalopathy in cattle. Even though the detailed mechanism remains mostly unclear, a largely accepted hypothesis suggests the infectious agent is the misfolded form (called PrPsc) of the normal prion protein (PrPc). According to this protein-only hypothesis, abnormal PrPsc can convert PrPc by a still unknown autocatalytic process [25]. Very intriguing in this context is that prion infectious agent can exist under different strains. Prion strains have been initially distinguished by incubation periods and lesion profiles in congenic mice [3, 12]. Nowadays, a large body of literature suggests that differences between prion strains lie in the diversity of PrPsc structure, that can be stably and faithfully propagated (see [6, 21] for reviews). However, it remains poorly understood how these changes in the PrPsc conformation can account for their physiopathological effects [17]. Moreover, transmission of prion diseases between different mammalian species is almost systematically less

*Corresponding author. Email: Benoit.Perthame@upmc.fr; ¹These authors contributed equally to this work; ²These authors contributed equally to supervise this work.

efficient than within a single species [6]. This obstruction has been termed Species Barriers. Early studies argue that barrier resides in PrP primary structure difference between donor and recipient species [24]. However, this issue has been called into question notably by BSE strain capability. Indeed, different strains propagated in the same host may have completely different barriers to another species. Consequently, transmission barrier appears to depend on prion strain specificities [3, 7]. A critical challenge of prion biology consists in understanding how a diversity of strains may exist in the same host (expressing the same PrP molecule) and what structural basis of prion strains determines the strength of the species barrier.

As for many protein misfolding disorders (Alzheimer's disease, Parkinson's disease and many other), misfolded PrPsc has the ability to polymerize and form long aggregates called fibrils. Fibrils can be observed while the transconformation process arises at time and size scales mostly inaccessible to experiments. This is why mathematical models are useful to forecast consequences of modeling assumptions at that scale. Based on fibrillar aggregation, the model which seems by now broadly accepted is the one of nucleated polymerization. In this approach, PrPsc is considered to be a polymeric form of PrPc. Polymers can lengthen by addition of PrPc monomers, and they can replicate by splitting into smaller fragments [10, 13, 26]. It is worth noting that this model leads to a unimodal size distribution of PrP aggregates, which seems to be quite insensitive to small variations of parameters [27]. Greer et al. [14] recently improved the model and include a mean saturation effect by the whole population of polymers onto the lengthening process (called general incidence), and polymer joining (through a Smoluchowski coagulation equation). In all these models, each aggregate has the same behaviour, regardless to its size. However, recent experimental analysis of relation between infectivity and size distribution of PrPsc aggregates (for PrPsc purified from infected brain [28] or for PrPsc produced by PMCA [31, 32]) contradicts this uniform behaviour of PrPsc aggregates. In addition, some complexity in the PrPsc aggregate size distribution is more likely to occur within the real process [28]. This leads to consider a model which can reproduce such a behaviour, and the simplest modeling assumption consists in introducing extension rates that depend on the fibril size [4].

This motivates to use the following model for prion polymerization where $V(t)$ denotes the quantity of PrPc (normal protein), $x \in (0, +\infty)$ denotes the size of aggregates and $u(x, t)$ the density of aggregates of size x ,

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dV(t)}{dt} + V(t) \left[\gamma + \int_0^\infty \tau(x)u(x, t) dx \right] = \lambda, \\ \frac{\partial u(x, t)}{\partial t} + V(t) \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x)u(x, t)) + [\mu(x) + \beta(x)]u(x, t) \\ \qquad \qquad \qquad = 2 \int_x^\infty \beta(y)\kappa(x, y) u(y, t) dy, \\ u(0, t) = 0, \end{array} \right. \quad (1)$$

together with appropriate initial conditions (u^0, V^0) . This is a well established family of models used for describing aggregation, fragmentation in polymers as well as natural production of monomers $V(t)$ (possibly already small aggregates of PrPsc molecules) [10, 13, 14, 16, 26, 29]. Compared to earlier completely discrete models, it has the advantage of taking into account two scales; (i) a small scale (of the order of several PrPsc molecules) for continuous aggregation represented by the x -derivative and (ii) a large scale for the total length of the fibrils represented by the integral term. It can be derived through an asymptotic analysis departing

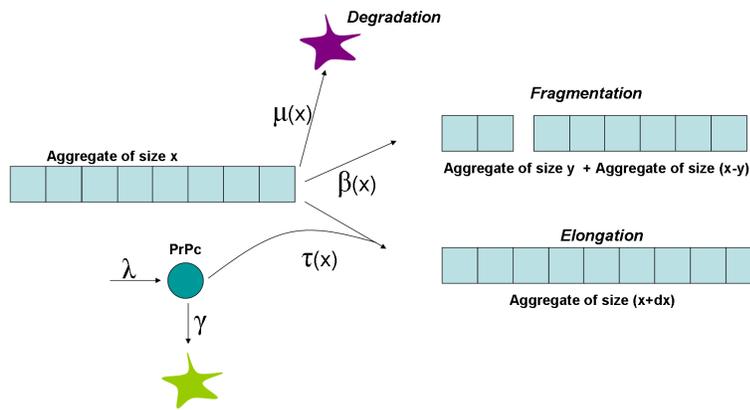


Figure 1. Kinetic model of the prion aggregate growth model based on Figure 2 of Masel et al [39].

from the single PrPsc scale with a discrete model. See [8, 11, 15].

Well-posedness, in the class of weak solutions, has been studied in great generality by [16, 29]. Strong solutions to (1) are built by [10] in the case of 'constant coefficients', *i.e.*, where τ, μ are constant, $\beta(x) = \beta_0 x$ and $\kappa(x, y) = \frac{1}{y} (0 \leq x \leq y)$.

The transport term accounts for the growth in size of polymers: their size grows with the rate $V(t)\tau(x)$, proportional to the available PrPc molecules $V(t)$, with an aggregation ability depending on the size of the polymer (a conceivable hypothesis being that their size confers them a peculiar geometry affecting the autocatalytic process). The fragmentation rate, for a polymer of size y , is $\beta(y) > 0$. The repartition of the two fragments of (smaller) sizes x and $y - x$ is given by $\kappa(x, y) \geq 0$. It should thus satisfy the two usual laws [22] expressing that the number of fragments increases but with constant total molecular mass (recall the factor 2 in the right hand side of (1)):

$$\int_0^y \kappa(x, y) dx = 1, \quad \int_0^y x \kappa(x, y) dx = \frac{y}{2}. \quad (2)$$

This implies that this dynamical system is equipped with two natural balance laws

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} \int_0^\infty u(x, t) dx = \int_0^\infty [\beta(x) - \mu(x)] u(x, t) dx, \\ \frac{d}{dt} \left(V(t) + \int_0^\infty x u(x, t) dx \right) = \lambda - \gamma V(t) - \int_0^\infty x \mu(x) u(x, t) dx. \end{cases} \quad (3)$$

In this study, we aim to continue the work initiated in [4]. Amongst other things, a convincing mathematical model has to reproduce the unusual kinetics of PrPsc accumulation and to be compatible with the strain phenomenon.

In section 2, we address the first question. PrPsc accumulation in brain follows an exponential growth until the death, whereas it invariably reaches a plateau concentration in tissues outside the central nervous system [34, 35]. Thus, the mathematical system must have at least two steady state (one corresponding to the healthy state, and one corresponding to the infection). The question of the existence and the stability of these steady states has been extensively studied in

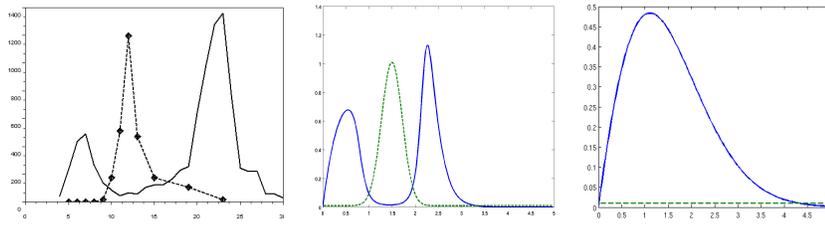


Figure 2. (Left) Experimental analysis of PrPsc aggregates (data have been kindly provided by J. R. Silveira. For details, see [28]). Size-distribution of PrPsc aggregates in a whole infected hamster brain (solid line) and relative specific infectivity of each fraction containing PrPsc aggregates with respect to their size (dotted line). The former corresponds to the quantity $xu(x, t)$, and the latter represents a bell-shaped converting rate $\tau(x)$. These are however undirect measurements after purification and sonication (*i.e.* fragmentation induced by ultrasound). (Center) Size distribution obtained by solving numerically (6) for a suitable bell-shaped converting rate $\tau(x)$ (dotted line), the non-zero steady state solution presents a bimodal shape (solid line). (Right) Size distribution corresponding to 'constant coefficients' in model (1).

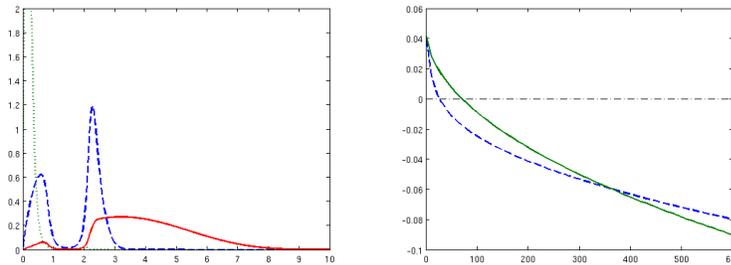


Figure 3. EIGENVALUE PROBLEM FOR THE MICROSCOPIC DISTRIBUTION. (left) Several eigenfunctions are plotted, for V respectively above (full line), below (dotted line), and close to (dashed line) the equilibrium value V_∞ . This is the 'constant coefficient' configuration except for the bell-like converting rate $\tau(x)$. Coefficients' values are given in Section 3. (right) Numerical computation of the eigenvalue function $\Lambda(V)$ for a bell-like function $\tau(x)$ (dashed line) compared to the 'constant coefficients case', where $\Lambda(V) = \mu_0 - \sqrt{\tau_0\beta_0V}$ (full line).

the case of 'constant coefficients' in [10, 13, 14, 26]. Here, as in [4, 8, 9], we are interested in non-constant rates. In such case, the attractivity of the healthy steady state is proved in [4] when λ is small and the infectious steady state does not exist. When the infectious steady state exists, it is not known if it is attractive or if other dynamics such as periodic solutions can exist. Although oscillations are not expected to occur according to experiments, and have not been observed in numerical simulations so far, we are not able to exclude them at the moment. Our first purpose is to give an improved estimate showing that $(u \equiv 0, V = \bar{V})$ is repulsive in the infectious case.

The second question concerning strain mechanism is addressed in section 3. Our purpose is to indicate a route to study possible relations between PrPsc aggregate size distributions as obtained from the model (1) with 'non-constant coefficients' (especially non-constant elongation rate τ) and the strain phenomena described previously. It is based on the dynamical capability of this nonlinear system to generate size repartitions with high complexity and specific properties, notably the bimodal repartition depicted in Figure 2.

2. Mathematical results

2.1. Description of the associated eigenproblem

The eigenproblem associated with the aggregation-fragmentation equation in (1) is useful for the mathematical analysis. For a given $\mathbf{V} > 0$, we denote by $\Lambda(\mathbf{V})$ the first eigenvalue and by $(U(\mathbf{V}; x), \varphi(\mathbf{V}; x))$ resp. the eigenfunction and the adjoint eigenfunction, that are the solutions to

$$\begin{cases} \mathbf{V} \frac{\partial}{\partial x} (\tau(x) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x)) + (\mu(x) + \beta(x)) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) - 2 \int_x^\infty \beta(y) \kappa(x, y) \mathcal{U}(\mathbf{V}; y) dy \\ \hspace{15em} = \Lambda(\mathbf{V}) \mathcal{U}(\mathbf{V}; x), \\ \mathcal{U}(\mathbf{V}; 0) = 0, \quad \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) \geq 0, \quad \int_0^\infty \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) dx = 1. \end{cases} \quad (4)$$

$$\begin{cases} -\mathbf{V} \tau(x) \frac{\partial}{\partial x} \varphi(\mathbf{V}; x) + (\mu(x) + \beta(x)) \varphi(\mathbf{V}; x) - 2 \int_0^x \beta(x) \kappa(y, x) \varphi(\mathbf{V}; y) dy \\ \hspace{15em} = \Lambda(\mathbf{V}) \varphi(\mathbf{V}; x), \quad (5) \\ \varphi(\mathbf{V}; x) \geq 0, \quad \int_0^\infty \mathcal{U}(\mathbf{V}; x) \varphi(\mathbf{V}; x) dx = 1. \end{cases}$$

We remind the reader that the former (4) defines the (opposite of) malthusian factor $\Lambda(\mathbf{V})$, and expresses the fact that whenever the level of PrPc \mathbf{V} is fixed the population of aggregates grows with the exponential rate $\exp(-\Lambda(\mathbf{V})t)$ and with the asymptotic size-distribution $\mathcal{U}(\mathbf{V}; x)$ (see below for further discussion related to the stationary states). The latter (5) has less clear biological interpretation however. It can be viewed as the natural measure that yields an effective mass conservation for the corresponding aggregation-fragmentation Markov process [22].

Although the solutions of (4)-(5) come formally from the Krein-Rutman theorem, the lack of compactness in the problem requires some specific proof (and technical assumptions on the coefficients). In particular we shall pay much attention to the competition between the growth term $\partial_x(\tau(x)\mathcal{U}(x))$ which pushes the distribution away from small sizes and the fragmentation term $\beta(x)\mathcal{U}(x) - 2 \int_x^\infty \beta(y)\kappa(x, y)\mathcal{U}(y) dy$ which drives the distribution back to small sizes. We refer the interested reader to [9] for existence and assume throughout this paper that the coefficients satisfy the following main conditions:

$$\begin{aligned} \int_0^x \kappa(z, y) dy &\leq C \left(\frac{x}{y}\right)^\gamma, \quad \frac{x^\gamma}{\tau(x)} \in L^1([0, A]) \quad \text{for some } \gamma > 0, A > 0, \\ \lim_{x \rightarrow +\infty} \frac{x\beta(x)}{\tau(x)} &= +\infty, \quad \frac{\beta(x)}{\tau(x)} \in L^\infty([0, A]), \end{aligned}$$

associated with a couple of technical assumptions.

Several analytical examples are presented in [4] where it appears naturally that $\Lambda(\mathbf{V})$ should be decreasing. Even though no general proof is available as today, it holds true by continuity when the coefficients do not differ too much from these examples. Also numerics indicate that this property might be true for a large class of transconformation rates $\tau(x)$, including bell-shaped rates, as one can see in Figure 3.

Following [4], the steady states to (1) can now be reformulated in terms of the eigenlements. The so-called 'healthy steady state' corresponds to $(u \equiv 0, v = \bar{V} := \lambda/\gamma)$. More interesting, the 'infectious' steady state (u_∞, V_∞) can exist and corresponds, in (4)–(5), to the relations

$$\Lambda(V_\infty) = 0, \quad u_\infty(x) = \varrho_\infty \mathcal{U}(V_\infty; x), \quad V_\infty = \frac{\lambda}{\gamma + \varrho_\infty \int_0^\infty \tau(x) \mathcal{U}(V_\infty; x) dx}. \quad (6)$$

Accordingly to the above interpretation, it corresponds to a level of PrPc yielding a zero malthusian growth for the aggregates, which is an obvious necessary condition for having a stationary state. Furthermore the profile of the size-distribution at equilibrium is given by the eigenfunction $\mathcal{U}(V_\infty; x)$.

Such a steady state only exists if the prion production λ is high enough so as to choose ϱ_∞ which satisfies the third condition, namely

$$V_\infty < \bar{V} := \frac{\lambda}{\gamma}. \quad (7)$$

The question of the stability of these steady states has been extensively studied in the case of 'constant coefficients', *i.e.*, where τ, μ are constant $\beta(x) = \beta_0 x$ and $\kappa(x, y) = \frac{1}{y} (0 \leq x \leq y)$ in [10, 13, 14, 26]. Then the system can be reduced to a three by three system of ordinary differential equations on $(V(t), \int_0^\infty u(x, t) dx, \int_0^\infty x u(x, t) dx)$. It turns out that the condition (7) is sharp and when λ is small only the healthy steady state exists and is stable. If λ is large enough so that the other steady state exists, it is globally attractive. Here, we are interested in non-constant rates.

2.2. Analysis of stability

Several stability results are proved in [4]. When λ is small the only steady state to (1) is $(0, \bar{V})$, the healthy state, that is proved that it is globally attractive; for any initial data we have $u(t) \rightarrow 0$ as $t \rightarrow \infty$ in L^1 . In the case when there is another steady state (u_∞, V_∞) , the infectious state, it is proved that trajectories cannot come close to the healthy state (persistence). But it is not known if it is attractive or if other dynamics as periodic solutions can exist.

We complete the result in [4] by removing a size condition on some parameters of the system (see below), and replacing it with an assumption on the global boundedness of the number and mean size of aggregates. The main advantages are twofold: this new criterion has a very clear biological interpretation, and moreover it can be obtained through independent estimates as in Theorem 2.1.

In order to state our new persistence result we first prove a uniform bound

Theorem 2.1: *Assume that $\int_0^\infty [1+x]u^0(x)dx < \infty$, $\mu(x) > \underline{\mu} > 0$ and $\beta(x) \leq \theta\mu(x) + C_\beta x$ for some constant $C_\beta \geq 0$ and $\theta < 1$, then the solution $u(t)$ to (1) is uniformly bounded in $L^1((1+x)dx)$.*

The condition on β involves some smallness and we do not know if it can be improved. However it is clear that the mortality rate μ should be large enough otherwise the constant production of monomers is not balanced by any degradation and the system tends to infinity. On the other hand, the case when $\beta(x)$ has sublinear growth is also of interest and corresponds to a well established theory, see [9].

Proof: We combine the two balance laws (3) and for $a > 0$ to be chosen later on,

we calculate

$$\frac{d}{dt} \left(V(t) + \int_0^\infty (a+x)u(x,t) dx \right) + \int_0^\infty [(a+x)\mu(x) - a\beta(x)]u(x,t) dx + \gamma V(t) = \lambda.$$

From our assumption on β , we obtain that

$$\frac{d}{dt} \left(V(t) + \int_0^\infty (a+x)u(x,t) dx \right) + \int_0^\infty [(a(1-\theta)+x)\mu(x) - aC_\beta x]u(x,t) dx + \gamma V(t) \leq \lambda.$$

We now choose a such that $aC_\beta < \underline{\mu}/2$, and we get for some $b > 0$ small enough so that

$$\frac{d}{dt} \left(V(t) + \int_0^\infty (a+x)u(x,t) dx \right) + b \left(V(t) + \int_0^\infty (a+x)u(x,t) dx \right) \leq \lambda.$$

Thanks to the Gronwall lemma, this differential inequality proves the announced boundedness. \square

Our second result improves the persistency argument in [4] and still uses a duality method based on the weight $\bar{\varphi} = \varphi(\bar{V}; \cdot)$. We assume that there are two constants K_1 and K_2 such that

$$\left| \tau(x) \frac{\partial \bar{\varphi}(x)}{\partial x} \right| \leq K_1 \bar{\varphi}(x), \quad \text{and} \quad \tau(x) \leq K_2 \bar{\varphi}(x). \quad (8)$$

This condition generally holds true because $\bar{\varphi}$ grows at most linearly at infinity according to general structure properties proved in [20, 22, 23] and related to the assumption (2).

We have

Theorem 2.2: *We assume that $\Lambda(\bar{V}) < 0$, $V(0) \leq \bar{V}$ and that $\int_0^\infty (1+x)u(t,x)dx$ is uniformly bounded. Then the system remains away from the steady state ($u \equiv 0, \bar{V}$). More precisely we have:*

$$\liminf_{t \rightarrow \infty} \int_0^\infty \bar{\varphi}(x)u(x,t)dx > 0.$$

In comparison with [4, Theorem 3], the peculiar size condition on the coefficients, namely $K_1 \bar{V} < \Lambda(V) + \gamma$ (where K_1 is introduced in (8), has been removed and replaced by the boundedness of the number and size of the polymers.

Proof: For the sake of clarity we introduce the quantities $0 \leq v(t) = \bar{V} - V(t) \leq \bar{V}$ and $w(t) = \int_0^\infty \bar{\varphi}(x)u(x,t)dx$. Testing the system (1) against $\bar{\varphi}(x)$ (5), it implies after integration by parts:

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}v(t) + \gamma v(t) = V(t) \int_0^\infty \tau(x)u(x,t) dx \leq \bar{V}K_2w(t), \\ \frac{d}{dt}w(t) = -v(t) \int_0^\infty \tau(x) \frac{\partial \bar{\varphi}(x)}{\partial x} u(x,t) dx - \Lambda(\bar{V})w(t) \geq (|\Lambda(\bar{V})| - K_1v(t))w(t). \end{cases}$$

Notice also that $v(t)$ cannot vanish in finite time.

Next we consider for some $\alpha > 1$ to be chosen later on, the quantity $y(t) = w(t)v^{-\alpha}(t)$. It satisfies the differential inequality:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{w(t)}{v^\alpha(t)} \right) \geq \frac{w(t)}{v^\alpha(t)} (|\Lambda(\bar{V})| - K_1 v(t)) - \alpha \frac{w(t)}{v^\alpha(t)} \left(-\gamma + \bar{V} K_2 \frac{w(t)}{v(t)} \right),$$

and we now choose α large enough so that $\delta = \alpha\gamma + \Lambda(\bar{V}) - K_1\bar{V} > 0$. This leads to the system of differential inequalities:

$$\begin{cases} \frac{dy(t)}{dt} \geq y(t) \left[\delta - \alpha K_2 \bar{V} y^{1/\alpha} w^{1-1/\alpha} \right], \\ \frac{dw(t)}{dt} \geq w(t) \left[|\Lambda(\bar{V})| - K_1 \left(\frac{w}{y} \right)^{1/\alpha} \right]. \end{cases} \tag{9}$$

We denote by $\bar{w} = \limsup_{t \rightarrow \infty} w(t)$, which is finite thanks to our global boundness on $u(x, t)$ because $\bar{\varphi}$ has sublinear growth at infinity. Then, the first differential inequality on $y(t)$ tells us that,

$$\underline{y} := \liminf_{t \rightarrow \infty} y(t) \geq \delta / (\alpha K_2 \bar{V} \bar{w}^{1-1/\alpha}) > 0.$$

And then, we deduce from the second inequality that $\liminf_{t \rightarrow \infty} w(t) \geq |\Lambda(\bar{V})|^\alpha K_1^{-\alpha} \underline{y}$ and the proof is completed. \square

Notice that we need the *a priori* knowledge that $w(t)$ is upper bounded in order to obtain the lower bound from the the system (9). And such a property is not a consequence of the dynamics on (y, w) only. This means that some information is lost (as the mortality rate) when reducing the infinite dimensional system to these two quantities and the upper bound should come from another stage as we mentioned earlier (Theorem 2.1 for instance).

3. Dynamics and strain phenomena

It has been suggested that less stable prion strain are more infectious, as judged by their shorter incubation times [17]. In addition, most infectious particles seem to be smaller for fast strains than for slow strains [38]. However, how the PrPsc conformation of a specific strain influences its replicative properties remains unclear. In this section, we aim at studying how of a slight change in the replicative parameters can reproduce or predict strains properties. We are mainly interested in PrPsc aggregate size distribution, which could be used to study strain mechanisms. Indeed, analysis of the dynamics of model (1) initiated in [4] emphasizes the importance of the size distribution of PrPsc aggregate, which seems to be very informative on prion replication mechanism. Notably, it has been shown that different size repartitions resulting from different replicative parameters can play a role in the strain adaptation mechanism.

Our approach is based both on analysis through the eigenvalue problem (4),(5) and on direct numerical simulations of the temporal dynamics.

3.1. Numerics

Parameters of the nucleated polymerization model for prion growth have been estimated for the 'constant parameters model' from experimental data and are

available in the literature, see [13, 27] and the references therein. The parameter values used in the sequel have been quoted from Rubenstein et al. [27]. Unless explicitly mentioned, they are: $\lambda = 2400$ per day, $\gamma = 4$ per day, $\mu_0 = .05$ per day, and $\beta(x) = \beta_0 x$ with $\beta_0 = 0.03$ per day.

The real conversion function is still unknown. We test two different functions, which represent idealized extreme cases:

- a bell-shape function, accounting for the case of the infectious particles are concentrated around one specific size. The conversion function $\tau(x)$ is the sum of a basal rate $\tau_0 = .001$ and a gaussian bell centered on m :

$$\tau(x) = \tau_0 + A \exp(-(x - m)^2 / \sigma^2), \quad (10)$$

with a magnitude A to be chosen by several orders of magnitude above τ_0 .

- a sigmoidal shape, when aggregates larger than a critical size are identically more infectious than smaller polymers. Then the conversion function $\tau(x)$ is given by:

$$\tau(x) = \tau_0 + A \frac{\exp(x - m)}{1 + \exp(x - m)}, \quad (11)$$

with a magnitude A to be chosen by several orders of magnitude above τ_0 .

Throughout the rest of this paper, the simulations assume an initial PrPc population $V(0) = \bar{V} = \lambda/\gamma$ (corresponding to the healthy steady state because we assume inoculation in an healthy animal) and an initial PrPsc distribution which is a small perturbation of the zero steady state, given by $u(x, 0) = 0.5x^2/(1 + x^4)$.

3.2. Effects of the conversion rate

Differently shaped size repartition of the conversion rate greatly affects the PrPsc aggregates size distribution [4]. We test here the situation where changes in conformation do not lead to a completely different profile of converting activity, but only a change of either the magnitude of the conversion or the location of the most infectious particles. For the experiments depicted in figures 4 and 5, varying parameters acts upon the kinetics of PrPsc accumulation as follows: the higher the transconformation rate are or the smaller the most converting particles are, the faster the PrPsc accumulates, and thus, the shorter the incubation time seems to be. In particular, this implies that a fast strain could be able to fix and transconform PrPc either with great efficiency or by smaller aggregates (or both). Interestingly, our simulations also predict changes in the size-distribution of PrPsc, whose variations are specific of the varying parameters.

In the case of a bell-shaped conversion rate, we also have tested the effect of the thightness of the converting peak, by studying the dominant eigenvalue. Indeed, when we focus on the exponential growth of PrPsc (as is it the case in the brain but corresponds only to the early stages of accumulation in the spleen), the eigenvalue problem can be used during the initial phase of exponential growth (occurring at least in the diseased brains). We assume below that $\bar{V} > V_\infty$ according to (7), that $\Lambda(V)$ is a decreasing function so that instability of the healthy state holds true as proved in [4]. This holds for the choice of coefficients mentioned above. We may assume that $V(t)$ remains close enough to \bar{V} because $u(x, t)$ dynamics undergoes an exponential growth phase, while the polymerization behaves following a linear

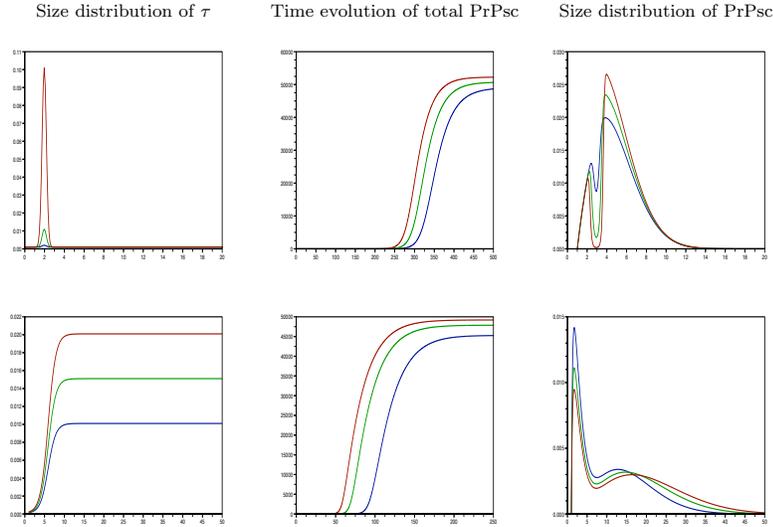


Figure 4. Prion replication with variations in the maximum level of the conversion rate τ . Transconformation rates are given by (top) $\tau_1(x) = 0.001 + H * \exp(-10 * (x - 2)^2)$. Three values for H have been tested : $H = 0.001$ (blue line), $H = .01$ (green line) and $H = 0.1$ (brown line) (bottom) $\tau_2(x) = 0.0001 + G * \frac{\exp(x-5)}{1+\exp(x-5)}$. Three values for G have been tested : $G = 0.01$ (blue line), $G = .015$ (green line) and $H = 0.02$ (brown line) (left) Size distribution of τ_1 and τ_2 (abscissa = PrPsc aggregates size; ordinate = rate τ) (Middle) Time evolution of total PrPsc for : (B1) τ_1 and (B2) τ_2 . (abscissa = Time (in day) ; ordinate = rate τ (per day) (Rigth) Normalized PrPsc aggregates size distribution at $t_1 = 90$ days and $t_2 = 20$ days, corresponding to the exponential growth of PrPsc. The distributions are normalized by the total number of PrPsc aggregates (abscissa = PrPsc aggregates size; ordinate = PrPsc aggregates number).

problem. Actually the second equation in (1) is decoupled from the first one at the first order of approximation. The dominant eigenvalue $-\Lambda(\bar{V})$ thus measures the exponential growth of the PrPsc total population (see [22] for a mathematical formulation of this fact using the generalized relative entropy). Several transconformation rates $\tau(x)$ – being the same basal rate τ_0 combined with a more and more concentrated gaussian bell are tested – and the corresponding growth rate in the exponential phase $-\Lambda(\bar{V})$ are computed numerically (Figure 6). Interestingly, the results exhibit a best compromise around $\alpha \approx 0.01$ (intermediate concentrations of the peak). Thus, according to this model the optimal conditions for PrPsc accumulation in the exponential expansion phase do not correspond to a very thin peak.

3.3. Effects of the fragmentation rate

As suggested in [17, 28], prion strains can differ in their stability. Here, we make the assumption that the stability of a strain is only represented by the fragmentation rate β . However, it could also be interesting to study the effect of the degradation rate μ . According to numerical experiment depicted in Figure 7, increasing the fragmentation rate leads to a faster PrPsc accumulation for a bell-shaped converting rate τ as for a sigmoidal τ . However, for a sigmoidal τ with a higher critical threshold, the inverse effect is observed, due to the fact that small aggregates are less able to convert PrPc than larger PrPsc polymers, and then multiplying the number of small particles does not compensate for the loss of conversion activity

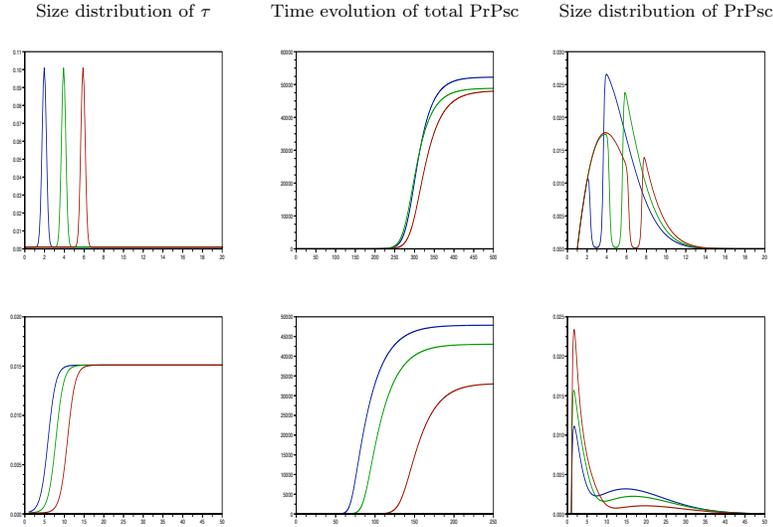


Figure 5. Prion replication with variations in the locus of the conversion rate τ . Transconformation rates are given by :
 (top) $\tau_1(x) = 0.001 + 0.1 * \exp(-10 * (x - m)^2)$. Three values for m have been tested : $m = 2$ (blue line), $m = 4$ (green line) and $m = 6$ (brown line)
 (bottom) $\tau_2(x) = 0.0001 + 0.015 * \frac{\exp(x-l)}{1 + \exp(x-l)}$. Three values for l have been tested : $l = 5$ (blue line), $l = 7$ (green line) and $l = 10$ (brown line) (Left), (Middle) and (Rigth) : Same as Figure 4.

any more. Surprisingly enough, we also can observe that when the fragmentation accelerates the accumulation of PrPsc, this faster accumulation leads to a lower level of total PrPsc amount at the plateau.

4. Conclusion and perspectives

We have continued the analysis in [4] concerning size dependent polymerization rates in the standard model (1) for prion PrPsc self-replication. The interesting situation is when the prion production rate is large enough to permit an infectious steady state. Analytical study of its instability remains an open problem (see [10, 13, 14, 26] for the 'constant coefficients' case) but we could improve a previous result showing that the healthy state is unstable and solutions remain globally bounded. As previously but in a more general framework, we confirm that the amount of PrPc is critical for the development of prion diseases. This is in accordance with well-known experimental results, where PrP-KO mice cannot be infected [33]. However, this result may have wider implications for many other neurodegenerative diseases. Indeed, numerous pathologies (such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease) are characterized by the aberrant polymerization and accumulation of misfolded proteins. Many evidences show that they can be induced in transgenic models (see [36, 37] for review). Thus, whether these misfolding protein disorders are transmissible or not is currently widely debated. Our results suggest that the bioavailability of the amyloid precursor is critical for transmissibility. This is consistent with the fact that, in prion diseases, prion precursor is the protein itself and naturally present in large amount in neurons, whereas in Alzheimer's disease, Abeta is only a minor proteolytic cleavage product of the Amyloid Precursor Protein (APP).

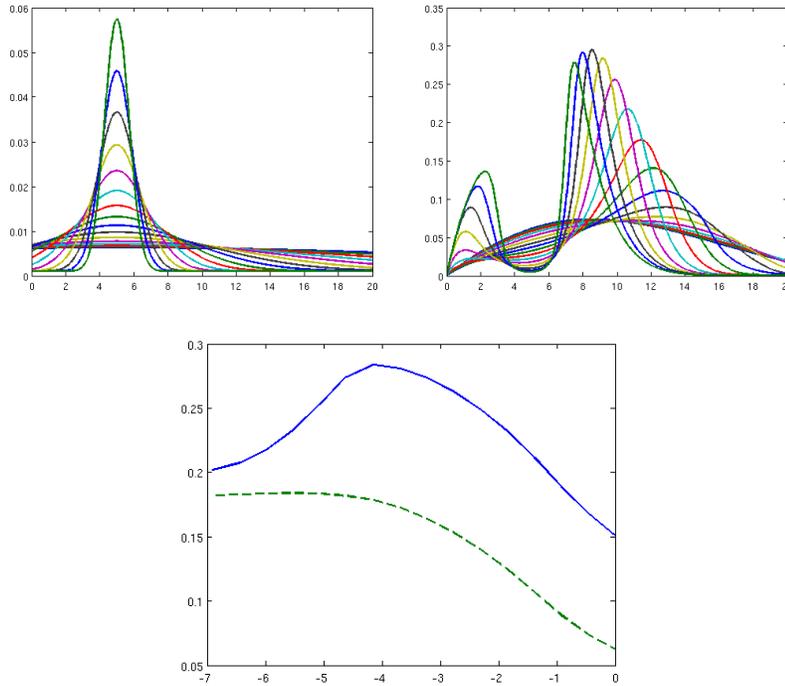


Figure 6. INFLUENCE OF THE TRANSCONFORMATION TIGHTNESS (top) The transconformation rate with several levels of concentration: $\tau(x) = \tau_0 + \alpha\varphi(\alpha(x - m))$, where φ is a gaussian function and $\alpha = 10^{(-3:2:0)}$. (middle) The corresponding eigenfunctions $\mathcal{U}(\bar{V}; x)$. (bottom) The exponential growth rate $-\Lambda(\bar{V})$ (solid line) as a function of α (logarithmic scale, units for $-\Lambda(\bar{V})$ are day^{-1}) and the effective transconformation rate (dashed line) $\tau_{\text{eff}} = \int \tau(x)\mathcal{U}(\bar{V}, x) dx$ (magnified 30 times). Bimodal distribution begins for $\ln(\alpha) \gtrsim -3$ and thus does not correspond to the distribution having the best malthusian parameter.

This necessary condition of PrPc bioavailability is however insufficient to explain strain mechanisms, since species expressing PrPc can be infected only by specific strains. Thus additional constraints are likely to be required for prion strain transmission and propagation. Such constraints can be purely physicochemical, due to one peculiar structure of prion aggregates. Indeed, a large body of literature suggests that differences between prion strains lie in the diversity of structures of PrPsc aggregates that can be stably and faithfully propagated [1, 2, 5, 6, 17, 21, 30]. However, it remains poorly understood how these changes in the conformation of PrPsc aggregates can account for their physiopathological effects and their relationship with the host [17]. Although our model does not separate the host contribution from the strain contribution, it represents on the contrary the relationship between host and pathogen and it allows studying which elementary replicative parameter is critical in strain propagation.

Among the attempted biochemical characterisation of prion strains, a relationship was found between the relative stability values of PrPsc aggregates [17] or level of aggregation [1] and incubation times, indicating that less stable prions are more infectious, as judged by their shorter incubation times. This is presumably because unstable prions fragment more easily, giving rise to smaller aggregates of PrPsc that are more infectious than larger ones. Our model agrees with these observations for a bell-shaped conversion rate, since increasing the fragmentation

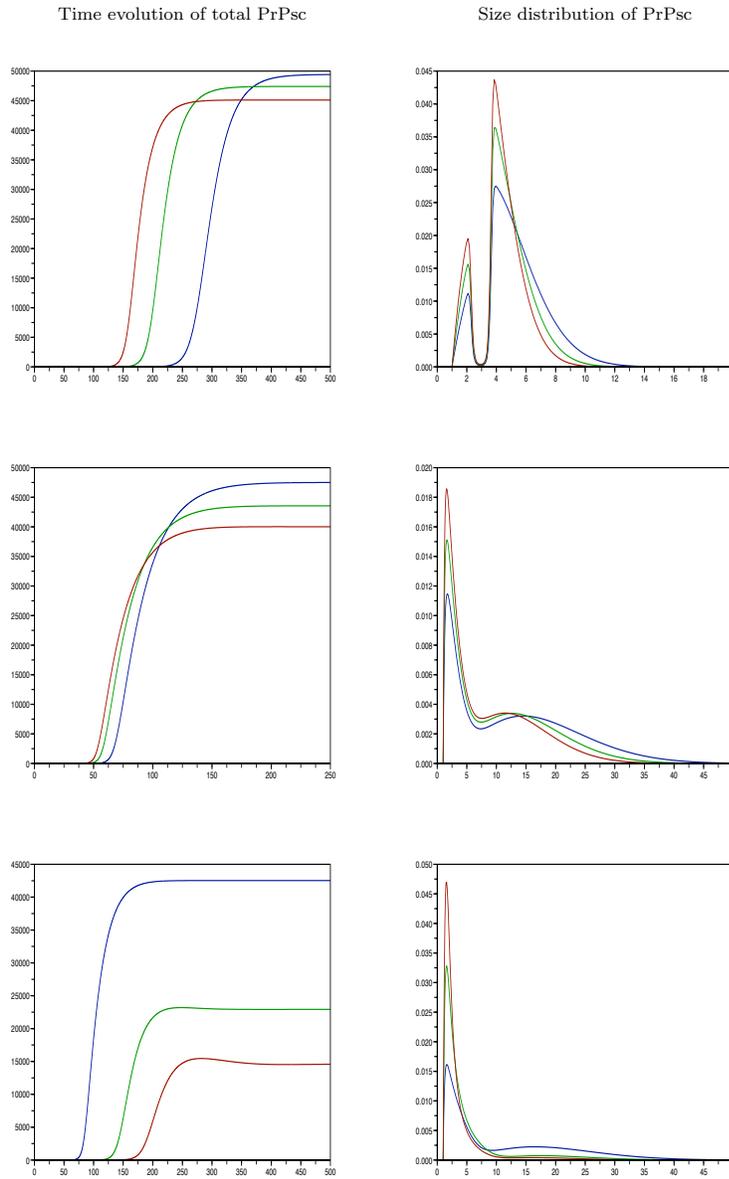


Figure 7. Prion replication with variations in the fragmentation rate of aggregates. Three values for β have been tested ($\beta = 0.0314$ - blue line, $\beta = 0.0471$ - green line and $\beta = 0.0628$ - brown line) for three conversion rates $\tau_1(x) = 0.001 + 0.1 \exp(-10(x-2)^2)$ (top), $\tau_2(x) = 0.0001 + 0.015 \frac{\exp(x-5)}{1+\exp(x-5)}$ (middle) and $\tau_3(x) = 0.0001 + 0.015 \frac{\exp(x-10)}{1+\exp(x-10)}$ (bottom) (Left) Time evolution of total PrPsc (abscissa = Time (in day) ; ordinate = PrPsc total amount) (Right) Normalized PrPsc aggregates size distribution at $t_1 = 96$ days (for τ_1), $t_2 = 20$ days (for τ_2) and $t_3 = 60$ days (for τ_3) corresponding to the exponential growth of PrPsc. The distributions are normalized by the total number of PrPsc aggregates (abscissa = PrPsc aggregates size; ordinate = PrPsc aggregates number).

rate β_0 leads to a faster PrPsc accumulation. Inverse results can be obtained for some sigmoidal conversion rates. It does not immediately mean that a sigmoidal conversion rate is unrealistic, since this result strongly depends on the size distribution of the fragmentation rate. However, it emphasizes the need for precisely monitoring the fragmentation rate, which might depend on the PrPsc aggregate size in a more complex manner than the linear dependence supposed here.

We also have investigated the implications of varying the conversion rate: do different strain conformations lead to a more efficient fixation and conversion by the same aggregates or do they lead to different most converting particles? Our numerical simulations alone do not answer to this question, but interestingly, they show that whereas changing parameters leads to similar effects on PrPsc accumulation kinetics, the resulting size-distribution variations are different. Thus the achievement of experimental size-distribution of PrPsc aggregates for many prion strains could therefore allow to better understand the molecular mechanisms involved in prion strain phenomenon.

To conclude, this work completes the study initiated in [4], notably in studying strain phenomenon. It emphasizes the potential role of PrPsc aggregates size distribution, which could be a signature of prion strain converting abilities. The next step of our work is to approximate faithfully the inverse problem in order to obtain the size dependence of the transconformation rate from the distribution of PrPsc for several strains. This knowledge is a critical step for experimental approaches of prion infectivity investigation like PMCA. Indeed, we have observed several times the existence of an optimal converting rate for PrPsc accumulation (see for instance the tightness in the case of a bell-shaped converting rate), which means that only slight changes in the replicative parameters can dramatically influence the kinetics of PrPsc accumulation. It could explain the sensitivity of PMCA to experimental procedures. Complete understanding of how the PrPsc accumulation of a given strain depends on their replicative parameters could help to optimize strain specific PMCA protocols.

References

- [1] C.J. Sigurdson, K.P.R. Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, M. Polymenidou, P. Schwarz, M. Leclerc, P. Hammarstrom, K. Wuthrich and A. Aguzzi, *Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers*, Nat. Methods **4**, 1023-1030 (2007).
- [2] A. Aguzzi, *Unravelling prion strains with cell biology and organic chemistry*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**, 11–12 (2008).
- [3] M. Bruce, A. Chree, I. McConnell, J. Foster, G. Pearson and H. Fraser, *Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, **343**, 405–411 (1994).
- [4] V. Calvez, N. Lenuzza, D. Oelz, J.-Ph. Deslys, P. Laurent, F. Mouthon and B. Perthame, *Size distribution dependence of prion aggregates infectivity*, Math Biosci. **217**, 88–99 (2009).
- [5] N.J. Cobb and W.K. Surewicz, *Prion strains under the magnifying glass*, Nat. Struct. Mol. Biol. **14**, 882–884 (2007).
- [6] J. Collinge and A.R. Clarke, *A general model of prion strains and their pathogenicity*, Science **318**, 930–936 (2007).
- [7] J. Collinge, M.S. Palmer, K.C. Sidle, A.F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L.J. Doey and P.L. Lantos, *Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein*, Nature **378**, 779–783 (1995).
- [8] M. Doumic, Th. Goudon and Th. Lepoutre, *Scaling limit of a discrete prion dynamics model*. Work in preparation.
- [9] M. Doumic and P. Gabriel, *Analysis of a fragmentation model arising in prion aggregation*. Work in preparation.
- [10] H. Engler, J. Pruss, and G.F. Webb, *Analysis of a model for the dynamics of prions II*, J. Math. Anal. Appl. **324**, 98–117 (2006).
- [11] M. Escobedo, P. Laurençot and S. Mischler, *Fast reaction limit of the discrete diffusive coagulation-fragmentation equation*, Comm. Partial Differential Equations **28**, 1113–1133 (2003).
- [12] H. Fraser and A.G. Dickinson, *Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation*, J. Comp. Path. **83**, 29–40 (1973).
- [13] M.L. Greer, L. Pujo-Menjouet and G.F. Webb, *A mathematical analysis of the dynamics of prion*

- proliferation, *J. Theoret. Biol.* **242**, 598–606 (2006).
- [14] M.L. Greer, P. Van den Driessche, L. Wang and G.F. Webb, *Effects of general incidence and polymer joining on nucleated polymerization in a model of prion proliferation*, *SIAM J. Appl. Math.* **68** (1), 154–170 (2007).
- [15] P. Laurençot and S. Mischler, *From the discrete to the continuous coagulation-fragmentation equations*, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh Sect. A* **132**, 1219–1248 (2002).
- [16] P. Laurençot and C. Walker, *Well-posedness for a model of prion proliferation dynamics*, *J. Evol. Equ.* **7**, 241–264 (2007).
- [17] G. Legname, H.-O.B. Nguyen, D. Peretz, F.E. Cohen, S.J. DeArmond and S.B. Prusiner, *Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 19105–10 (2006).
- [18] G. Legname, I.V. Baskakov, H.-O.B. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond and S.B. Prusiner, *Synthetic mammalian prions*, *Science* **305**, 673–676 (2004).
- [19] P. Michel, *Existence of a solution to the cell division eigenproblem*, *Math. Models Methods Appl. Sci.* **16**, 1125–1153 (2006).
- [20] P. Michel, S. Mischler and B. Perthame, *General relative entropy inequality: an illustration on growth models*, *J. Math. Pures Appl.* **84**, 1235–1260 (2005).
- [21] R. Morales, K. Abid and C. Soto, *The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features*, *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 681–691 (2007).
- [22] B. Perthame, *Transport equations in biology*, *Frontiers in mathematics*, Birkhäuser (2007).
- [23] B. Perthame and L. Ryzhik, *Exponential decay for the fragmentation or cell-division equation*, *J. Differential Equations* **210**, 155–177 (2005).
- [24] S.B. Prusiner, M. Scott, D. Foster, K.-M. Pan, D. Groth, S.-L. Yang, D. Serban, G.A. Carlson, P.C. Hoppe, D. Westaway and S.J. DeArmond, *Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication*, *Cell* **63**, 673–386 (1990).
- [25] S.B. Prusiner, M.R. Scott, S.J. DeArmond and F.E. Cohen, *Prion protein biology*, *Cell* **93**, 337–348 (1998).
- [26] J. Pruss, L. Pujo-Menjouet, G.F. Webb, and R. Zacher, *Analysis of a model for the dynamics of prions*, *Discrete Cont. Dyn. Sys. - Ser. B* **6**(1), 215–225 (2006).
- [27] R. Rubenstein, P.C. Gray, T.J. Cleland, M.S. Piltch, W.S. Hlavacek, R.M. Roberts, J. Ambrosiano and J.-I. Kim, *Dynamics of the nucleated polymerization model of prion replication*, *Biophys. Chem.* **125**, 360–367 (2007).
- [28] J.R. Silveira, G.J. Raymond, A.G. Hughson, E.R. Richard, V.L. Sim, S.F. Hayes and B. Caughey, *The most infectious prion protein particles*, *Nature* **437**, 257–261 (2005).
- [29] G. Simonett and C. Walker, *On the solvability of a mathematical model for prion proliferation*, *J. Math. Anal. Appl.* Vol. **324** (1), 580–603 (2006).
- [30] A.M. Thackray, L. Hopkins, M.A. Klein and R. Budjoso, *Mouse-adapted ovine scrapie prion strains are characterized by different cofomers of PrPsc*, *J. Virol.* **81**, 12119–27 (2007).
- [31] P. Weber, A. Giese, N. Piening, G. Mitteregger, A. Thomzig, M. Beekes and H.A. Kretzschmar, *Generation of genuine prion infectivity by serial PMCA*, *Vet. Microbiol.* **123**, 346–357 (2007).
- [32] P. Weber, L. Reznicek, G. Mitteregger, H. Kretzschmar and A. Giese, *Differential effects of prion particle size on infectivity in vivo and in vitro*, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **369**, 924–928 (2008).
- [33] H. Bueler, A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann, *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie*, *Cell* **369**, 139–1347 (1993).
- [34] R.H. Kimberlin and C.A. Walker, *Incubation periods in 6 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.* **369**, 2953–2960 (1988).
- [35] V. Beringue, K.T. Adjou, F. Lamoury, J.P. Deslys, R. Race and D. Dormont, *Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent*, *J. Virol.* **74**, 5432–5440 (2000).
- [36] C. Soto and L.D. Estrada, *Protein misfolding and neurodegeneration*, *Arch. Neurol.* **65**, 184–189 (2008).
- [37] L.C. Walker, H. Levine, M.P. Mattson and M. Jucker, *Inducible proteopathies*, *Trends Neurosciences* **29**, 438–443 (2006).
- [38] V. Beringue, Oral communication, Neuroprion Congress, Madrid 2008.
- [39] J. Masel, V. Jansen and M. Nowak, *Quantifying the kinetic parameter of prion replication*, *Biophysical Chemistry* **77**, 139–152 (1999).

Chapitre 7

Réduction de la dimension du modèle de polymérisation nucléée

1 Introduction

Au chapitre précédent, nous avons généralisé le modèle de polymérisation nucléée des Prions pour prendre en compte une infectiosité dépendante de la taille des particules. Nous avons déduit de cette étude que la distribution en taille des agrégats semble être une donnée expérimentale très informative sur les mécanismes élémentaires de réplication des Prions. Une perspective de cette étude est l'obtention des distributions expérimentales des agrégats de PrP dans différents contextes biologiques, pour tenter de déduire de ces distributions la taille précise des particules les plus infectieuses. Nos résultats sont basés sur une formulation acellulaire du mécanisme de réplication. Cette formulation homogène semble bien adaptée à l'étude du mécanisme de polymérisation dans un environnement acellulaire (fibrillisation *in vitro* de PrP recombinante, ou PMCA). Toutefois, dans un contexte *in vivo*, la dynamique multicellulaire peut potentiellement influencer la réplication des Prions. Par exemple, une distribution multimodale peut être la résultante de plusieurs populations cellulaires répliquant différemment les Prions. De même, la dissémination intercellulaire des Prions peut conduire à des cellules répliquant les Prions de façon asynchrone. Aussi, il est nécessaire d'étudier au préalable la robustesse de la distribution en taille des agrégats de PrP vis-à-vis de cette dynamique multicellulaire.

L'hétérogénéité des organes de réplication *in vivo* (rate ou cerveau) suggère l'utilisation de modèles multi-agents pour évaluer l'évolution des Prions dans une population de cellules [274] (cette notion sera approfondie dans la partie suivante). Toutefois, les équations de Masel généralisées, simulant la réplication des Prions et leur répartition en taille, consistent en système d'équations différentielles couplées dont la très grande dimension ne peut plus être réduite par sommation. Ces équations ne peuvent ainsi pas être simulées directement pour chaque cellule du modèle multi-agent (capacité de stockage et temps de calculs nécessaires trop importants). L'enjeu de ce chapitre est donc de tester une méthode permettant de réduire la dimension du système de polymérisation nucléée des Prions, afin de le rendre compatible avec les contraintes de stockage et de vitesse d'exécution imposées par un modèle multicellulaire, tout en conservant la connaissance de la dynamique complète du système.

2 Principe général de la réduction POD

Il existe plusieurs techniques de réduction de modèles, parmi lesquelles la réduction POD (pour "Proper Orthogonal Decomposition") semble particulièrement efficace dans le cas d'un système non linéaire conduisant à un état d'équilibre [376], comme c'est le cas pour le modèle de polymérisation nucléée des Prions. La décomposition POD est une technique élégante et très efficace d'analyse de données, qui permet d'approcher un système de dimension élevée par un autre de dimension plus faible. De façon générale, elle consiste à chercher le sous-espace qui contient le maximum d'information sur la dynamique du système [377].

En dimension finie, le problème à résoudre peut s'énoncer de la manière suivante : on se propose d'approcher au mieux, pour la norme euclidienne, K vecteurs u_i d'un espace Ω de dimension ω par K vecteurs dans un sous-espace Δ de Ω de dimension $\delta < \omega$.

Si Δ est défini par un opérateur de projection orthogonal Π , alors on cherche Π solution du problème

$$\min_{\Pi} \sum_{j=1}^K \|u_j - \Pi(u_j)\|^2 \quad (7.1)$$

Ce problème est équivalent à

$$\max_{\Pi} \sum_{j=1}^K \|\Pi(u_j)\|^2 \quad (7.2)$$

puisque $\|u - \Pi(u)\|^2 + \|\Pi(u)\|^2 = \|u\|^2$ (projection orthogonale).

Nous allons montrer que la solution optimale de ce problème est donnée par la décomposition aux valeurs propres.

2.1 Une inégalité classique sur les valeurs propres

Le résultat d'optimalité de la base des vecteurs propre découle d'un principe d'optimalité classique des valeurs propres pour une matrice symétrique définie positive, défini dans le théorème suivant.

Théorème 1 *Soit une matrice $\mathbf{A} = (a_{i,j})$ symétrique, définie positive, de valeurs propres $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_n$. Alors*

$$\forall k \leq n, \sum_{i=1}^k a_{i,i} \leq \sum_{i=1}^k \lambda_i$$

Preuve

On diagonalise \mathbf{A} en $\mathbf{A} = \mathbf{Q}^t \mathbf{D} \mathbf{Q}$. On a donc

$$a_{i,i} = \sum_j Q_{i,j}^2 \lambda_j \quad \text{ou encore} \quad a = M d$$

en posant $a = (a_{1,1}, \dots, a_{n,n})$, $d = (\lambda_1, \dots, \lambda_n)$ et $M_{i,j} = Q_{i,j}^2$.

La matrice M appartient à l'ensemble B des matrices bistochastiques positives, définies par

$$\forall i, j \quad \sum_k M_{i,k} = \sum_k M_{k,j} = 1$$

L'ensemble B est un convexe compact dont les points extrémaux sont les matrices de permutations (de la forme $Q_{i,j}^2$ avec $Q_{i,j}$ une matrice orthogonale, qui appartiennent donc à B). M est donc une combinaison convexe de matrices de permutations, ce qui implique que le vecteur $a = Md$ est une combinaison convexe des vecteurs $d_\sigma = (\lambda_{\sigma(1)}, \dots, \lambda_{\sigma(n)})$.

On pose $f(a) = \sum_i a_{i,i}$. Comme f est une fonction linéaire, nous avons

$$f(a) \leq \max_\sigma (f(d_\sigma))$$

$$\text{soit } f(a) \leq \max_\sigma \left(\sum_i \lambda_{\sigma(i)} \right)$$

$$\text{ou encore } f(a) \leq \sum_i \lambda_i$$

◇

2.2 Décomposition aux valeurs propres

Définissons maintenant le sous-espace Δ par une base orthonormée e_i , $i = 1, \dots, \delta$. Il vient alors que

$$\Pi(u) = \langle u, e_i \rangle e_i \quad \text{et} \quad \|\Pi(u)\|^2 = \sum_{i=1}^{\delta} \langle u, e_i \rangle^2.$$

Le problème 7.2 à résoudre devient

$$\max_{e_i} \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{\delta} \langle u, e_i \rangle^2$$

ou encore

$$\max_{e_i} \sum_{i=1}^{\delta} \sum_{j=1}^K \langle u, e_i \rangle^2$$

équivalent à

$$\max_{e_i} \sum_{i=1}^{\delta} \langle \Theta(e_i), e_i \rangle^2$$

avec Θ l'opérateur semi-défini positif défini sur V par $\Theta = \sum_{j=1}^K u_j \otimes u_j$.

D'après le théorème 1, le maximum est atteint quand les e_i sont les vecteurs propres associés aux δ plus grandes valeurs propres de Θ . Ainsi, la réduction POD consiste à déterminer les

éléments propres de la matrice de Θ dans une base orthonormée de Ω . Ces éléments propres peuvent s'obtenir à partir de la matrice de covariance des vecteurs u_j . En effet, si on note U la matrice des vecteurs u_j dans une base orthonormée de Ω , la matrice de Θ dans cette base (encore notée Θ) est donnée par $\Theta = UU^t$ et la matrice de covariance des vecteurs u_j , définie par $C_{i,j} = \langle u_i, u_j \rangle$ est donnée par $C = U^tU$. De plus, si x est un vecteur propre de C de valeur propre λ non nulle, alors le vecteur $v = Ux$ est un vecteur propre de Θ associé à la valeur propre λ , de même multiplicité.

Dans le cas très courant où la dimension de l'espace Ω (espace de représentation des vecteurs non réduits) est supérieure au nombre de vecteurs à représenter (*i.e.* $\omega > K$), la matrice Θ est au plus de rang K (la matrice de covariance c étant de dimension $K \times K$). On définit alors la matrice B_1 , de dimension $K \times K$, comme étant la matrice des vecteurs propres de la matrice de covariance C . Cette matrice est plus rapide à obtenir que la matrice des vecteurs propres de Θ (de dimension $\omega \times \omega$). On déduit alors la matrice de réduction B (de dimensions $\omega \times K$) à partir de B_1 par la relation suivante :

$$B = UB_1$$

. Cette méthode de calcul, introduite par Lumley en 1967, est appelée *Méthode des Snapshots*. En pratique, les K modes propres sont calculés, mais seuls les δ premiers sont retenus. L'erreur de troncature commise est donnée par :

$$\sum_{j=1}^K \|u_j - \Pi(u_j)\|^2 = \sum_{j=1}^K \|u_j\|^2 - \|\Pi(u_j)\|^2 = \sum_{i=\delta+1}^K \lambda_i$$

avec λ_i les valeurs propres de Θ classées en ordre décroissant.

En général, δ est choisi de façon à rester dans le cas d'une erreur de troncature admissible :

$$\delta_{opt} = \min \left\{ \delta < K \left| \frac{\sum_{i=1}^{\delta} \lambda_i}{\sum_{i=1}^K \lambda_i} \geq P_{\epsilon} \right. \right\}$$

avec P_{ϵ} la proportion d'énergie cinétique que l'on souhaite capturer par le modèle réduit.

En résumé, la base de réduction POD est construite à partir des connaissances de la dynamique du système. Ainsi, la méthode POD consiste à calculer initialement grâce au modèle non réduit l'ensemble des états que l'on souhaite capturer (parmi tous les états possibles du système). Une fois ces états calculés, le sous-espace contenant la majorité de ces états est sélectionné comme sous-espace de réduction. Le système n'est alors simulé que dans ce sous-espace, de dimension plus petite que l'espace complet des solutions. Toutefois, il arrive en pratique que des états calculés par le système réduit sortent de ce sous-espace et ne sont alors pas reproduits de façon fiable. Une étude de la robustesse du modèle réduit est donc nécessaire pour évaluer quels sont les états du système calculables par ce système.

Dans toute la suite, nous appellerons modèle détaillé le système de taille infinie et modèle réduit le système projeté dans la base POD.

3 Réduction du modèle de polymérisation nucléée des Prions

Dans cette section, nous souhaitons réduire la dimension du système de polymérisation nucléée pour intégrer ce mécanisme intracellulaire à un modèle multicellulaire hétérogène, ce qui impose plusieurs contraintes sur le modèle réduit. D'une part, dans notre cas d'étude, les paramètres cinétiques de réplication sont inconnus et peuvent varier d'une cellule à l'autre. Les états du système que nous voulons capturer par le modèle réduit ne sont donc pas connus avec certitude. D'autres part, dans le modèle multicellulaire, les Prions ne se répliquent pas uniquement dans une cellule donnée, mais peuvent aussi se propager d'une cellule à l'autre, à des vitesses pouvant dépendre de la taille des particules. Cette dynamique de propagation peut perturber fortement la dynamique de réplication des Prions, notamment dans le cas de deux cellules possédant des paramètres de réplication très éloignés. Ainsi, le système est sans cesse éloigné des états prédits par le modèle réduit.

Par conséquent, la base de réduction choisie doit donc être la plus robuste possible vis-à-vis des paramètres de réplication et de la propagation des Prions. Nous détaillons dans cette section la procédure mise en place pour construire la base de réduction POD adaptée au système de polymérisation nucléée, et pour tester sa compatibilité avec les deux contraintes énoncées ci-dessus. En l'absence de données complémentaires sur la dépendance en taille des paramètres de réplication, cette procédure est établie ici pour un coefficient de polymérisation des agrégats indépendant de la taille. Toutefois, les calculs réalisés ici sous forme matricielle sont aisément généralisables à des coefficients de réplication dépendants de la taille des agrégats.

3.1 Procédure d'obtention et de vérification de la base POD

3.1.1 Intégration numérique du modèle de Masel

Contrairement à d'autres méthodes de réduction consistant à choisir une base de réduction *a priori* (par exemple, base des splines cubiques), la réduction POD construit le sous-espace de réduction à partir des connaissances sur la dynamique du système à réduire. Une étape d'intégration du modèle de Masel complet est donc nécessaire. Ces calculs sont effectués une fois pour toute avant la construction de la base (après construction et validation de la base, la dynamique du système pourra être obtenue via le modèle réduit).

Comme défini dans les chapitre précédents, le modèle de polymérisation nucléée à réduire décrit la dynamique de la quantité de PrP^c, $V(t)$, couplée à l'évolution des agrégats de PrP^{res} constitués de i protéines élémentaires, $u_i(t)$.

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}V(t) &= \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + n_0(n_0 - 1)\beta U(t), \\ \frac{d}{dt}u_i(t) &= -\mu u_i(t) - \beta(i - 1)u_i - \tau V(t)(u_i(t) - u_{i-1}(t)) + 2\beta \sum_{j>i} u_j(t), \quad \text{pour } i \geq n_0. \end{cases} \quad (7.3)$$

avec V la quantité de PrP^c, u_i le nombre d'agrégats de PrP^{res} de taille i et $U = \sum_i u_i$ le nombre total d'agrégats de PrP^{res}. λ représente le taux de production de la PrP^c, γ et μ les taux de dégradation respectifs de la PrP^c et de la PrP^{res}, β et τ les taux de fragmentation et

d'élongation des agrégats de PrP^{res} , et n la taille minimale critique des agrégats de PrP^{res} .

Ce système est de dimension infinie. Il est toutefois ramené en pratique à un système de taille finie en négligeant les agrégats de tailles supérieures à 5000 ($u_{5000} \ll 1$ pour les valeurs de paramètres standards [299]). En outre, afin d'optimiser la procédure d'intégration numérique, le changement de variables suivant est effectué :

$$\begin{aligned} w_i &= \sum_{j=i+1}^{5000} u_{i+n_0-1} \quad \text{pour } 1 \leq i < 5000 \\ w_{5000} &= 0 \end{aligned}$$

Intégrer (7.3) revient alors à intégrer le système suivant, mis sous forme matricielle :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}V(t) = \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)W(1) + n_0(n_0 - 1)\beta W(1), \\ M \frac{d}{dt}W(t) = (A_1 + V(t)A_1)W(t). \end{cases} \quad (7.4)$$

avec :

$$W = (w_i, \dots, w_{5000})^T .$$

$$M(i, i) = 1, M(i, i + 1) = -1 \text{ et } M(i, j) = 0 \text{ sinon.}$$

$$A_1(i, i) = -\mu - \beta(n + i - 1), A_1(i, i + 1) = \mu + \beta(n + i - 1) \text{ et } A_1(i, j) = 0 \text{ sinon.}$$

$$A_2(1, 1) = -\tau, A_2(i, i) = -2\tau, A_2(i, i - 1) = A_2(i, i + 1) = \tau \text{ et } A_2(i, j) = 0 \text{ sinon.}$$

Ce système est implicite, toutefois, le changement de variable permet de se ramener au cas où toutes les matrices sont au plus tridiagonales (même la matrice M), ce qui permet d'accélérer l'intégration numérique. Le système est intégré numériquement selon un schéma des trapèzes semi-implicites (*i.e.* implicites pour les termes linéaires et explicites pour les termes couplés), à l'aide du logiciel Scilab 4.1, avec un pas temporel de 0.1 jour sur une durée totale de 500 jours.

3.1.2 Création de la base POD

Afin de construire une base la plus générale possible, le modèle détaillé a été intégré numériquement, selon la procédure décrite au paragraphe précédent, pour 25 jeux de paramètres différents, choisis aléatoirement selon un échantillonnage par Hypercube Latin (LHS), pour maximiser la couverture de l'espace des paramètres en minimisant le nombre de simulations à réaliser [378]. Les lois de probabilités et les paramètres choisis sont récapitulés Figure 7.1. Pour chaque jeu de paramètres, le modèle a été simulé pour 3 conditions initiales différentes, définies par :

$$\begin{aligned} u_1(i) &= (i - 1)^2(i - 1000)^2 \text{ pour } i \leq 1000, \\ u_1(i) &= 0 \text{ sinon.} \end{aligned}$$

$$u_2(i) = (i - 1)^2(i - 4000)^2 \text{ pour } i \leq 4000,$$

$$u_2(i) = 0 \text{ sinon.}$$

$$u_3(i) = (i - 1)^2(i - 1000)^2 \text{ pour } i \leq 1000,$$

$$u_3(i) = (i - 3000)^2(i - 4000)^2 \text{ pour } 3000 \leq i \leq 4000,$$

$$u_3(i) = 0 \text{ sinon.}$$

La quantité V de PrP^c est initialisée à sa valeur en cas d'absence d'infection, c'est-à-dire $V_0 = \lambda/\gamma$. Enfin, pour réduire le temps de calcul lors de la recherche des éléments propres, les snapshots différents de moins de 10% en valeur relative ont été supprimés de la matrice des snapshots, réduisant la taille de celle-ci de (5000 x 3750) à (5000 x 561). Les éléments propres

A - Paramètres résultant de la procédure d'échantillonnage LHS

N°	λ	γ	μ	β	τ
1	1796	3,77	4,89E-02	2,85E-04	0,2853
2	6726	5,78	4,81E-02	1,82E-04	0,8536
3	56	1,97	6,79E-02	7,68E-04	0,6928
4	3069	2,66	1,34E-02	9,51E-05	0,2420
5	5815	4,45	4,66E-02	3,22E-04	0,6514
6	5594	4,59	2,35E-02	2,62E-04	0,5022
7	7569	5,01	6,18E-02	5,98E-05	0,7571
8	6009	5,83	3,29E-02	3,80E-04	0,0972
9	7907	4,11	4,57E-02	6,21E-04	0,2573
10	690	3,44	9,89E-02	4,47E-04	0,5125
11	4576	3,60	5,96E-02	1,54E-04	0,1815
12	5441	6,00	5,35E-03	4,27E-05	0,6220
13	6433	6,34	5,19E-02	6,59E-04	0,3269
14	1759	3,15	3,52E-02	1,07E-04	0,4151
15	4300	3,45	3,17E-02	6,40E-04	0,4442
16	2134	5,04	5,35E-02	7,74E-05	0,1192
17	2057	2,64	2,16E-02	1,92E-04	0,6427
18	2308	4,23	5,55E-02	3,73E-04	0,4575
19	8206	2,90	5,87E-02	5,29E-04	0,2972
20	5636	4,38	3,70E-02	8,26E-04	0,8087
21	2847	4,58	1,18E-02	2,05E-04	0,7198
22	8602	1,63	4,49E-02	4,04E-04	0,3127
23	1539	2,40	3,97E-02	2,32E-04	0,1974
24	3212	4,86	3,00E-02	3,08E-04	0,6799
25	3599	5,31	5,00E-02	7,22E-04	0,4896

B - Lois de probabilité pour la procédure LHS

Paramètre	Loi de prob.	Minimum	Mode	Maximum
λ	Uniforme	0	—	8000
γ	Triangle	0	5	7
μ	Triangle	0	0,04	0,1
β	Triangle	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
τ	Triangle	0	0,3	1

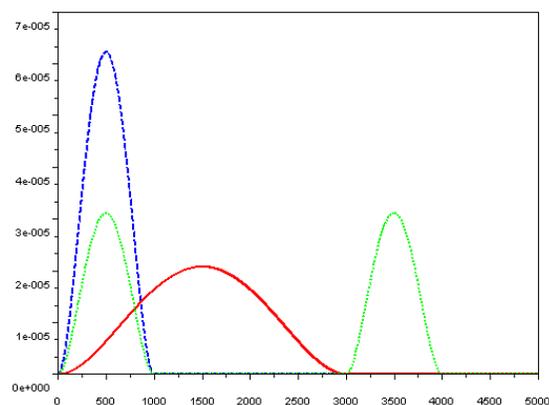
C - Distributions initiales


FIG. 7.1 – Paramètre de création de la matrice des snapshots (A) Paramètres cinétiques du modèle de Masel, générés aléatoirement à partir d'une procédure LHS (B) Paramètres de la procédure LHS (C) Conditions initiales : $u_1(i)$ (pointillés bleus), $u_2(i)$ (solide rouge) et $u_3(i)$ (points verts). L'abscisse représente la taille des agrégats de PrP, l'ordonnée représente le nombre d'agrégats.

de la matrice de variance/covariance dérivée de la matrice des snapshots ont ensuite été évalués numériquement à l'aide de la fonction *spec* de Scilab et triés selon le module décroissant des valeurs propres.

3.1.3 Construction du modèle réduit

Le modèle de Masel détaillé, mis sous forme matricielle et sans changement de variable préalable, est donné par :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}V(t) &= \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + n_0(n_0 - 1)\beta U(t), \\ \frac{d}{dt}\mathbf{u}(t) &= (G_1 + V(t)G_2)\mathbf{u}(t). \end{cases} \quad (7.5)$$

avec les notations précédentes. Les matrices G_1 et G_2 sont définies par :

$$G_1(i, i) = -\mu - \beta(i - 1), G_1(i, j) = 2\beta \text{ pour } j > i, \text{ et } G_1(i, j) = 0 \text{ sinon.}$$

$$G_2(i, i) = -\tau, G_2(i, i - 1) = \tau \text{ et } G_2(i, j) = 0 \text{ sinon.}$$

Le modèle réduit, sous forme matricielle, est donné par la projection orthogonale (définie au sens de la norme euclidienne) du modèle complet dans la base de réduction POD B (calculée à partir de la matrice des "Snapshots" comme indiqué dans la section 2.2, page 143). Par construction, $U - BB^T U$ est très petit, c'est-à-dire que le vecteur \mathbf{u} est approché par le vecteur $B\tilde{\mathbf{u}}$ (avec $\tilde{\mathbf{u}}$ de dimension très inférieure à la dimension de \mathbf{u}). Le système décrivant l'évolution de $\tilde{\mathbf{u}}$ est obtenu en prémultipliant le système complet (7.5) par B^T , ce qui donne :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt}V(t) &= \lambda - \gamma V(t) - \tau V(t)U(t) + n_0(n_0 - 1)\beta U(t), \\ K \frac{d}{dt}\tilde{\mathbf{u}}(t) &= (L_1 + V(t)L_2)\tilde{\mathbf{u}}(t). \end{cases} \quad (7.6)$$

où :

$$K = B^T B \text{ une matrice diagonale,}$$

$$L_1 = B^T G_1 B,$$

$$L_2 = B^T G_2 B.$$

3.1.4 Evaluation de la robustesse de la base

La base POD est optimale pour représenter les données ayant servis à sa construction. Toutefois, en raison même de cette optimalité, une telle base n'est pas toujours capable de reproduire des données n'ayant pas servi à sa construction. Dans notre cas, les paramètres cinétiques de réplication des cellules sont inconnus et peuvent varier d'une cellule à l'autre. De plus, l'automate cellulaire (AC) doit mimer la propagation intercellulaire des Prions, ce qui vient perturber à chaque instant la dynamique de réplication des Prions. Une étape d'étude de

robustesse de la base POD construite précédemment est donc nécessaire.

La capacité du modèle réduit POD à capturer la dynamique complète du système a été évaluée par la mesure de l'erreur commise entre le modèle réduit et le modèle non réduit, sur la base de trois critères :

(1) évaluation de la robustesse pour les paramètres ayant servis à la construction de la base,

(2) évaluation de la robustesse pour les paramètres n'ayant pas servis à la construction de la base, par une procédure "One-Factor-at-a-time" (OAT, précisé dans le chapitre suivant) autour des valeurs standards de Masel (Paramètres $\pm 1\%$, $\pm 10\%$, $\pm 50\%$, $+100\%$, $+200\%$, $+400\%$)

(3) évaluation de la compatibilité du modèle réduit avec de la propagation des Prions entre deux cellules.

Robustesse vis-à-vis des paramètres (1 et 2). Pour chaque jeu de paramètre, les modèles détaillés et réduits sont intégrés numériquement selon un schéma numérique des trapèzes semi-implicites, à l'aide du logiciel Scilab 4.1, avec un pas temporel de 0.1 jour sur une durée totale de 500 jours. Les deux résultats sont comparés.

Robustesse vis-à-vis de la propagation (3). Pour évaluer la robustesse vis-à-vis de la propagation, le modèle à deux cellules suivant a été introduit :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt}V_1(t) = \lambda_1 - \gamma_1 V_1(t) - \tau_1 V_1(t)U_1(t) + n_0(n_0 - 1)\beta_1 U_1(t), \\ \frac{d}{dt}\mathbf{u}_1(t) = (G_{1,1} + G_{2,1}V_1(t))\mathbf{u}_1(t) + D(\mathbf{u}_2(t) - \mathbf{u}_1(t)), \\ \frac{d}{dt}V_2(t) = \lambda_2 - \gamma_2 V_2(t) - \tau_2 V_2(t)U_2(t) + n_0(n_0 - 1)\beta_2 U_2(t), \\ \frac{d}{dt}\mathbf{u}_2(t) = (G_{1,2} + G_{2,2}V_2(t))\mathbf{u}_2(t) - D(\mathbf{u}_2(t) - \mathbf{u}_1(t)). \end{array} \right. \quad (7.7)$$

avec les notations précédentes. L'indice 1 représente la cellule 1, l'indice 2 représente la cellule 2. Le terme $D(\mathbf{u}_2(t) - \mathbf{u}_1(t))$ représente la diffusion des agrégats entre les deux cellules considérées, $D = (\delta_i)$ étant une matrice diagonale de taille 5000×5000 où δ_i est le coefficient de diffusion des agrégats de taille i .

Projeté orthogonalement sur la base POD de réduction B , ce système devient :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt}V_1(t) = \lambda_1 - \gamma_1V_1(t) - \tau_1V_1(t)U_1(t) + n_0(n_0 - 1)\beta_1U_1(t), \\ K\frac{d}{dt}\tilde{\mathbf{u}}_1(t) = (L_{1,1} + L_{2,1}V_1(t))\tilde{\mathbf{u}}_1(t) + P(\tilde{\mathbf{u}}_2(t) - \tilde{\mathbf{u}}_1(t)), \\ \frac{d}{dt}V_2(t) = \lambda_2 - \gamma_2V_2(t) - \tau_2V_2(t)U_2(t) + n_0(n_0 - 1)\beta_2U_2(t), \\ K\frac{d}{dt}\tilde{\mathbf{u}}_2(t) = (L_{1,2} + L_{2,2}V_2(t))\tilde{\mathbf{u}}_2(t) - P(\tilde{\mathbf{u}}_2(t) - \tilde{\mathbf{u}}_1(t)). \end{array} \right. \quad (7.8)$$

avec $K = B^T B$, $L_{1,i} = B^T G_{1,i} B$, $L_{2,i} = B^T G_{2,i} B$ et $P = B^T D B$.

Initialement, la cellule 1 est infectée et la cellule 2 est saine. Toutes les combinaisons entre les jeux de paramètres 1 à 10 sont testées pour la cellule 1 et la cellule 2, pour trois matrices de diffusion D (la nature précise de la propagation des Prions étant encore mal caractérisée) :

(i) la vitesse de diffusion est indépendante de la taille des agrégats : $\delta_i = 0.01$ pour tout i

(ii) la vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la taille des agrégats : $\delta_i = 0.01/i$. Cette relation correspond à l'équation d'Einstein-Smoluchowski, où le coefficient de diffusion d'une particule D est donné par $D = kT/(6\pi\mu a)$, avec T la température, μ la viscosité du milieu de propagation et a la taille de la particule diffusante [274].

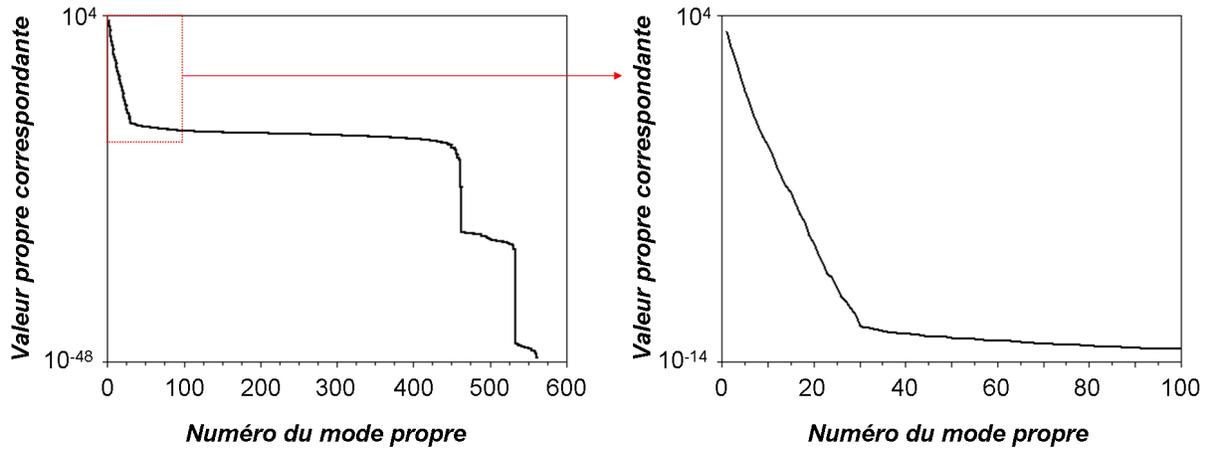
(iii) la vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la racine carrée de la taille des agrégats : $\delta_i = 0.01/\sqrt{i}$.

3.2 Résultats : validation de la base POD

3.2.1 Taille optimale de la base de réduction

La valeur propre correspondant à un mode POD donné est représentative de l'information sur la dynamique du système contenue dans ce mode. L'énergie cumulative d'un mode (*i.e.* correspondant à la somme des valeurs propres supérieures ou égales à ce mode, normalisée par la somme de toutes les valeurs propres) est représentative de la proportion d'information contenue dans les premiers modes de la base POD. C'est le critère généralement retenu pour choisir la taille de la base de réduction [377].

Les différentes valeurs propres de notre système, ainsi que l'énergie cumulative correspondante (*i.e.* la quantité d'information contenue dans les premiers modes de la base POD), sont représentées figure 7.2. Fixer un seuil d'énergie à 99% revient donc dans notre cas à choisir $K = 3$. Néanmoins, l'examen direct des modes propres (figure 7.3) montre que les premiers modes sont concentrés sur les petites tailles d'agrégats. Or la dynamique d'évolution de la distribution en taille des agrégats passe initialement par une phase d'élongation, où les grands agrégats sont majoritaires, puis par une phase de fragmentation qui concentre les agrégats vers les tailles plus petites. Ces résultats suggèrent qu'il est nécessaire d'intégrer dans la base POD



Mode	Valeur propre	Energie cumulée
1	1488,568	84,77383
2	219,16875	97,25547
3	41,011414	99,59107
4	5,6626326	99,91355
5	1,1985396	99,98181
6	0,2416549	99,99557
7	0,0569076	99,99881
8	0,0136626	99,99959
9	0,0047418	99,99986
10	0,0017450	99,99996

FIG. 7.2 – Valeurs propres associées aux différents modes propres. Les figures représentent les valeurs propres correspondant aux différents modes propres (la figure de droite est un zoom sur les premiers modes de la figure de gauche) et le tableau correspond à l'énergie cumulée (*i.e.* $\sum_{i=1}^n \lambda_i / \sum_{totale} \lambda_i$) calculée pour les 10 premiers modes.

des modes plus élevés, moins énergétiques mais plus aptes à reproduire la dynamique transitoire du système. Nous avons donc testé la validité des bases POD de taille $N = 10$, $N = 20$ et $N = 30$.

La figure 7.4 représente l'erreur relative de réduction commise en fonction de la taille de la base POD choisie (pour une valeur des paramètres $\lambda = 4400$, $\gamma = 5$, $\mu = 0.04$, $\beta = 10^{-4}$, $\tau = 0.3$ et $n = 4$). L'erreur relative de réduction à un temps t est donnée par :

$$E_r(t) = \frac{\sum_{x=1}^{5000} |u_{COMP}(x, t) - u_{RED}(x, t)|}{\sum_{x=1}^{5000} |u_{COMP}(x, t)|}$$

avec $u_{COMP}(x, t)$ correspondant à la distribution en taille des agrégats au temps t , obtenue par intégration numérique du modèle détaillé, et $u_{RED}(x, t)$ correspondant à la distribution en taille des agrégats au temps t , obtenue par intégration numérique du modèle réduit.

On observe une diminution de l'erreur commise lorsque le nombre de modes retenus augmente, avec toutefois un phénomène surprenant : l'erreur de réduction est plus importante pour $N = 8, 9$, ou 10 que pour $N = 7$. Elle se stabilise ensuite à sa valeur inférieure pour $N > 15$.

La répartition temporelle de l'erreur (Figure 7.4, droite) confirme que l'erreur de réduction est principalement commise pendant le régime transitoire.

L'erreur relative de réduction, calculée précédemment pour un jeu donné de paramètres, a également été évaluée pour les 25 jeux de paramètres ayant servi à la création de la matrice des snapshots. On constate là encore une nette diminution de l'erreur commise en prenant une base de taille 20 par rapport à une base de taille 10.

Pour toute la suite de l'étude, nous fixons la taille de la base POD retenue à 25.

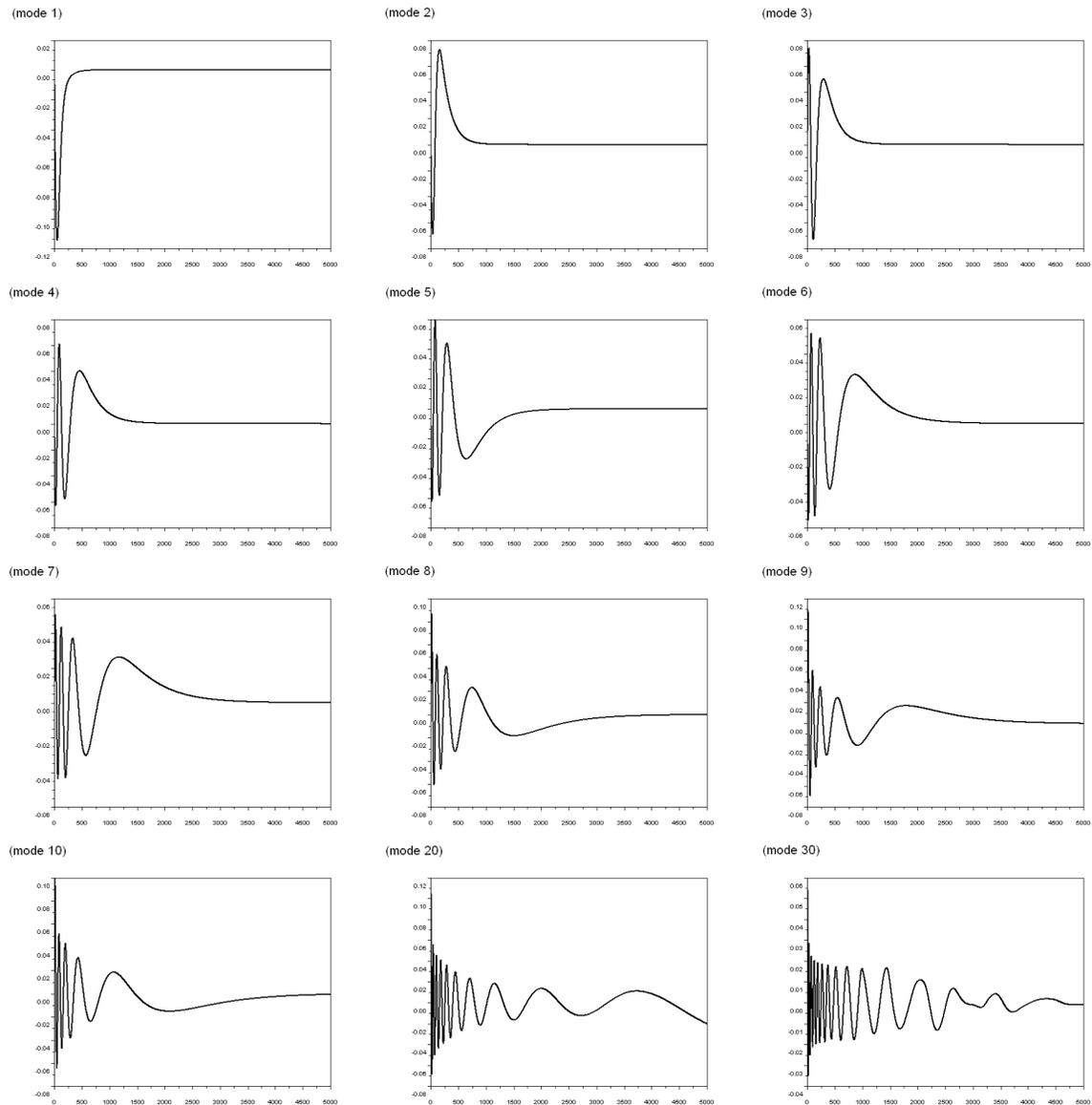


FIG. 7.3 – Représentation des premiers modes POD associés au modèle de Masel réduit

3.2.2 Robustesse de la base POD vis-à-vis des paramètres d'évolution

Pour 2 jeux de paramètres particuliers ayant servi à la construction de la matrice des snapshots (numéro 7 et numéro 12), l'erreur de réduction reste élevée malgré une base POD de taille $N = 30$ (environ 100% d'erreur pour $N = 10$ et $N = 20$, et de 40% pour $N = 30$). Ces 2 jeux correspondent à des taux de conversion τ élevés (respectivement 0,7571 et 0,6220) combinés à un taux de fragmentation faible (respectivement $5,98 \times 10^{-05}$ et $4,27 \times 10^{-05}$), ce qui tend à concentrer la dynamique de la distribution en taille vers les grands agrégats, alors que le modèle réduit se concentre sur les petites tailles.

Par ailleurs, une analyse de sensibilité par une procédure OAT a été menée afin d'identifier l'intervalle de validité du modèle réduit (paramètres $\pm 1\%$, $\pm 10\%$, $\pm 50\%$, $+100\%$, $+200\%$, $+400\%$ par rapport à la valeur standard $\lambda = 4400$, $\gamma = 5$, $\mu = 0.04$, $\beta = 10^{-4}$, $\tau = 0.3$ et $n = 4$). L'erreur relative moyenne reste toujours inférieure à 1%, sauf dans les cas de paramètres défavorables à l'infection :

- pour cause de perte de matière trop importante (simulation du modèle détaillé non pertinente)

- pour cause de taux de conversion trop faible (production insuffisante pour compenser la dégradation). En revanche, lorsque les paramètres sont défavorables à l'infection pour cause de dégradation de la PrP^{res} trop importante, l'erreur relative moyenne est de nouveau inférieure à 1%.

La base POD semble donc apte à reproduire la dynamique du système de Masel dans le cas des cellules répliquantes (*i.e.* capable de convertir la PrP^{c} en PrP^{res} et de fragmenter les agrégats de PrP^{res} à des niveaux suffisants pour compenser la dégradation). En revanche, le cas des cellules non répliquantes ne pourra être modélisé que par des coefficients d'élongation et de fragmentation nuls. Ces cellules restent toutefois capables de dégrader l'infection.

3.2.3 Réduction POD et positivité de la solution

La méthode POD peut conduire à des problèmes de positivité, c'est-à-dire que des variables supposées positives (dans notre cas, la quantité d'agrégats de PrP^{res} d'une taille donnée) deviennent négatives dans le modèle réduit. En effet, aucune relation ne permet de vérifier la positivité du système détaillé à partir des composantes du système réduit, qui ne sont pas nécessairement positives. Une légère non positivité a parfois été observée pour les polymères de taille minimale, toutefois, elle reste extrêmement faible (de l'ordre de 10^{-8} agrégats). De plus, au vu de l'erreur commise au cours du temps dans les différentes simulations, ce manque de positivité ne semble pas perturber le reste de la dynamique du système. En outre, nous avons également constaté ce manque de positivité dans d'autres bases de réduction testées au préalable, construites sans connaissances sur la dynamique du système complet (polynômes de Legendre ou encore polynômes de Bernoulli), avec en plus une moins bonne reproduction de la dynamique du système.

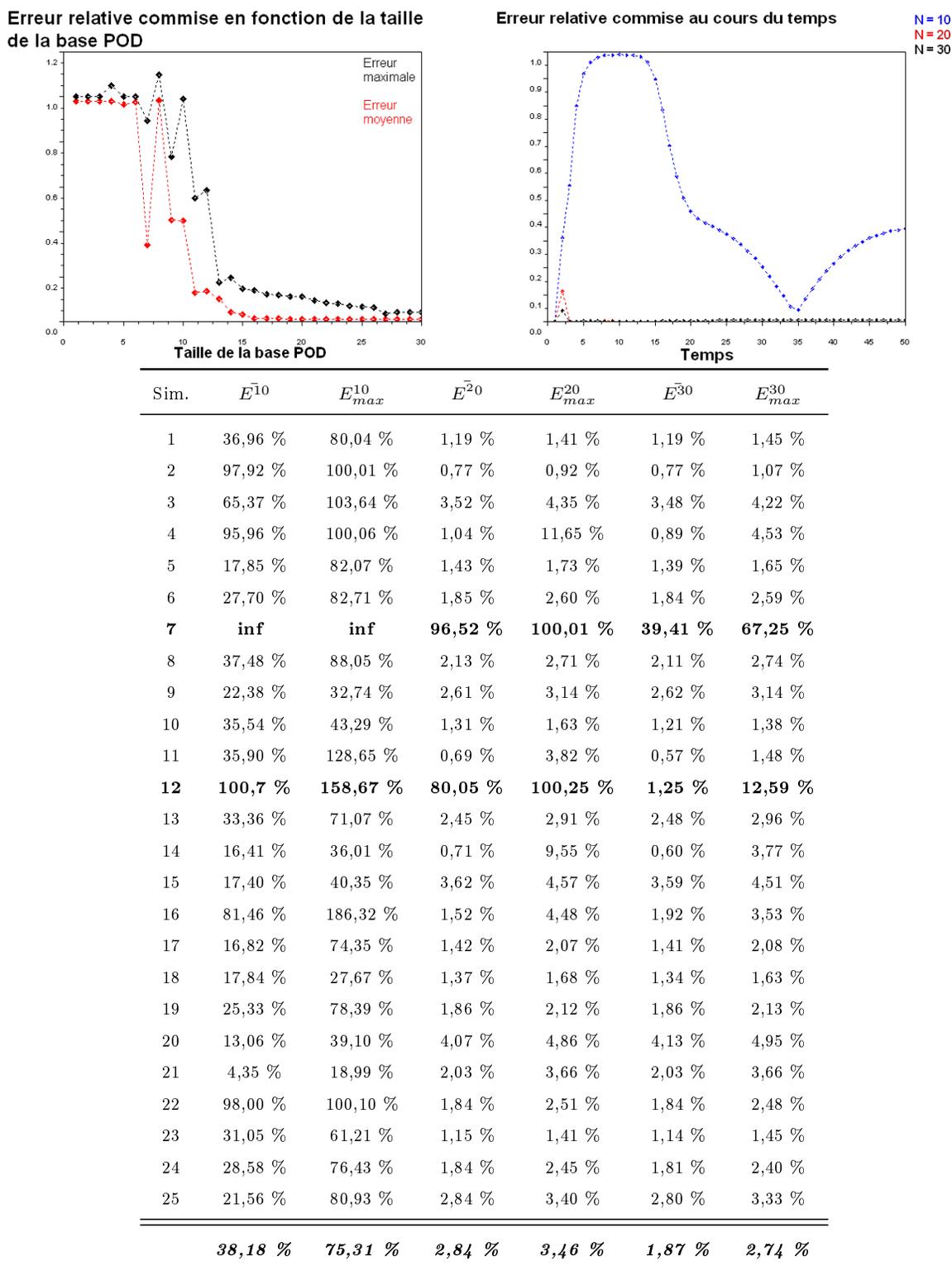


FIG. 7.4 – **Erreur de réduction.** (Haut gauche) Moyenne temporelle (courbe rouge) et maximum (courbe noire) de l'erreur relative, en fonction de la taille de la base POD. (Haut, droite) Erreur relative commise pour $N = 10$ modes (bleu), $N = 20$ modes (rouge) et $N = 30$ modes (noir), en fonction du temps. (Bas) Tableau récapitulatif de l'erreur de réduction relative (maximale ou moyennée au cours du temps) pour chaque jeu de paramètres ayant servi à la construction de la base POD (valeurs disponibles Figure 7.1 page 147). Les simulations correspondent aux conditions initiales 1. La dernière ligne représente la moyenne de l'erreur sur les différents paramètres.

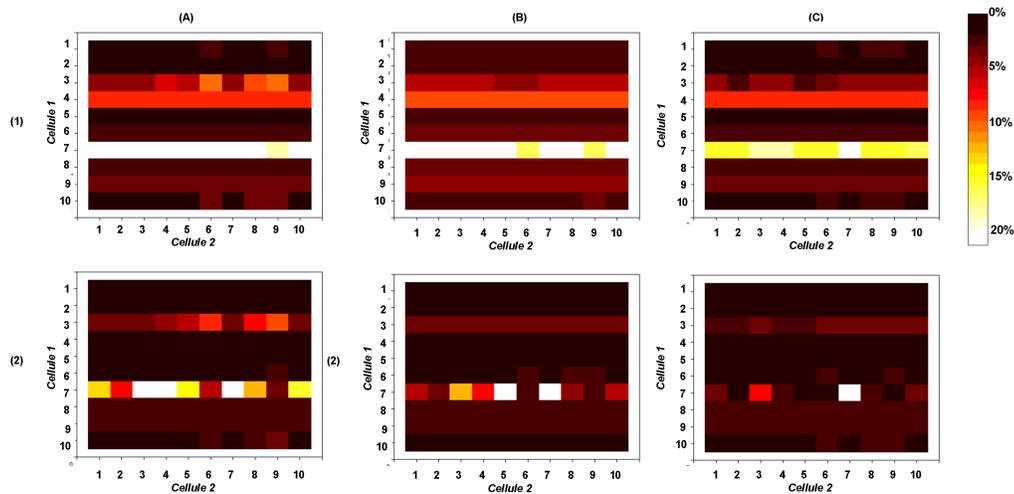


FIG. 7.5 – Robustesse de la base POD vis-à-vis de la propagation. L'erreur relative est évaluée pour la cellule donneuse (cellule 1) lorsqu'elle est en contact avec la cellule 2. A l'instant t , elle est donnée par $E_r(t) = \frac{\sum_{x=1}^{5000} |u_{COMP}(x,t) - u_{RED}(x,t)|}{\sum_{x=1}^{5000} |u_{COMP}(x,t)|}$ avec $u_{COMP}(x,t)$ correspondant à la distribution en taille des agrégats au temps t , obtenues par intégration numérique du modèle détaillé, et $u_{RED}(x,t)$ correspondant à la distribution en taille des agrégats au temps t , obtenues par intégration numérique du modèle réduit. (1) Erreur relative moyenne (2) Erreur relative maximale (A) Propagation indépendante de la taille des agrégats (B) Propagation inversement proportionnelle à la taille des agrégats (C) Propagation inversement proportionnelle à la racine carrée des agrégats. Les jeux de paramètres cinétiques testés sont numérotés de 1 à 10 et correspondent aux valeurs données Figure 7.1 page 147

3.2.4 Robustesse de la base POD vis-à-vis de la propagation

Dans une population cellulaire hétérogène, la propagation intercellulaire des Prions peut conduire à des perturbations brutales de la dynamique de la réplication intracellulaire des Prions, notamment dans le cas de deux cellules adjacentes très différentes vis-à-vis des paramètres cinétiques du modèle de réplication. Nous avons donc évalué la capacité du modèle réduit à reproduire fidèlement la dynamique intracellulaire des Prions en présence de propagation intercellulaire, à l'aide d'un modèle réduit à deux cellules. Initialement, la cellule donneuse est infectée, et la cellule receveuse est saine. La figure 7.5 représente l'erreur relative maximale commise pour 10 jeux différents de paramètres cinétiques ayant servi à la construction de la base POD (jeux 1 à 10 de la figure 7.1). Cette erreur reste faible pour les jeux de paramètres compatibles (autre que le numéro 7), elle augmente lorsqu'on augmente la vitesse de propagation.

La base POD semble donc apte à reproduire la dynamique multicellulaire du mécanisme de polymérisation nucléée, dans le cas d'une population de cellules hétérogènes en terme de réplication et capable de disséminer l'infection vers les cellules voisines.

4 Conclusion et perspectives

L'enjeu de ce travail était de tester une méthode permettant de réduire la dimension du système de polymérisation nucléée des Prions, afin de le rendre compatible avec les contraintes de stockage et de vitesse d'exécution imposées par un modèle multicellulaire, tout en conser-

vant la connaissance de la dynamique complète du système. Cette étude est motivée par la nécessité d'étudier la robustesse de la distribution en taille des agrégats dans une population cellulaire hétérogène. En effet, nous souhaitons extraire de la distribution en taille des agrégats les paramètres de réplication, par des techniques de problèmes inverses par exemple. Cette estimation paramétrique reposerait alors sur des données expérimentales pouvant être issues de populations cellulaires hétérogènes.

La technique POD utilisée ici consiste à choisir comme espace de réduction un sous-espace contenant le maximum d'information sur la dynamique du système. La base de ce sous-espace est construite à partir des connaissances sur le système, et sa fiabilité, c'est-à-dire sa capacité à reproduire le comportement dynamique du système, dépend très fortement des données choisies pour la construire. Il n'existe à l'heure actuelle aucune procédure standardisée permettant de sélectionner au mieux les données à utiliser, qui dépendent très fortement du système à réduire. Nous avons établi et testé une procédure de construction de la base POD de Masel consistant à combiner différents paramètres cinétiques et différentes conditions initiales [379,380]. En raison du manque de données précises disponibles sur la relation entre la taille des agrégats et leurs propriétés de réplication, nous avons validé cette procédure pour des paramètres cinétiques de réplication indépendants de la taille des agrégats. Toutefois, les calculs nécessaires à la réduction du modèle effectués ici sont facilement généralisables au cas de paramètres non constants. Lorsqu'une meilleure connaissance de la dépendance en taille des paramètres de réplication aura été obtenue à partir des données de fibrillation *in vitro*, une procédure similaire pourra être mise en place pour réduire le système à paramètres taille-dépendants, et ainsi étudier l'influence de l'hétérogénéité cellulaire et de la dissémination intercellulaire des Prions sur leur distribution en taille. Un tel modèle, couplant les paramètres taille-dépendants et l'hétérogénéité cellulaire, pourrait aider à la compréhension du mécanisme de tropisme de souche.

Le modèle réduit à paramètres constants a d'ores-et-déjà été intégré dans un automate cellulaire capable de simuler la réplication et la dissémination des Prions dans une population cellulaire hétérogène. Il pourra permettre d'obtenir les distributions théoriques des Prions en fonction de leur taille, dans un contexte multicellulaire. Après intégration dans l'automate cellulaire de réactions cellulaires spécifiques des infections à Prions, les données théoriques pourraient par la suite être utilisées pour l'estimation des paramètres de réplication à partir des distributions expérimentales des Prions en culture cellulaire ou *in vivo*.

Troisième partie

Implication de l'hétérogénéité des populations cellulaires

Chapitre 8

Les modèles individus-centrés pour la biologie cellulaire

Les équations différentielles ont longtemps constitué l'outil fondamental de base de la modélisation en biologie cellulaire. Elles sont couramment utilisées pour décrire la dynamique de la croissance cellulaire [381]. Lorsqu'elles sont suffisamment simples, les équations différentielles ordinaires (EDO) bénéficient d'un cadre théorique très développé (étude des états d'équilibre, théorie des bifurcations pour prédire pour quelles valeurs de paramètres le système passe d'un état à un autre, etc...). Toutefois, le recours aux EDO suppose que les mécanismes étudiés sont homogènes et uniformément distribués dans l'espace durant le temps de la simulation. Cette hypothèse, souvent irréaliste, peut influencer fortement la dynamique théorique du système [382]. L'utilisation d'équations aux dérivées partielles (EDP) permet de pallier cette limitation et d'intégrer une variable d'espace au modèle. Cependant, ces modèles sont très sensibles aux discontinuités d'espace. Enfin, pour les EDO comme pour les EDP, le calcul effectué est un calcul du comportement moyen du système, qui apporte peu d'informations sur les écarts possibles des cellules par rapport à ce comportement.

En raison de ces limitations, une alternative de plus en plus prisée aux modèles différentiels consiste à développer des modèles individus-centrés (MIC). L'objectif de ce chapitre est de présenter ce formalisme particulier et ses applications à la biologie cellulaire.

1 Description de l'approche individus-centrée

Les MIC représentent explicitement dans le modèle les entités qui composent une population, leur environnement et leurs interactions (entre elles ou avec l'environnement). Une fois le modèle de chaque individu réalisé, ils sont mis en relation afin de simuler le comportement collectif de la population complète. Il existe différents types de modèles individus-centrés, qui s'inscrivent dans le cadre d'une définition formelle générale [383].

1.1 Définition formelle d'un modèle individu-centré

Formellement, un MIC est un quintuplet $\mathcal{M} = \{\mathcal{A}, \mathcal{G}, \mathcal{E}, \mathcal{S}, \mathcal{T}\}$, où :

\mathcal{A} est l'ensemble des agents.

\mathcal{G} est le graphe d'interaction entre les agents du modèle.

\mathcal{E} est l'environnement dans lequel sont situés les agents.

\mathcal{S} est l'ensemble des facteurs exogènes du modèle (les scénarios de simulations, etc...).

\mathcal{T} représente le temps.

Chaque agent $\mathcal{A}_i \in \mathcal{A}$ du modèle est défini par un **vecteur d'état** X_i , qui évolue au cours du temps selon une **règle d'évolution** f_i . L'ensemble des états possibles de l'agent \mathcal{A}_i est inclus implicitement dans la définition de la fonction de transition (*i.e.* son domaine de définition). L'hétérogénéité de la population est prise en compte via des valeurs de caractéristiques et des fonctions de transition spécifiques de chaque individu. Toutefois, la représentation des individus doit être homogène (même dimension et même domaine de définition).

On associe également à chaque agent une **fonction de proximité topologique** v , permettant d'extraire le voisinage \mathcal{V} de l'agent, c'est-à-dire les individus de la population en relation avec cet agent, par :

$$v : \mathcal{A} \times \mathcal{G} \rightarrow \mathcal{A}$$

$$v(\mathcal{A}_i, \mathcal{G}) = \{\mathcal{A}_j \in \mathcal{A} \mid (\mathcal{A}_i, \mathcal{A}_j) \in \mathcal{G}\} = \mathcal{V}$$

Une **configuration** de \mathcal{M} à l'instant t est la donnée $\mathcal{A}(t) = \{X_i(t)\}$. Elle représente l'état global de la population à un instant donné.

Le système évolue en temps discret, selon les règles de transition suivantes :

e1 Mise-à-jour de la population : $X_i(t+1) = f_i(v(\mathcal{A}_i(t), \mathcal{G}(t)), \mathcal{E}(t), \mathcal{S}(t))$.

e2 Mise-à-jour des interactions : $\mathcal{G}(t+1) = \Gamma(\mathcal{A}(t), \mathcal{G}(t), \mathcal{E}(t), \mathcal{S}(t))$

e3 Mise-à-jour de l'environnement : $\mathcal{E}(t+1) = h(\mathcal{A}(t), \mathcal{G}(t), \mathcal{E}(t), \mathcal{S}(t))$

La mise à jour du vecteur d'état **e1** correspond à un processus markovien (*i.e.* l'état du système à l'instant t ne dépend que de l'état du système à l'état $t-1$, et non des états ultérieurs). Toutefois, le cas non markovien, où la fonction de transition prend en compte une partie des états précédents de l'agent, est souvent considéré. Dans ce cas, on se ramène à la formulation **e1** en redéfinissant le vecteur d'état par $\bar{X}_i(t) = (X_i(t), X_i(t-1), \dots)$.

La règle **e2** d'évolution du graphe d'interaction est optionnelle et souvent absente des modèles, qui reposent alors sur un graphe statique. Toutefois, elle permet de prendre en compte la création ou la mort cellulaire [274]. Sa dépendance avec l'environnement ou les facteurs exogènes est particulièrement adaptée à la modélisation d'un stress ou autre stimulus extérieur s'exerçant sur une population de cellules. De même, la sécrétion de facteurs de croissance ou autres facteurs cellulaires intervient via la variation de l'environnement (**e3**).

1.2 Différentes approches individus-centrées

1.2.1 La microsimulation

Introduite par Orcutt en 1957 [384], la microsimulation consiste à modéliser une population par un ensemble d'individus, qui évoluent dans le temps indépendamment des autres individus

de la population. A chaque pas d'évolution, l'état d'un individu est mis à jour selon la fonction de transition f_i , donnée par (avec les notations introduites précédemment) :

$$X_i(t + 1) = f_i(X_i(t), \mathcal{E}(t), \mathcal{S}(t)).$$

La fonction f_i est supposée probabiliste. Dans la mesure où l'état d'un individu évolue de façon indépendante de l'état des autres individus, la définition des modèles de microsimulation est très proche de celle des modèles différentiels (en particulier, les modèles EDP structurés en âge, comme les modèles épidémiologiques type cohorte, présentés au chapitre 3, page 55). Dans le cas où la simulation regroupe un nombre important d'individus, l'espérance moyennée sur plusieurs microsimulations s'approche de l'état calculé à partir du modèle différentiel. Toutefois, le résultat des microsimulations est une distribution de l'occurrence des états probables, et non une estimation scalaire (*i.e.* l'état le plus vraisemblable, donné par les modèles différentiels), ce qui permet d'estimer l'incertitude due à l'hétérogénéité individuelle.

La microsimulation a été utilisée en biologie pour modéliser la propagation des épidémies dans une population d'individus [385,386]. En particulier, ce formalisme a permis de simuler la persistance de l'épidémie de Trypanosomiase (aussi appelée maladie du Sommeil) en Gambie, malgré des taux de transmission inter-individuelle très faibles, conduisant à une extinction de la maladie dans les modèles différentiels [386]. Toutefois, en raison même de sa définition, la microsimulation ne permet pas d'expliquer les phénomènes collectifs émergeant des relations entre les individus. Aucun modèle par microsimulation n'a donc été développé pour la biologie cellulaire.

1.2.2 Les automates cellulaires

Les automates cellulaires (AC) constituent l'approche individus-centrée la plus courante. Ils sont apparus en même temps que l'informatique, dans les années quarante. Ils ont initialement été introduits par John van Neumann et Stanislaw Ulam, sous le nom d'« espaces cellulaires », afin d'étudier les mécanismes d'auto-reproduction [387]. Leur modèle de base consiste en une grille régulière de « cellules », chaque cellule pouvant avoir 2 états (allumé ou éteint) variant en fonction de l'état de leurs voisines. Leurs travaux ont montré que des formes complexes et organisées peuvent être générées à partir de règles locales d'évolution extrêmement simples [388]. Les AC ont ensuite été très utilisés à partir des années 70, suite aux travaux de John Conway sur un automate particulier en dimension 2 et à 2 états : le Jeu de la Vie (Figure 8.1).

Les AC traditionnels consiste en une grille régulière uniforme de dimension N , pouvant être finie ou infinie. La grille contient un ensemble de variables discrètes (*cellules*) à chaque site, pouvant prendre m valeurs possibles. L'état d'un AC est complètement défini par la valeur de toutes les variables. L'état d'une cellule évolue en temps discret selon une règle d'évolution déterministe dépendant uniquement de l'état de la cellule et celui de ses voisines, c'est-à-dire que la mise à jour de l'état d'un individu s'effectue selon la relation (avec les notations introduites précédemment) :

$$X_i(t + 1) = f(v(\mathcal{A}_i(t), \mathcal{G}(t))).$$

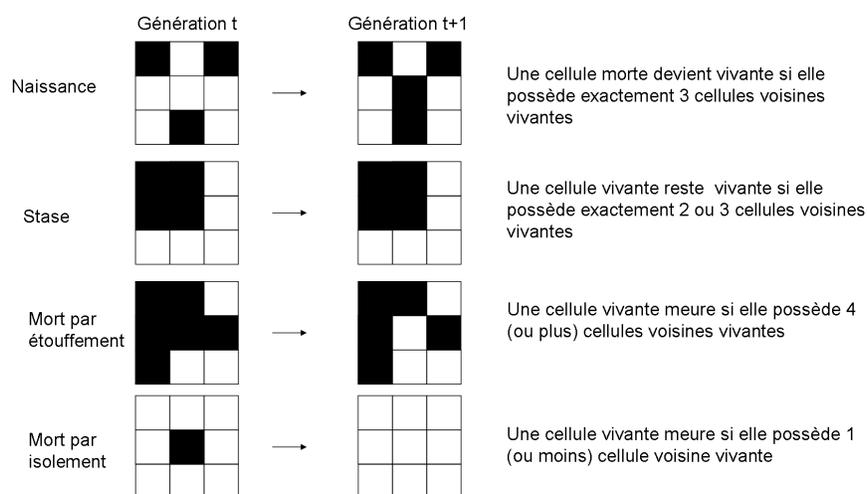


FIG. 8.1 – Le jeu de la vie. Une cellule est soit vivante (noire), soit morte (blanche). Les règles d'évolution sont appliquées ici uniquement à la cellule centrale.

Les graphes d'interaction \mathcal{G} les plus classiques sont les voisinages de van Neumann, de Moore ou de Moore étendu pour les graphes fixes, et le voisinage de Margolus pour les graphes dépendants du temps. Ils sont représentés Figure 8.2.

Il est possible de concevoir des automates cellulaires qui généralisent cette définition de base. Par exemple, il est possible de trouver :

des automates cellulaires probabilistes : généralement, la fonction de transition f est entièrement déterministe, mais elle peut également dépendre d'une variable aléatoire. Ces AC sont particulièrement utilisés en biologie, où la notion de hasard est omni-présente [389].

des automates cellulaires non uniformes : toutes les cellules ne sont pas soumises aux mêmes règles [390].

des automates cellulaires asynchrones : l'état des différentes cellules est mis à jour cellule par cellule au cours d'un pas de temps [391]. Le pas de temps peut également varier au cours du temps [392].

des automates cellulaires continus : encore appelés AC à valeurs réelles. Les caractéristiques des entités ne varient pas plus de façon discrète (représentées par un entier naturel), mais de façon continue et sont représentées par un nombre réel [393].

des automates cellulaires partitionnés : au lieu de transmettre tout son état à chacun de ses voisins, une cellule envoie un message différent à chaque voisin [390].

1.3 Enjeux, avantages et limites des MIC

Enjeux. L'enjeu principal des MIC pour la biologie cellulaire est de clarifier le lien qui existe entre les phénomènes collectifs au niveau de la population cellulaire (nombre d'individus infectés, niveau global d'infection, etc...) et les phénomènes locaux au niveau de la cellule. Conte et Castelfranchi [394] distinguent ainsi deux approches :

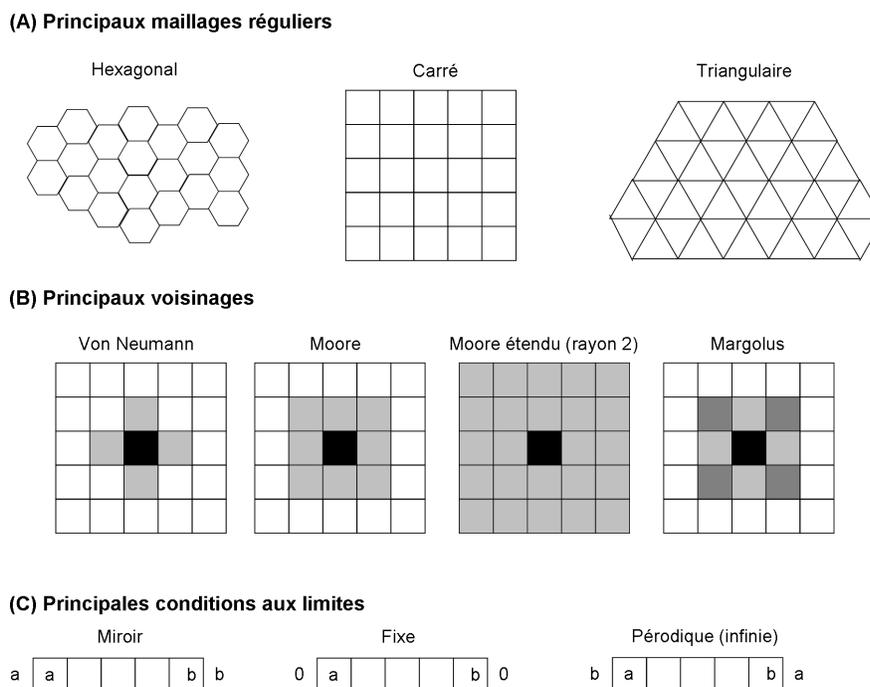


FIG. 8.2 – Structure classiques des AC. La structure d'un automate cellulaire est définie par : (A) un maillage, (B) un voisinage et (C) des conditions aux frontières. Le voisinage de Margolus est mobile dans le temps (cellules gris claires à l'instant t et cellules gris foncées à l'instant $t + 1$).

- *l'approche "bottom-up"*, qui consiste à étudier les propriétés macroscopiques du système à partir des connaissances sur les propriétés individuelles. En effet, une caractéristique importante des MIC est leur capacité à générer des comportements complexes et des formes organisées à partir de règles d'évolution locales simples [388] (Figure 8.3) ;

- *l'approche "top-down"*, qui s'appuie sur la connaissance du comportement collectif. Des hypothèses sont émises sur les propriétés individuelles et modélisées. Le comportement collectif théorique est alors comparé aux données expérimentales pour valider ou invalider les hypothèses individuelles.

Avantages et limites. L'approche individus-centrée s'appuie principalement sur l'informatique, et plus particulièrement la programmation orientée-objet, qui autorise une grande flexibilité et une modularité des modèles. Ceux-ci peuvent ainsi être réalisés avec un grand niveau de détails conceptuels, ce qui rend les modèles convaincants pour l'expérimentateur. Ainsi, de nombreux MIC sont implémentés dans un langage objet (SmallTalk, Java ou C++). Plus spécifiquement, il existe quelques plateformes de simulation informatique individus-centrées dédiées à la biologie. Elles s'appliquent principalement à l'écologie marine (SimDelta, RIVAGE ou SeaLAB [395]). La plateforme SwarmGecko [395], initialement développée en Java pour la simulation d'écosystème, s'applique également à la croissance de biofilms. Toutefois, ces plateformes sont dédiées à un système particulier et restent peu exploitables pour les problèmes de biologie cellulaire et de propagation d'infection.

En outre, les MIC offrent la possibilité d'intégrer l'hétérogénéité de la population dans un

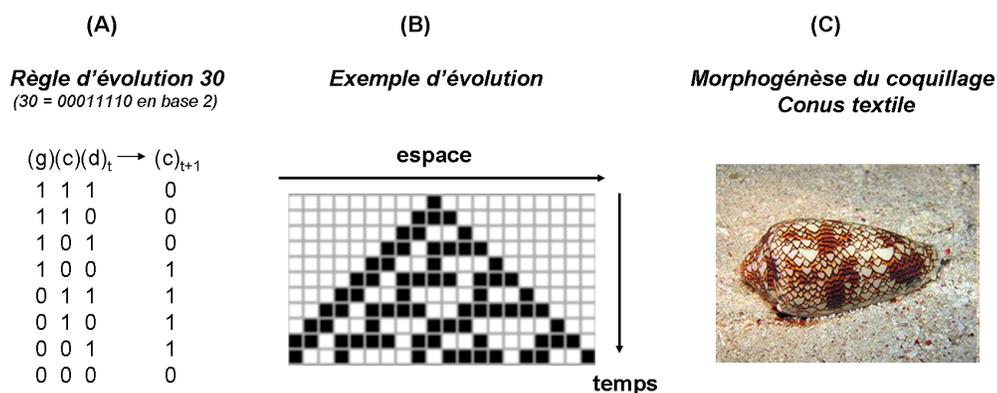


FIG. 8.3 – Les automates cellulaires à 1 dimension. Les AC les plus étudiés sont les AC 1D (*i.e.* une ligne) à 2 états. Le voisinage d'une cellule est constitué de la cellule elle-même (c) et des cellules immédiatement à gauche (g) et à droite (d). (A) Les règles d'évolution sont définies par un octet binaire, dont la valeur en base 10 donne le nom de la règle. Ici, exemple de la règle 30. (B) Leur évolution est classiquement représentée dans un diagramme espace-temps, et peut conduire à des structures particulières, comme ici la morphogénèse du coquillage *Conus textile* (C).

modèle et la possibilité de prendre en compte facilement des processus spatiaux et des structures relationnelles [383]. En particulier, ils intègrent facilement des mécanismes cellulaires complexes, comme l'inhibition de contact ou la migration cellulaire [396].

Toutefois, ils présentent eux-aussi quelques inconvénients, explicités dans le cas des réseaux sociaux [383] mais valables également pour les systèmes biologiques : leur grande stochasticité introduite dans les états initiaux et dans les règles d'interactions ; leur grande expressivité, générée par la facilité de création d'un modèle et conduisant à prendre en compte trop de mécanismes distincts ; et leur complexité intrinsèque, pas toujours identifiable sur la base d'un comportement collectif [397].

2 Exemples d'applications des AC pour la biologie cellulaire

Les modèles individus-centrés sont couramment utilisés dans de nombreuses disciplines, incluant la biologie, l'écologie, l'économie et la sociologie. Il existe notamment un intérêt croissant pour les modèles biologiques situés à l'échelle d'une population cellulaire, et tout particulièrement pour les phénomènes de croissance des cellules cancéreuses [398] et les réponses immunitaires au cours de l'infection par différents pathogènes [399].

2.1 Immunité et propagation virale

Ces dernières années, les AC ont été très utilisés pour explorer les mécanismes clé de la réponse immunitaire, incluant les interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques, les réactions des centres germinatifs, la dynamique de propagation du VIH, de la grippe ou de la tuberculose, et les réponses immunitaires primaires et secondaires à la présentation répétée d'antigènes [399]. Plusieurs plateformes de simulations

sont à disposition des modélisateurs et des expérimentateurs : IMMSIV, SIMMUNE, Reactive Animation et SIS qui permettent d'explorer les réponses immunitaires, et CyCells, PathSim et MASyV, qui permettent d'étudier une large variété d'interactions hôtes-pathogènes [400]. Quelques modèles simples permettant d'illustrer l'intérêt des MIC par rapport aux systèmes différentiels sont présentés par la suite.

Un modèle simple de recrutement des lymphocytes T [401]. Louzoun et al s'intéressent à la dynamique spatiale de production des lymphocytes T en fonction de la présence d'antigènes, par le biais d'un système d'EDO sur une grille discrète :

$$\begin{aligned}\frac{dL_i}{dt} &= \tau A_i L_i - \mu_L L_i + \delta_L \nabla^2 L_i, \\ \frac{dA_i}{dt} &= \lambda - \mu_A A_i + \delta_A \nabla^2 A_i.\end{aligned}\tag{8.1}$$

où i représente le site de la grille considéré, A et L les concentrations respectives en antigènes et en lymphocytes. λ représente le taux de production d'antigène, τ le taux de division des lymphocytes en présence d'antigènes, μ_A et μ_L sont les taux de dégradation respectifs des antigènes et des lymphocytes. Les derniers termes représentent la diffusion des particules vers les sites voisins.

Les simulations de ce modèle démontrent que la population des lymphocytes T va subir une croissance exponentielle dans les sites où $A_i \tau > \mu_L$ et une décroissance exponentielle sinon. Ainsi, la concentration moyenne en cellule va croître exponentiellement, de façon proportionnelle à la concentration des sites majoritaires en antigènes, et non proportionnellement à la concentration totale en antigènes comme cela est supposé dans les modèles non spatiaux. Ils démontrent également que les modèles EDO homogènes conduisent à une sous-estimation du pouvoir pathogène des antigènes [401].

Un modèle générique de propagation virale [402]. Funk et al. étudient l'effet de l'hypothèse d'homogénéité spatiale supposée par le modèle classique de propagation virale introduit par Perelson :

$$\begin{aligned}\frac{dT_{i,j}}{dt} &= \lambda - \mu_T T_{i,j} - k T_{i,j} V_{i,j} \\ \frac{dI_{i,j}}{dt} &= k T_{i,j} V_{i,j} - \mu_I I_{i,j} \\ \frac{dV_{i,j}}{dt} &= p I_{i,j} - \mu_V V_{i,j} - \frac{m_v}{8} \sum_{i_0=i-1}^{i+1} \sum_{j_0=j-1}^{j+1} [V_{i,j} - V_{i_0,j_0}]\end{aligned}\tag{8.2}$$

où i et j sont des indices de positions, T , I et V représentent respectivement la quantité de cellules cibles, la quantité de cellules infectées et la quantité de virions. λ représente le taux de production de cellules cibles, μ_T , μ_I et μ_V les taux de dégradation des différentes particules, k le taux d'infection des cellules par les virions, et p le taux de production de virions par les cellules infectées.

Dans ce modèle, seuls les virions sont autorisés à diffuser dans l'espace, les cellules restent fixes. Funk et al démontrent que l'état d'équilibre de la population est le même que celui obtenu par le modèle EDO. Toutefois, ils remarquent que la dynamique de relaxation vers cet état d'équilibre est différente selon le modèle, la plus réaliste étant celle obtenue grâce au modèle spatial [402].

Propagation du virus de la grippe et Réponse immunitaire [403]. Beauchemin a développé un AC en deux dimensions très simple permettant de simuler le recrutement des lymphocytes en cas d'infection d'une population de cellules épithéliales. Ce modèle prend en compte 2 espèces : les cellules épithéliales (cibles de l'infection) et les cellules immunitaires. Les particules virales ne sont pas explicitement considérées, l'infection est supposée se propager implicitement de cellules en cellules (selon une approche Susceptible-Infecté-Exprimant-Infectieux-Mort). Les règles d'évolution sont les suivantes :

Cellules épithéliales :

1. Les cellules s'infectent à un taux $\beta/8 \times$ Nombre de voisins infectieux.
2. Une cellule infectée commence à exprimer des antigènes au bout d'un temps τ_E .
3. Une cellule exprimant des antigènes devient infectieuse au bout d'un temps τ_I .
4. Une cellule morte est remplacée par une cellule saine à un taux $1/b \times$ Nombre de cellules

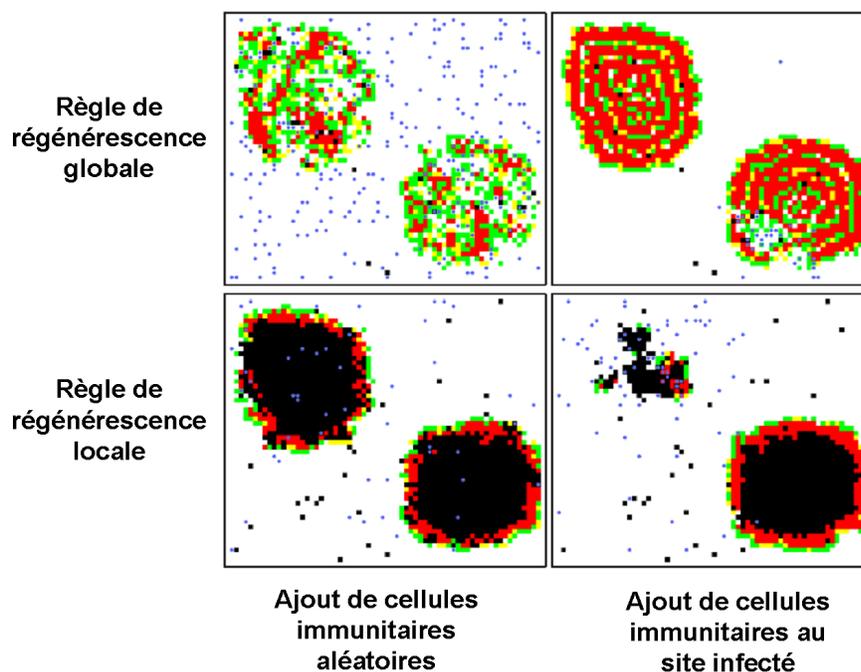


FIG. 8.4 – Propagation de la grippe dans une population cellulaire. Capture d'écran de simulations du modèle de propagation du virus de la grippe dans une population de cellule épithéliale, d'après l'automate décrit par Beauchemin (Cellule saine = blanche, exposée = verte, exprimante = jaune, infectée = rouge, morte = noire, immunitaire = bleue). D'après [403]. La capacité d'une case vide à devenir une cellule saine dépend soit du nombre total de cellules saines en culture (régénérescence globale), soit du nombre de cellules saines voisines de la case considérée (régénérescence locale).

saines / Nombre de cellules mortes.

5. Une cellule meurt naturellement au bout d'un temps δ_H .

6. Une cellule infectieuse meurt au bout d'un temps δ_I , sauf lorsqu'elle est reconnue avant par une cellule immunitaire (voir règle 10).

Cellules immunitaires :

7. Des cellules immunitaires inactives sont ajoutées aléatoirement dans des sites de l'AC pour maintenir une densité minimale ρ_M de cellules immunitaires inactives par cellule épithéliale.

8. Une cellule immunitaire meurt au bout d'un temps δ_M .

9. Une cellule immunitaire inactive devient active lorsqu'elle occupe le même site qu'une cellule épithéliale exprimant des antigènes.

10. Si une cellule immunitaire active occupe le même site qu'une cellule épithéliale exprimant des antigènes, elle tue la cellule épithéliale. r_M cellules immunitaires actives sont alors rajoutées aléatoirement sur la grille.

Ce modèle est une version spatiale simplifiée de modèles homogènes par EDO existant pour simuler la propagation de la grippe, capable de reproduire les mêmes comportements avec moins de paramètres. De plus, deux types de règles ont été implémentées concernant le repeuplement en cellules saines : un repeuplement global (où la capacité d'une case vide à devenir une cellule saine dépend du nombre total de cellules saines dans la population) ou un repeuplement local (où la capacité d'une case vide à devenir une cellule saine dépend du nombre de cellules saines dans son voisinage). La règle de repeuplement global, qui mime la dynamique des modèles différentiels, conduit à un nombre cumulé plus important de cellules infectées (zones locales infectées plusieurs fois) et force l'infection à se propager en vague circulaire fine ([403] et figure 8.4). Ce comportement n'ayant jamais été observé expérimentalement, le modèle par AC semble plus proche de la réalité biologique.

2.2 Croissance tumorale

De nombreux aspects de la croissance tumorale ont été étudiés mathématiquement, souvent par des modèles agrégés déterministes de type réaction-diffusion, mais également par de nombreux modèles individus-centrés [398]. L'intérêt pour les MIC découle du fait que les tumeurs sont très hétérogènes et consistent en différentes populations cellulaires, dont l'évolution est étroitement liée à leur environnement (angiogénèse, interaction avec la matrice extracellulaire ou avec les cellules immunitaires, etc...). Les premiers MIC de type automates cellulaires en cancérologie ont été développés par Düchting et Vogelsaenger en 1983 pour étudier les effets de la radiothérapie [404]. A l'heure actuelle, les modèles cherchent à étudier l'impact de l'environnement (nutriment, densité cellulaire, etc...) sur la croissance des tumeurs, ainsi que les processus cellulaires mis en place en réaction à l'environnement [393]. Ils consistent pour la plupart en des modèles hybrides, simulant la diffusion des nutriments par des EDP et les comportements cellulaires de façon discrète.

Un exemple d'AC hybride pour la croissance tumorale [393]. Gerlee et Anderson ont récemment développé un automate cellulaire hybride permettant d'étudier l'évolution des cellules tumorales en réponse à leur environnement. Le modèle consiste en une grille à deux

dimensions. Chaque case, occupée ou non par une cellule tumorale, est associée à une concentration en nutriments et une concentration en matrice extracellulaire.

Modèle de diffusion des nutriments : les nutriments varient de façon continue par un mécanisme de réaction-diffusion

$$\begin{aligned}\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} &= D_c \nabla^2 c(x,t) - f_c(x,t) \\ \frac{\partial g(x,t)}{\partial t} &= D_g \nabla^2 g(x,t) - f_g(x,t) \\ \frac{\partial h(x,t)}{\partial t} &= D_h \nabla^2 h(x,t) + f_h(x,t)\end{aligned}\tag{8.3}$$

avec c , g et h les concentrations respectives en oxygène, glucose et hydrogène à la position x . Les paramètres D_i sont les coefficients de diffusion. Les fonctions f_i représentent la consommation (ou la production) en nutriments, elles sont non nulles uniquement aux positions où il existe une cellule.

Modèle de la matrice extracellulaire (MEC) : la MEC est un ensemble de molécules responsables de l'adhésion cellulaire. Elle est dégradée en conditions acides (dépendant de la concentration en hydrogène) et en cas de cellules adjacentes, d'où l'équation :

$$\frac{\partial m(x,t)}{\partial t} = -e_c I(x,t)m(x,t) - e_h(h(x,t) - h_0)m(x,t)\tag{8.4}$$

avec m la concentration en MEC à la position x et au temps t , e_c le taux de dégradation dû aux cellules adjacentes, I le nombre de cellules adjacentes et e_h le taux de dégradation dû à l'acidité.

Modèle d'une cellule : chaque cellule possède un mécanisme de décision qui détermine son comportement en fonction des paramètres environnementaux c , h , g , m et du nombre de voisins. La règle de décision est modélisée par un réseau de neurones artificiels. Trois comportements sont possibles :

- *prolifération* : la cellule se divise, à condition d'avoir suffisamment d'espace et un âge suffisant. Dans ce cas, une nouvelle cellule fille est créée, avec des paramètres du réseau de neurones mutés aléatoirement.

- *apoptose* : la cellule meurt et disparaît.

- *quiescence* : la cellule ne fait rien. Toutefois, la consommation des ressources est réduite.

Le comportement correspondant à la sortie la plus grande du réseau de neurones est appliqué. Une quatrième sortie permet de sélectionner le métabolisme de cellule : lorsque la valeur de sortie est négative, la glycolyse est choisie (consommation de glucose et production d'hydrogène); dans le cas contraire, un métabolisme aérobie est préféré (consommation d'oxygène uniquement). Les résultats de simulation suggèrent que les traitements anti-angiogénèse (destinés à limiter l'apport en oxygène des tumeurs) peuvent ne pas limiter la croissance tumorale, mais au contraire conduire à la génération d'une tumeur à dominance glycolytique, et donc résistante aux traitements. Ce modèle a ainsi permis d'étudier en détail les réponses des cellules

en fonction de leur environnement, notamment la morphologie de la tumeur et le phénotype glycolytique, observé depuis les années 30 mais encore mal compris, qui émerge ici grâce à la modélisation de l'évolution individuelle des cellules [393].

2.3 Synthèse des règles d'évolution classiques

Les modèles donnés en exemple dans les sections précédentes permettent d'illustrer l'apport des MIC dans la compréhension des phénomènes spatiaux ou dans la caractérisation des réponses cellulaires. Toutefois, ils ne capturent pas la diversité des modèles individus-centrés développés pour la biologie cellulaire. Le tableau 8.1 synthétise (de façon non exhaustive) les différentes règles d'évolution utilisées classiquement pour modéliser le comportement d'une population de cellules. Ces comportements sont séparés en plusieurs catégories : (i) règles de prolifération cellulaire ; (ii) règles de migration des cellules ; (iii) règles de propagation/production de particules (virale, nutriments, etc...).

Règles de prolifération cellulaire	
Une cellule vide devient occupée en fonction du nombre de cellules totales (<i>i.e.</i> régénérescence globale)	Beauchemin, 2005
Une cellule vide devient occupée en fonction du nombre de cellules voisines (pas de prise en compte du cycle cellulaire)	Beauchemin, 2005
Une cellule se divise si elle a un âge/une masse suffisante et la place de se diviser (âge fixé au départ). Dans ce cas, l'âge/la masse évolue souvent selon un modèle classique de croissance par EDP/EDO.	Lee, 2006
Une cellule se divise selon une probabilité dépendante de son âge (et éventuellement de l'environnement)	Gomez-Mourero, 2008
Transition prolifération - quiescence en fonction de l'environnement	Fouliard, 2007
Intégration spécifique de la morphologie cellulaire : une cellule réelle peut occuper plusieurs cases. Prise en compte des déformation élastiques de la cellule.	Galle, 2007
Règles de mortalité	
La cellule disparaît si elle manque de place ou de nutriments (aucune modification du voisinage)	Pratts, 2006
Introduction de la voie de signalisation (Bax, Bcl2) conduisant à la mort par apoptose des cellules	Siehs, 2002
La cellule meure après un cycle d'infection classique (Susceptible, infectée, morte) de façon déterministe (temps écoulé depuis l'entrée dans le stade infecté) ou probabiliste.	Beauchemin, 2005
Migration des cellules	
Mouvement aléatoire des cellules (mouvements brownien)	Gomez-Mourero, 2008
Chemotaxie, haptotaxie (vers les directions de plus faible/plus grand nombre de voisins ou de nutriments)	Gomez-Mourero, 2008
Adhésion cellules/cellules	Gerish 2008, Ramis-Condé 2008, Painter, 2009
Production/propagation de particules virales ou de nutriments	
Propagation de l'infection selon un mécanisme de type SIR, en fonction du nombre de voisins infectés	Matthaus 2005, Ferreira CP
Intégration spécifique de la quantité de particules virales. Mécanisme de réaction-diffusion discrétisé	Funk, 2005

TAB. 8.1 – Exemples de règles d'évolution des AC pour la biologie cellulaire (liste non exhaustive).

3 L'analyse de sensibilité comme outil d'étude des MIC

De nombreux travaux ont été entrepris pour améliorer la compréhension des modèles AC et de leur dynamique, selon des points de vue différents et avec des outils très variés, provenant de la théorie classique des systèmes dynamiques, de l'algèbre ou de la topologie, de la physique statistique, ou encore de la biologie et de l'informatique théorique [405]. Toutefois, ces approches très théoriques restent en plein développement et sont limitées à des AC dont la définition reste simple, avec peu de variables d'entrée. En particulier, les automates cellulaires continus stochastiques, utilisés pour notre étude, restent encore trop complexes à analyser dans le cadre théorique des AC, au contraire des méthodes d'analyse de sensibilité (AS).

3.1 Définition et ambitions de l'analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité étudie comment des perturbations sur les entrées du modèle engendrent des perturbations sur les sorties. Elle s'avère être un outil précieux au cours de l'élaboration, de la construction ou de l'utilisation d'un modèle mathématique [378]. En effet, en étudiant comment la réponse du modèle réagit aux variations de ses variables d'entrée, l'analyse de sensibilité permet de déterminer :

(i) Si le modèle est bien fidèle au processus qu'il modélise. En effet, si l'analyse exhibe une importance forte d'une variable d'entrée qui en réalité est connue comme non influente, le modèle ne reflétera pas correctement le processus. Il sera alors nécessaire de le modifier.

(ii) Quelles sont les variables qui contribuent le plus à la variabilité de la réponse du modèle ? Il sera alors possible, si besoin est, d'améliorer la qualité de la réponse du modèle. Connaissant les variables d'entrée les plus influentes, les erreurs sur la sortie du modèle pourront être diminuées, soit, lorsque cela est possible, en diminuant les erreurs sur les entrées les plus influentes, soit en adaptant la structure du modèle pour réduire l'effet des erreurs sur ces entrées.

(iii) Quelles sont au contraire les variables les moins influentes ? Il sera possible de les considérer comme des paramètres déterministes, en les fixant par exemple à leur espérance, et ainsi d'obtenir un modèle plus léger avec moins de variables d'entrée. Dans le cas d'un code informatique, il sera possible de supprimer des parties de codes qui n'ont aucune influence sur la valeur et la variabilité de la réponse.

(iv) Quelles variables, ou quels groupes de variables, interagissent avec quelles (ou quels) autres : l'analyse de sensibilité peut permettre de mieux appréhender et comprendre le phénomène modélisé, en éclairant les relations entre les variables d'entrée et la réponse du système.

Il existe trois classes d'analyse de sensibilité :

les méthodes de criblage, qui analysent qualitativement l'importance des variables d'entrée sur la variabilité de la réponse du modèle. Elles permettent d'établir une hiérarchie au sein des variables d'entrée en fonction de leur influence sur la variabilité de la réponse [406].

l'analyse de sensibilité locale, qui étudie quantitativement comment de petites perturbations autour d'une valeur standard des entrées se répercutent sur la valeur de sortie [407].

l'analyse de sensibilité globale, qui quantifie la variabilité de la sortie du modèle dans son domaine de variations. Elle étudie comment la variabilité des entrées se répercute sur la variabilité de la sortie, en déterminant quelle part de variance de la sortie est due à une entrée (ou un ensemble d'entrées) donnée [378].

Outre la mise en évidence de motifs spatiaux émergeant des règles d'évolution locales, un des rôles de plus en plus courant des automates cellulaires pour la biologie est de comprendre, parmi un grand nombre de paramètres servant à la définition des règles d'évolution, quels sont ceux qui influencent la sortie du modèle (*i.e.* le phénomène biologique étudié). Dans ce contexte, les méthodes de *screening* semblent particulièrement adaptées.

3.2 Les différentes méthodes de *screening*

Les méthodes de *screening* sont les plus simples pour effectuer une analyse de sensibilité. Elles sont très efficaces quand le modèle à analyser a un nombre considérable de paramètres d'entrée [406]. Le tableau 8.2 ci-dessous recense, parmi toutes les méthodes de *screening*, celles dont le but est d'identifier les facteurs influents.

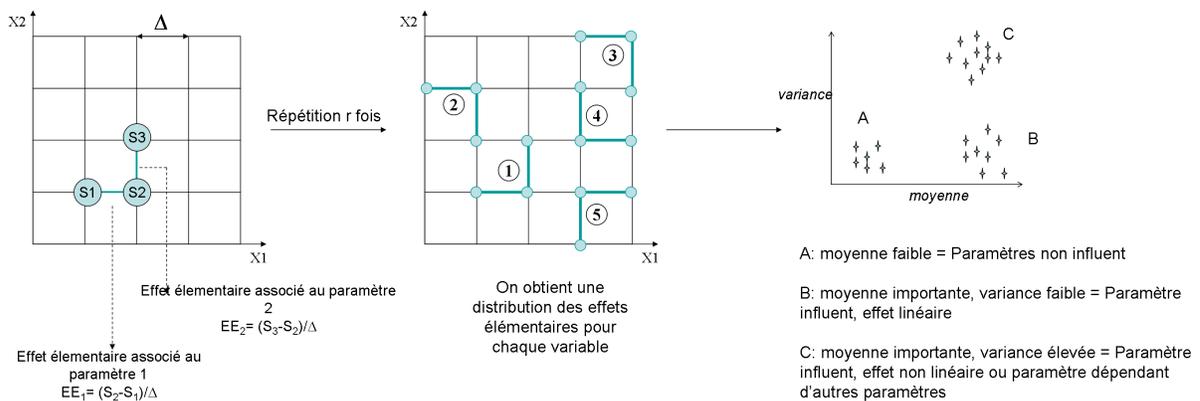


FIG. 8.5 – Méthode de Morris

Méthode	Principe	Avantages/Limites
"One-At-a-Time" (OAT)	Variation d'un seul paramètre à la fois, autours d'une valeur standard. L'effet est évalué par $(y_a - y_s)/2$, avec y_a la sortie après variation du paramètre a et y_s la sortie standard. Deux valeurs sont généralement choisies pour chaque paramètre, de façon équidistante de part et d'autre de la valeur standard.	<i>Avantages</i> : faible coût (complexité en $o(k)$), simplicité. <i>Limites</i> : pas d'estimation des interactions entre les paramètres, forte dépendance du choix du standard (influence locale uniquement)
Morris	On effectue une OAT à différents endroits de l'espace des paramètres. Pour chaque paramètre, une distribution (moyenne et variance) des effets élémentaires est obtenue. Les paramètres ayant une moyenne faible sont peu influents, ceux ayant une moyenne élevée et une variance faible sont influents et ont un effet linéaire sur la sortie, ceux ayant une moyenne élevée et une variance élevés sont influents et ont un effet non linéaire sur la sortie ou agissent en interactions avec d'autres paramètres (voir figure 8.5)	<i>Avantages</i> : faible coût, simplicité d'implémentation, peu de dépendance avec le choix du standard. <i>Limites</i> : Interactions des entrées prises en compte, mais non explicitées
Méthode de Cotter	Chaque facteur possède une valeur "basse" et une valeur "haute". On effectue : - 1 simulation avec tous les facteurs à leur niveau le plus bas (y_0) - k simulations avec chaque facteur à son niveau haut, les autres étant à leur niveau bas (y_j , $j = 1 \dots k$) - k simulations avec chaque facteur à son niveau bas, les autres étant à leur niveau haut (y_{k+j} , $j = 1 \dots k$) - 1 simulation avec tous les facteurs à leur niveau le plus haut (y_{2k+1}) On quantifie ensuite l'importance d'un facteur en évaluant d'une part la variation induite par ce facteur (i.e. $ (y_{2k+1} - y_{k+j}) + (y_j - y_0) $) et d'autre part, la différence des variations autours des valeurs "haute" et "basse" induite par ce facteur (i.e. $ (y_{2k+1} - y_{k+j}) - (y_j - y_0) $).	<i>Avantages</i> : Pas d' <i>a priori</i> nécessaire sur les interactions entre facteurs <i>Limites</i> : l'effet d'un facteur peut être annulé par un autre, manque de précision
"Iterated Fractional Factorial Design"	Un facteur peut avoir deux états (haut ou bas). Les différents facteurs d'entrées sont groupés aléatoirement en K groupes, mis à une valeur "1" ou "-1" (la valeur "1" correspondant à certains paramètres du groupe à leur valeur haute, les autres étant à leur valeur basse; la valeur "-1" correspondant à la situation inverse). L'effet de chaque groupe est évalué selon un échantillonnage factoriel fractionné [378]. Ces étapes sont réalisées plusieurs fois, et les paramètres (ou les combinaisons de paramètres) les plus représentés dans les groupes influents sont les paramètres influents.	<i>Avantages</i> : Estimation des effets principaux et quadratiques, estimations des interactions 2 à 2, faible coût <i>Limites</i> : valable uniquement quand seuls peu de facteurs sont réellement influents, possibilité d'identification de facteurs non influents comme étant influents
Bifurcation séquentielle de Bettonvil	Il est nécessaire au préalable de connaître si un facteur a une influence positive (i.e. une augmentation de ce facteur entraîne une augmentation de la réponse) ou négative (i.e. une augmentation de ce facteur entraîne une diminution de la réponse) sur la sortie du modèle étudiée. Les différents facteurs sont répartis en K groupes. Un groupe est mis à son état haut quand tous les facteurs positifs sont à leur valeur haute et les facteurs négatifs à leur valeur basse (ou inversement pour l'état bas). A chaque étape, les groupes non influents sont éliminés, les groupes influents sont divisés aléatoirement en deux nouveaux groupes, jusqu'à l'obtention de groupes de taille 1, correspondant aux variables influentes.	<i>Avantages</i> : Simple, efficace et facile à mettre en oeuvre <i>Limites</i> : Connaissance nécessaire des signes des paramètres.

TAB. 8.2 – Méthodes de *screening*, dont le but est d'identifier les paramètres réellement influents parmi les k paramètres d'entrée. Les algorithmes détaillés sont disponibles dans [378].

Chapitre 9

Paramètres cellulaires influencés par la réplication des Prions

1 Introduction

Les modèles mathématiques de réplication des Prions développés à ce jour reposent pour la plupart sur l'hypothèse d'un mécanisme homogène, se produisant dans un contexte acellulaire. Ils sont utilisés pour reproduire des données expérimentales obtenues *in vivo* ou à partir de cultures cellulaires, comme par exemple l'étude de la durée d'incubation [297], le profil d'accumulation de la PrP [305] ou encore l'estimation des paramètres cinétiques de réplication [299].

Pourtant, en culture cellulaire, la réplication des Prions est étroitement liée au métabolisme cellulaire, non pris en compte dans les modèles théoriques. En particulier, la vitesse de prolifération cellulaire est connue pour influencer le niveau d'accumulation de la PrP^{res}. Elle semble agir en compétition avec la réplication, comme un facteur diluant l'infection à chaque division [408].

De plus, les Prions ne se répliquent pas uniquement dans un système fermé (*i.e.* une seule cellule), mais peuvent se propager d'une cellule à l'autre. Plusieurs modes de dissémination des Prions ont été mis en évidence dans les cultures cellulaires. Des lignées comme les MovS6 semblent propager l'infection préférentiellement par contact entre les cellules [158], via une interaction directe entre la PrP^c et la PrP^{res} membranaires ou via la formation de nanotubes entre les cellules, permettant la diffusion des agrégats de PrP^{res} cytoplasmique [166]. De plus, la présence dans le milieu de culture de certaines lignées d'infectiosité, associée ou non à des exosomes, suggère qu'il est possible de transmettre l'infection à des cellules plus éloignées [409]. L'effet qualitatif et quantitatif de cette propagation intercellulaire des Prions sur la réplication intracellulaire reste une question ouverte.

Enfin, il existe une hétérogénéité de réplication au sein d'une même lignée cellulaire infectée [410]. Cette hétérogénéité pourrait traduire des différences de susceptibilité cellulaire à l'infection par des Prions, observées de façon non stable au cours du temps dans la lignée N2a [198] et supposées être la conséquence d'une régulation fine de facteurs cellulaires non identifiés [199]. Toutefois, les approches actuelles utilisées pour identifier ces facteurs de susceptibilité ou de résistance demeurent infructueuses. En outre, cette hétérogénéité est aussi retrouvée de façon qualitative sur les profils d'agrégation de la PrP^{res} pouvant dépendre des

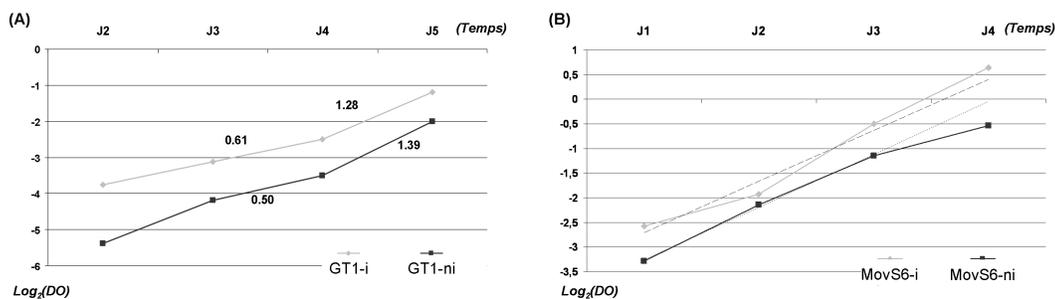


FIG. 9.1 – Évaluation de la croissance des MovS6 et des GT1 en fonction du caractère infecté ou non. (A) Croissance des GT1. Les courbes continues représentent le logarithme en base 2 de la densité optique. Les cellules ont été ensemencées à 2000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Les résultats présentés sont une moyenne sur 12 échantillons. Les nombres sur le graphe correspondent aux valeurs des pentes entre J3 et J4 et J4 et J5. (B) Croissance des MovS6. Les courbes continues représentent le logarithme en base 2 de la densité optique. Les cellules ont été ensemencées à 2000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Les résultats présentés sont une moyenne sur 12 échantillons. Les courbes en pointillés représentent les courbes de régression entre J1 et J3 (avant le ralentissement de croissance des MovS6-ni), avec des coefficients de corrélation respectivement de 0,98 et 0,99 et des pentes de 1,13 et de 1,09 respectivement pour les MovS6-i et les MovS6-ni.

cellules [354, 410].

Ainsi, trois mécanismes semblent particulièrement importants à prendre en compte pour l'étude des mécanismes de réplication des Prions *in vivo* ou *ex vivo*, à savoir le métabolisme cellulaire, la propagation intercellulaire des Prions, et la prise en compte de l'hétérogénéité individuelles des cellules vis-à-vis de la réplication intracellulaire des Prions. En vue d'établir un modèle théorique permettant l'étude de la réplication des Prions dans un contexte multicellulaire, l'objectif de ce chapitre est de présenter les travaux expérimentaux permettant de préciser l'effet de ces trois mécanismes (*i.e.* effet de la prolifération sur l'infection, mode de dissémination des Prions et hétérogénéité cellulaire) sur la réplication des Prions dans des lignées cellulaires au laboratoire.

Pour cette étude, nous avons utilisé trois modèles cellulaires chroniquement infectables par des Prions : les cellules MovS6 (issues de ganglions rachidiens dorsaux de souris transgéniques surexprimant la PrP ovine) infectables par la souche de Tremblante PG127; les cellules GT1 (cellules neuronales d'hypothalamus de souris) infectables par les souches de Tremblante adaptées à la souris Chandler et 22L; et les cellules SN56 (neurones cholinergiques issus de septum murin, fusionnés à un neuroblastome murin) également infectables par les souches Chandler et 22L (nous appellerons par la suite MovS6-i, GT1-i, SN56-i les lignées ayant été exposées à un échantillon infectieux, et MovS6-ni, GT1-ni, SN56-ni les lignées ayant été exposées à des cerveaux sains). Les matériels et méthodes utilisés au cours de l'étude sont donnés en annexes page 213.

2 Résultats expérimentaux

2.1 Etude comparative fonctionnelle des lignées cellulaires

2.1.1 Effet de l'infection sur la croissance cellulaire

Effet de l'infection sur la vitesse de prolifération cellulaire. Dans un premier temps, un test de viabilité cellulaire a été réalisé, afin de mesurer la vitesse de prolifération des cellules. La densité optique (DO) lue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes (*i.e.* présentant une activité enzymatique mitochondriale détectable), elle a donc la forme suivante :

$$DO(t) = k \cdot n(t) = k \cdot n_0 \cdot 2^{at},$$

avec $n(t)$ le nombre de cellules en fonction du temps, n_0 le nombre de cellulesensemencées et $1/a$ le temps de doublement de la population. a est estimé à partir des données expérimentales en prenant le logarithme en base 2 de la DO : $\text{Log}_2(DO) = \text{Log}_2(kn_0) + at$. Cette méthode permet en particulier de s'affranchir de différences artéfactuelles liées à d'éventuelles différences d'ensemencement.

Les MovS6-i et les MovS6-ni ont la même croissance entre J1 et J3, et a est constant au cours du temps ($a = 1.1 \text{ jour}^{-1}$ environ). La croissance des GT1 présente un profil sensiblement différent des cellules MovS6 : elle s'accélère au cours du temps, même si le caractère infecté n'entraîne pas de différence significative de prolifération (Figure 9.1). Par ailleurs, une étude du cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux pour évaluer d'éventuelles altérations de la prolifération cellulaire, non détectables par la vitesse de division. Après 48h de culture, l'étude du cycle cellulaire ne montre aucune différence significative des proportions des cellules de chaque phase du cycle cellulaire (quiescence, duplication de l'ADN, mitose), selon le caractère infecté ou non des cellules MovS6 et GT1.

Effet de l'infection sur la mortalité cellulaire. L'analyse de la mortalité par cytométrie en flux (marquage à l'Iodure de Propidium), après 48h de culture, montre que la présence de Prions dans les cellules MovS6 n'entraîne pas une augmentation significative de la mort cellulaire par rapport aux cellules non infectées (10% de cellules mortes dans les 2 cas). En revanche, concernant les cellules GT1, les résultats de la figure 9.2 montre une diminution de la mortalité dans la population infectée (35% de mortalité pour les GT1-ni contre 10% pour les GT1-i). La confluence n'influe pas sur la mortalité, ni pour les Mov ni pour les GT1. La significativité des différences a été évaluée à l'aide d'un test de Student (avec un seuil de 1%)

2.1.2 Effet de la croissance cellulaire sur l'infection

Nous avons cherché à évaluer l'effet de la croissance cellulaire (prolifération et mortalité) sur l'évolution de l'infection des cellules. Afin d'évaluer l'effet de la confluence cellulaire sur l'accumulation de PrP^{res}, une analyse par dosage immunométrique (ELISA) a été réalisée sur les cellules MovS6-i. Après passage cellulaire au jour 0, une diminution brutale de la quantité de PrP^{res} (en dessous du seuil de détection) est observée pour les deux confluentes. Au bout de 4 jours de culture, une quantité de PrP^{res} est à nouveau significativement détectable. L'augmentation de PrP^{res} après 4 jours dépend de la confluence cellulaire. En effet, à faible confluence, l'augmentation de PrP^{res} est significativement plus faible (environ 50% de la quantité à forte confluence) (Figure 9.3, A).

Pour évaluer l'effet de la mortalité cellulaire, des cellules ont été cultivées pendant 48h en présence de cellules mortes de la même lignée, infectées ou non. La quantité de PrP^{res} est

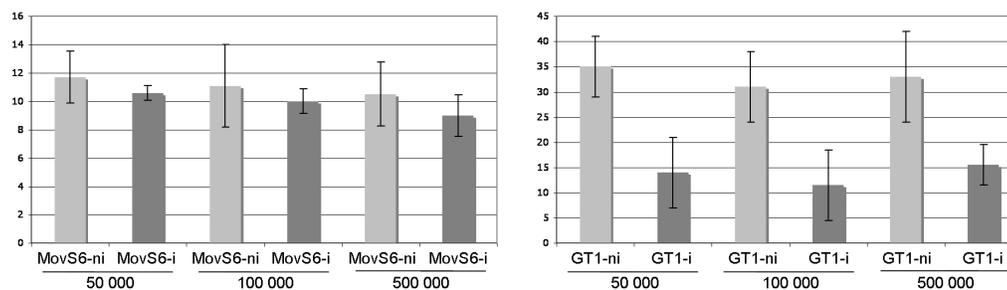


FIG. 9.2 – **Etude de la mortalité des MovS6 et des GT1 en fonction du caractère infecté ou non de la lignée et de la confluence.** Les cellules ont étéensemencées à trois confluences (50 000, 100 000 ou 500 000 cellules par puits) en plaques 12 puits et cultivées pendant 48h. L'analyse par FACS donne le pourcentage de cellules mortes (marquées par l'iodure de Propidium) et celui de cellules vivantes. Les résultats correspondent à une moyenne de 4 échantillons, correspondant chacun à une acquisition de 10 000 événements.

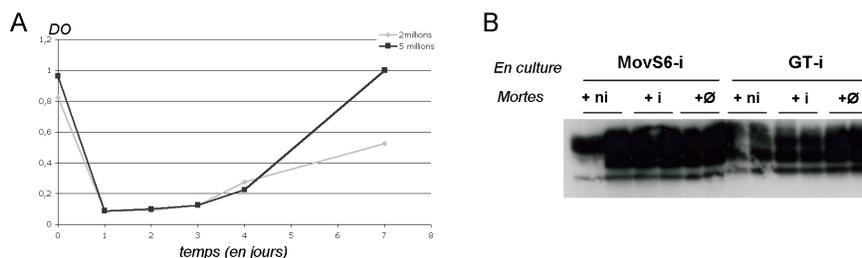


FIG. 9.3 – **Effet de la prolifération cellulaire sur l'infection.** (A) Evolution de la quantité de PrP^{res} (évaluée par ELISA) au cours du temps en fonction de la confluence cellulaire d'une culture de MovS6. Les cellules ont étéensemencées à deux confluences et prélevées à plusieurs temps de culture. Chaque point a été normalisé avant analyse sur une quantité identique de cellules. (B) Effet de la mortalité cellulaire sur la quantité de PrP^{res}. Des cellules MovS6-i et GT1-i ont été cultivées pendant 5 jours en présence de cellules mortes infectées (+i) ou non infectées (+ni), ou en conditions normales (+∅). Chaque puits correspond à 300 μg de protéines déposées.

comparable avec à celle des cellules cultivées en conditions normales. La mortalité ne semble donc pas influencer sur le niveau d'infection des cellules en culture.

2.1.3 Etude de l'expression de la PrP

L'analyse comparative des différents modèles cellulaires s'est poursuivie par l'étude de l'expression de la PrP. Trois critères ont été évalués : la quantité de PrP membranaire à la surface des cellules pour identifier une perturbation potentielle du trafic cellulaire de la PrP, l'expression du gène de la PrP pour identifier une éventuelle altération de la régulation du gène *Prnp* et l'accumulation de PrP^{res} dans les lignées cellulaires infectées.

Etude de l'expression membranaire de la PrP. Une analyse quantitative immunocytochimique par cytométrie en flux a été effectuée sur les différentes lignées cellulaires, pour étudier les variations d'expression membranaire de la protéine PrP. Pour les MovS6, la présence d'un second pic de fluorescence de plus faible intensité est observée dans la population infectée, entraînant une diminution globale de la fluorescence (Figure 9.4). L'observation de

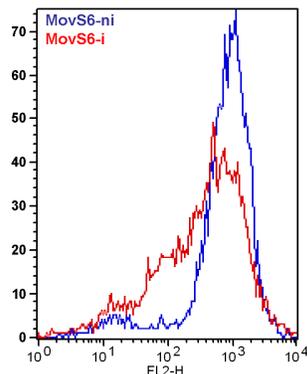


FIG. 9.4 – Etude de l'expression de la PrP^c à la surface externe de la membrane plasmique, par cytométrie en flux. La spécificité du marquage par l'anticorps primaire 6H4 est confirmée par rapport à un marquage contrôlé réalisé à l'aide d'une immunoglobuline isotopique IgG1. L'acquisition a été réalisée sur 10 000 évènements pour chaque échantillon.

deux pics de fluorescence différents dans les MovS6-i indique la présence de deux populations cellulaires ne réagissant pas de façon identique à l'anticorps anti-PrP 6H4. La population de faible fluorescence est estimée à environ 40% de la population totale de MovS6-i. En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les autres lignées cellulaires (SN56 et GT1).

Etude de l'expression du gène de la Prnp. L'expression du gène codant pour PrP a été évaluée au cours du temps, et en fonction de la confluence des cellules, par amplification génique en temps réel. Quelque soit la lignée cellulaire, aucune différence significative de la quantité d'ARN messager codant pour la PrP n'a été détectée.

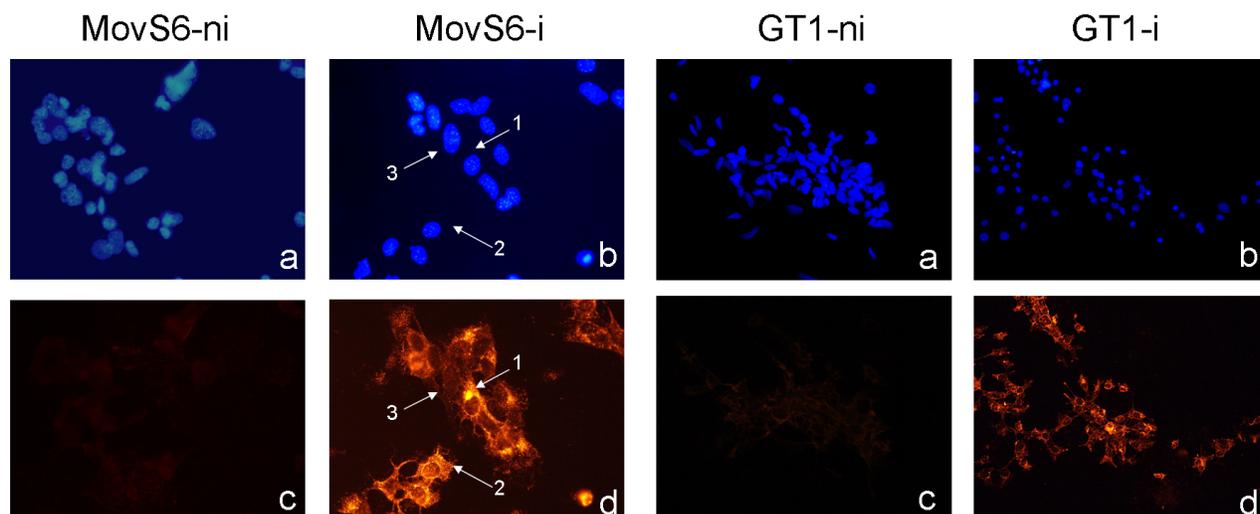


FIG. 9.5 – Détection immunocytochimique de la PrP^{res}. Marquage de la PrP sur les cellules MovS6 et GT1 infectées (d) ou non (c). Le signal PrP est objectivé par un couplage Alexa 568, les noyaux cellulaires sont révélés par une contre-coloration Dapi (a et b). La spécificité des marquage a été validée à l'aide d'un contrôle correspondant à une immunoglobuline irrévante de même isotype. Les flèches correspondent à une cellule MovS6-i présentant peu de marquage PrP^{res}. Acquisition x400 (MovS6) ou x200 (GT1), épifluorescence.

Localisation de la PrP^{res} . Après de multiples mises au point combinant différents traitements préalables à la réalisation d'un marquage immunofluorescent, il a été mis en évidence une différence d'intensité de marquage fluorescent entre les cellules MovS-ni et Mov-i ou GT1-ni et GT1-i (Figure 9.5). En effet, il a été possible d'observer dans la population de cellules infectées (MovS6-i ou GT1-i) différents marquages non présents dans la population non infectées. D'une part, un marquage granuleux très intense, réparti dans tout le cytoplasme des cellules (Flèche 2, Figure 9.5) semble compatible avec une localisation de la PrP^{res} dans le système endosome/lysosome [51]. En outre, un marquage ponctiforme périnucléaire, semblable aux agrésomes identifiés lors de l'infection par des Prions ou dans d'autres amyloïdoses [354], est observé dans certaines cellules (Flèche 1, Figure 9.5) de la lignée non infectée. Ces deux types de marquages ont déjà été observés dans des lignées cellulaires différentes [354], et sont observées ici au sein d'une même lignée. Ils suggèrent une hétérogénéité cellulaire de mécanismes d'agrégation de la PrP^{res} , très différents d'une cellule à l'autre. Enfin, l'observation de cellules peu, voire pas du tout marquées (Flèche 3, Figure 9.5) confirme que toutes les cellules de la lignée exposée à un échantillon infectieux ne sont pas infectées par les Prions.

2.2 Tri des différentes populations cellulaires.

L'analyse de la PrP membranaire a révélé la présence de différentes populations cellulaires dans les cellules MovS6 infectées par la souche PG127. Dans un premier temps, une approche de tri magnétique, basée sur l'intensité de marquage PrP à la surface de ces cellules a été mise au point afin de préciser la nature des différentes populations. Une analyse par cytométrie en flux des cellules après séparations successives sur deux colonnes montre que deux populations ont bien été isolées : la fraction F^- , qui montre un marquage de la PrP surfacique plus faible que la population totale et la fraction F^+ , qui montre un marquage de la PrP^c à la surface plus fort que la population totale (PT). Une analyse par Western Blot des différentes fractions isolées montre que la fraction F^- est celle qui contient le plus de PrP^{res} alors que la fraction F^+ est celle qui en contient le moins. Ces différences se maintiennent pendant environ 15 passages après tri (Figure 9.6, haut). Elles ne semblent pas liées à des différences de croissance (un comptage cellulaire des différentes fractions, réalisé à chaque passage, et une analyse du cycle cellulaire des différentes fractions, réalisée 3 passages après tri, ne montrent aucune différence significative de prolifération). Une analyse de l'expression du gène de la PrP par PCR en temps réel au 4^{ème} passage après tri, ne révèle pas de différence significative de l'expression du gène.

Par la suite, l'approche du tri cellulaire a été optimisée grâce à l'utilisation du trieur cellulaire Influx de la Fondation Alliance Biosecure, qui permet une séparation des différentes fractions plus efficace et plus rapide, avec moins de mortalité cellulaire que l'approche initiale par tri magnétique. Des tris réalisés à différents passages cellulaires après infection révèlent que les modifications d'expression membranaire de la PrP sont plus importantes dans les premiers passages qui suivent l'infection. L'imagerie cellulaire conventionnelle ou par microscope confocal révèle la présence de dépôts de PrP^{res} (sous forme d'agréomes et d'agréats épars) dans les cellules de la fraction la plus infectée. Ces résultats confirment la présence dans les cultures cellulaires de cellules différentiellement infectées (Figure 9.6, bas).

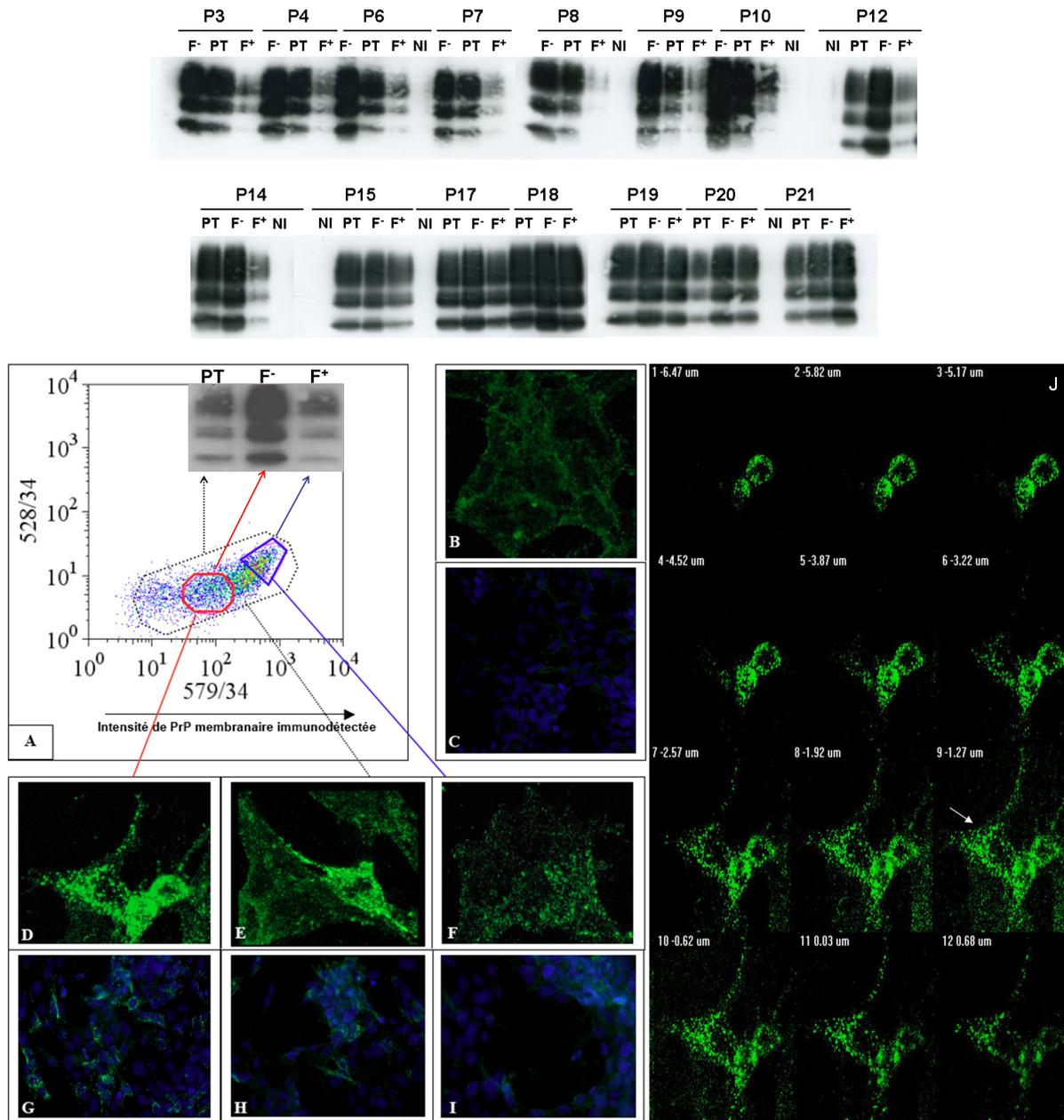


FIG. 9.6 – Tri des différentes populations cellulaires. (haut) Evolution de la quantité de PrP^{res} au cours des passages après tri magnétique. PT = population totale, F⁺ = fraction la plus marquée (en PrP^c surfacique), F⁻ = fraction la moins marquée (en PrP^c surfacique), NI = population non infectée. Chaque puits correspond à 300µg de protéines. (bas) Imagerie cellulaire des différentes population de MovS6-i séparées par trieur cellulaire. (A) Quantification par FACS des modifications d’immunoréactivité de la PrP membranaire des différentes populations et détection par WesternBlot de la quantité de PrP^{res} de chaque population. (B,C) Détection immunocytochimique de la PrP^{res} dans les MovS6 non infectées. (D,E,F,G,H,I) Détection immunocytochimique de la PrP^{res} dans les MovS6 infectées : (D,G)= fraction triée de gauche, (E,H)= population complète, (F,I)= fraction triée de droite. (J) Détection immunocytochimique de la PrP^{res} dans les MovS6-i infectées purifiées par tri cellulaire (fraction triée de gauche). Flèche : dépôts ponctiformes de PrP^{res} vert : anticorps anti-PrP 12F10 + anticorps secondaire chèvre anti-souris Alexa 488 ; bleu : contre-coloration Dapi des noyaux cellulaires ; Imagerie confocale 3D x60 (B, D, E, F), par sections sériées (0,65µm) (J) ; Microscopie conventionnelle x20 (C, G, H, I).

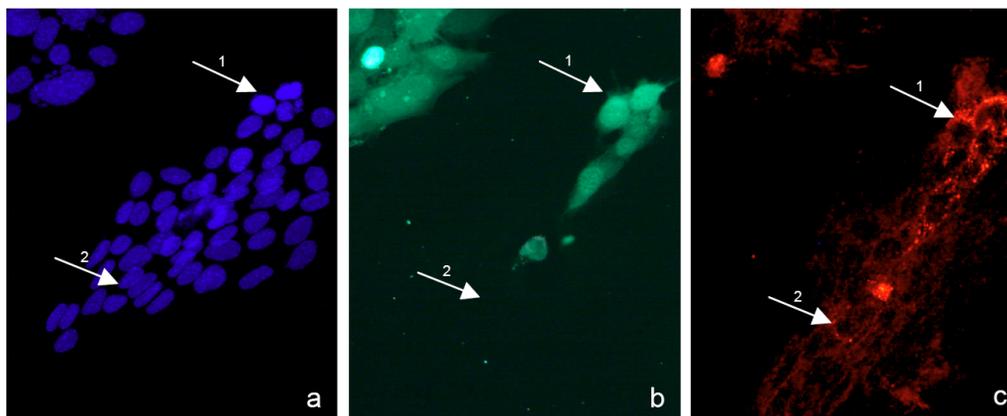


FIG. 9.7 – Etude de la dissémination des Prions par co-culture de cellules infectées et non infectées, par immunocytochimie : marquage PrP dans un mélange de cellules MovS6 infectées (repérées par un traceur fluorescent vert, b) et de cellules MovS6 non infectées. Les noyaux cellulaires sont révélés par une contre-coloration Dapi (a). Le signal spécifique de la PrP^{res} est objectivé par un couplage Alexa 568 (c). (Acquisition x400, épifluorescence). Flèche 1 : cellules MovS6-i présentant un immunomarquage périnucléaire et possédant le traceur fluorescent vert. Flèche 2 : cellules MovS6-ni présentant un immunomarquage périnucléaire et ne possédant pas le traceur fluorescent vert.

2.3 Etude de la propagation intercellulaire des Prions

La propagation des Prions au sein d'une population cellulaire peut s'effectuer soit par contact direct entre les cellules, soit par relargage des Prions dans le milieu de culture [158]. Afin d'évaluer ces deux modes de propagation, des cellules MovS6-ni et GT1-ni non infectées ont été cultivées pendant plusieurs passages dans du milieu de culture conditionné respectivement par des MovS6-i et GT1-i. Toutefois, après 3 passages, aucune répllication *de novo* de PrP^{res} n'a été détectée en Western Blot, montrant que la propagation par le milieu est indétectable, sinon inexistante pour nos modèles cellulaires.

En revanche, une analyse immunocytochimique d'une coculture de MovS6-i et MovS6-ni suggère que la propagation des Prions est possible par contact cellulaire direct. Un traceur fluorescent vert a été utilisé afin de différencier la population cellulaire "ni" de la population cellulaire "i". Après 5 jours de co-culture, un marquage de type PrP^{res} (périnucléaire et granuleux, figure 9.7, c, flèche 1) a été observé sur des cellules ne présentant pas de fluorescence verte (figure 9.7, b, flèche 2), appartenant donc à la population de MovS6-ni. Ces marquages se situent sur des cellules à proximité de cellules infectées.

2.4 Etude de la susceptibilité cellulaire à l'infection

2.4.1 Quantification du nombre de cellules infectées en fonction de la souche de Prions

La lignée cellulaire SN56 est capable de répliquer différentes souches de Tremblante adaptées à la souris, mais conduit à des niveaux d'accumulation de PrP^{res} différents selon la souche. En effet, la quantité de PrP^{res} détectée en Western Blot est plus faible en cas d'infection par la souche Chandler que par la souche 22L, malgré des doses infectieuses des homogénats utilisés pour l'infection comparables (mesurées en Western Blot par le biais de la quantité de PrP^{res}

dans l'homogénat). Nous avons cherché à évaluer si les différences observées sont dues à un nombre différent de cellules infectées (mais à un niveau d'infection identique) ou à un niveau différent d'infection des cellules infectées (à quantité de cellules infectées égale). Pour cela, une dilution limite a été effectuée sur deux populations cellulaires chroniquement infectées, les SC (cellules SN56 infectées par la souche de Prions Chandler) et les S22L (cellules SN56 infectées par la souche de Prions 22L) pour estimer le nombre de cellules infectées dans la lignée cellulaire exposée à l'infection. Les clones isolés ont été mis en culture puis analysés en Western Blot. Nous observons que selon la souche considérée, la proportion de clones infectés diffère : 19% des cellules SN56 accumulent de la PrP^{res} après infection par la souche 22L (35 clones infectés sur 182 testés) contre seulement 11% après infection par la souche Chandler (9 clones infectés sur 74 testés). En outre, au sein d'une même lignée, les cellules semblent répliquer les Prions à des niveaux différents.

Ces résultats confirment sur une seconde lignée cellulaire l'hétérogénéité des cellules vis-à-vis de la réplication des Prions, observée précédemment pour les cellules MovS6. Cette hétérogénéité de réplication semble s'accompagner, au moins à un instant donné, d'une hétérogénéité de susceptibilité cellulaire.

2.4.2 Stabilisation de l'hétérogénéité de susceptibilité par fusions cellulaires

L'étude directe de la susceptibilité des clones SN56 non infectés isolés par dilution limite est peu envisageable, en raison du caractère transitoire de cette susceptibilité démontré sur les N2a [199]. Nous avons donc tenté une approche entraînant des modifications drastiques du métabolisme des cellules. En effet, nous avons réalisé des fusions cellulaires, connues pour induire la reprogrammation de la cellule, et pouvant conduire à des aberrations chromosomiques (perte, gain ou modification de l'ADN) ou à des modifications permanentes d'expression de gènes [411].

Nous avons réalisé des fusions cellulaires entre des SN56, sélectionnées par double sélection antibiotique. Un caryotype a été réalisé. Le nombre de chromosomes est nettement supérieur dans les cellules fusionnées par rapport aux cellules d'origine, ce qui confirme l'efficacité de la double sélection antibiotique. Après une analyse de l'expression membranaire de la PrP par cytométrie en flux (pour éliminer les fusions sous-exprimant la PrP^c), des fusions ont été inoculées par des Prions de Tremblante adaptée à la souris 22L et Chandler (Figure 2.4.2). Une analyse préalable a montré que ni le gène de résistance, ni la présence d'antibiotique dans le milieu de culture n'empêchent l'infection des cellules. Six fusions présentant des niveaux intermédiaires de PrP^c ont été analysées plus en détail. Les Western Blots des infections des fusions testées montrent des différences d'infection entre les clones. Ces différences sont très stables au cours des passages : la fusion 1.2 apparaît très peu sensible à l'infection, quelle que soit la souche de Prions à laquelle elle a été exposée. De la même manière, la fusion 4.2 est très peu sensible à l'infection par la souche Chandler. Au contraire, d'autres fusions semblent s'infecter à des niveaux très élevés (clones 2.6 et 3.6). Aucune variation significative de l'expression du gène de la PrP dans les différentes fusions testées n'est détectée, il semble donc que les différences d'accumulation de la PrP^{res} observées ne soient pas la conséquence de variations d'expression du précurseur. En revanche, l'observation du nombre relatif de cellules des différentes fusions après deux jours de culture (par un test de viabilité) montre des différences de prolifération entre les

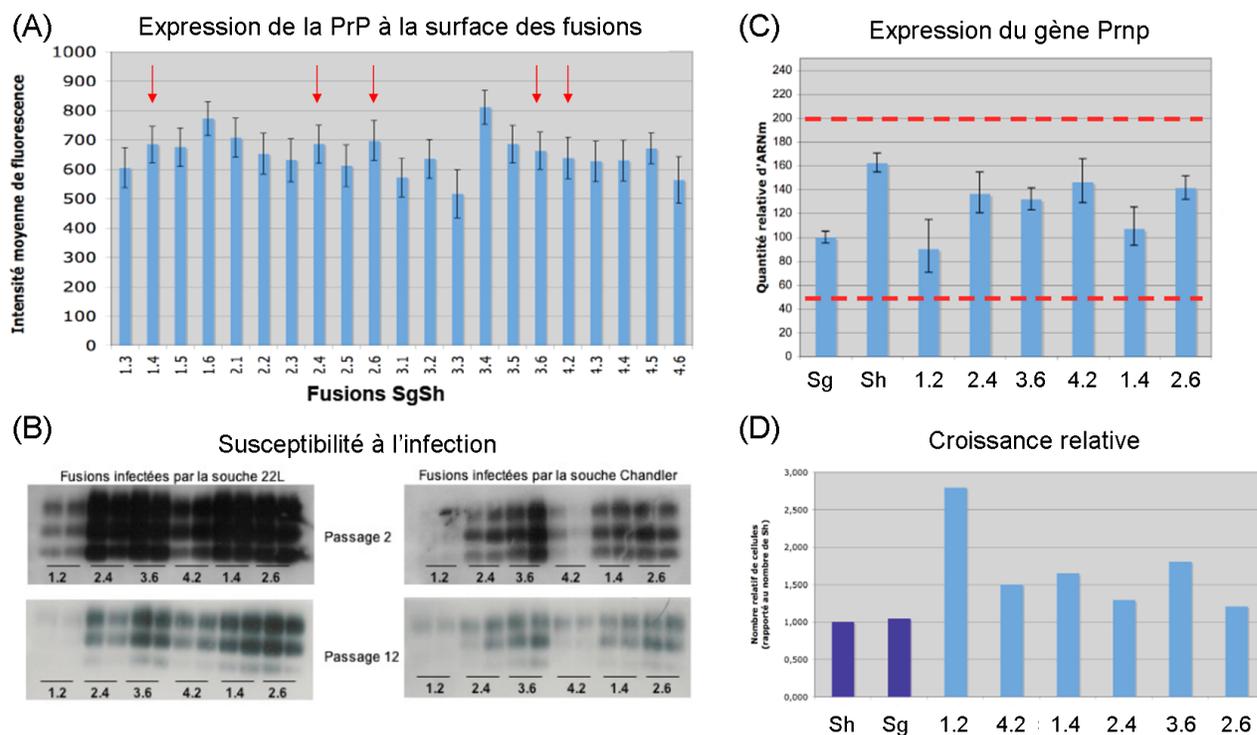


FIG. 9.8 – **Fusions cellulaires de SN56.** Des cellules SN56 résistantes à la généticine (Sg) ou à l'hygromycine (Sh) ont été fusionnées et sélectionnées par double sélection antibiotiques. Après sélection, les cellules (infectées ou non) sont cultivées en absence de pression de sélection. (A) Evaluation par cytométrie en flux de la quantité de PrP la membrane des cellules. L'histogramme correspond à la moyenne de fluorescence calculée sur 10000 évènements. (B) Expression du gène Prnp des différentes fusions non infectées, évaluée par amplification génique en temps réel, rapportée à l'expression du gène dans les cellule Sg. Les pointillés rouges délimite la zone de modification d'expression non significatives. (C) Détection par Western Blot de la quantité de PrP^{res} accumulées dans les différentes fusions, après exposition à un homogénat de cerveau de souris infectées par les souches Chandler ou 22L. Chaque puits correspond à 300 μ g de protéines. (D) Evaluation de la vitesse de croissance des clones non infectées, par WST1. La densité optique est rapportée à celle des cellules Sh.

fusions. La fusion 1.2, qui est la moins infectée, est celle qui prolifère le plus rapidement. Au contraire, la fusion la plus infectée (3.6) est celle qui prolifère le moins vite.

3 Discussion

L'enjeu de notre étude expérimentale est de définir l'influence de l'infection par des Prions sur les comportements cellulaires, en vue d'établir un modèle de la dynamique de réplication des Prions dans une population cellulaire.

Infection et croissance. Nous avons effectué une recherche d'altérations fonctionnelles des cellules infectées. Les différentes approches expérimentales utilisées ne rapportent aucune modification significative de la croissance cellulaire et des différentes phases du cycle cellulaire dans les cellules infectées. En revanche, des différences de viabilité dans le sens d'une augmentation ont été retrouvées uniquement pour les GT1 infectées. Elles sont vraisemblablement dues à une dérive cellulaire des deux lignées (infectée et non infectée). En effet, d'autres expériences similaires réalisées post-infection ne montrent aucune différence significative de mortalité en cas

d'infection. En outre, ces résultats s'opposent à une observation non confirmée précédemment publiée, rapportant des phénomènes d'apoptose dans la lignée cellulaire GT1 infectée [354]. Par conséquent, concernant la morphologie, la croissance, les différentes phases du cycle cellulaire ou la viabilité pour les cellules MovS6, aucune modification liée à la présence des Prions n'a été observée en culture cellulaire. Ainsi, même si des modifications du métabolisme cellulaire ont récemment été rapportées [177], l'infection cellulaire par des Prions ne semble pas avoir d'influence détectable sur la prolifération, la division ou la mortalité de nos modèles cellulaires en division continue.

En revanche, le passage des cellules conduit à une diminution brutale de la quantité de PrP^{res}, qui retourne ensuite progressivement à son niveau initial d'autant plus rapidement que la vitesse moyenne de prolifération des cellules diminue. Cette diminution peut être due (i) à un artefact lié à la manipulation des cellules (par exemple, perte de la PrP^{res} membranaire ou extracellulaire lors du décollement des cellules par la trypsine), (ii) à la production pendant les étapes d'adhérence des cellules d'un facteur défavorable à l'infection ou (iii) à la dilution de l'infection par la prolifération plus active des cellules, non compensée par la production. Les résultats de fusions cellulaires viennent appuyer la troisième hypothèse. En effet, bien que des clones soient capables d'accumuler les Prions à des niveaux différents sans corrélation avec la vitesse de prolifération, le clone répliquant les Prions le plus faiblement est celui qui prolifère le plus vite. De même, des résultats récents suggèrent que le niveau d'infection d'une cellule est un compromis entre sa capacité à multiplier les Prions et à les diluer par division cellulaire [408]. Dans ce contexte, l'étude de la dynamique de la répartition spatiale des cellules en culture est critique : elle peut introduire une hétérogénéité de vitesse de prolifération (par inhibition de contact, notamment) qui pourrait influencer le niveau de réplication et conduire soit à la disparition de l'infection (en cas de division trop importante), soit au contraire à une accumulation plus importante (en cas de prolifération moins rapide).

Infection et métabolisme de la PrP^c. Une diminution de la quantité de PrP membranaire est observée à la surface des cellules infectées. Les anticorps dont nous disposons pour cette étude ne sont pas capables de distinguer la forme native de la PrP de la PrP^{res}, toutefois, il semble vraisemblable que cette diminution corresponde majoritairement à une diminution de la PrP^c. Ces résultats vont dans le sens de la baisse d'expression membranaire de la PrP observée *in vivo* dans des cerveaux de souris infectées par une ESST [193]. Elle pourrait être due à une réaction cellulaire à l'infection, visant à diminuer la synthèse du précurseur (observée dans des cellules neuroendocriniennes [192]). Toutefois, dans nos modèles, aucune diminution de la synthèse du gène *Prnp* n'a été détectée. De plus, les cellules présentant une diminution d'expression membranaire de PrP restent stablement infectées au cours du temps, contrairement aux cellules neuroendocriniennes [192], ce qui suggère l'absence de réaction cellulaire à l'infection. En revanche, il reste maintenant à déterminer si la modification d'expression membranaire de la PrP est due à une modification du trafic de la PrP^c sous l'effet de l'infection (favorisant les formes cytosoliques par exemple) ou uniquement à la consommation de la PrP^c par la PrP^{res}, non compensée par la synthèse de PrP^c (mécanisme prédit par les modèles théoriques de polymérisation nucléée [343]).

Hétérogénéité de réplication et susceptibilité cellulaire. La réplication *in vivo* des Prions s'effectue dans un environnement très hétérogène. En effet, les régions du cerveau im-

pliées dans la réplication varient fortement en fonction de la souche de Prions [118]. De même, dans des conditions classiques d'infection, seuls les neurones, les astrocytes et les cellules folliculaires dendritiques (CFD) sont connus pour être infectés *in vivo*, la capacité des CFD à répliquer les Prions dépendant en plus de leur niveau de maturation [234]. En outre, dans notre expérience, une quantification directe par dilution limite montre que seules 10 à 20% des cellules SN56 sont réellement infectées (*i.e.* sont capable d'accumuler de la PrP^{res} à un niveau détectable en Western Blot) après exposition à des échantillons infectés par les souches de Tremblante adaptées à la souris Chandler et 22L. Nos estimations sont nettement inférieures aux estimations de Baron et al [409], qui estiment par Cell Blot la proportion de SN56 infectées à plus de 80%. Cette divergence peut s'expliquer soit par une perte des cellules faiblement répliquantes au moment de la dilution limite, soit par la capacité du Cell Blot à détecter non seulement des cellules répliquantes, mais aussi des cellules capables de capter et/ou d'accumuler de la PrP^{res} exogène provenant de cellules adjacentes sans réplication *de novo*.

Dans ce contexte hétérogène, la susceptibilité cellulaire peut être considérée comme une compétition entre plusieurs comportements cellulaires intrinsèques de la cellule ou dépendant de son environnement local, à savoir :

- (1) la capacité des cellules à s'infecter au moment de la mise en contact avec l'homogénat ou avec des Prions exogènes.
- (2) la capacité intrinsèque des cellules à répliquer les Prions (*i.e.* la machinerie intracellulaire de réplication), à des niveaux compensant la dissémination vers les cellules voisines et la dilution par division cellulaire.

4 Conclusions : orientation de la modélisation

Les expériences réalisées au cours de cette étude nous ont permis d'identifier les mécanismes qui différencient les modèles cellulaires des modèles *in vitro* de conversion acellulaire des Prions ou des modèles animaux *in vivo*. Ces comportements qualitatifs sont récapitulés dans le tableau 9.1, les valeurs cinétiques des paramètres relatifs à ces comportements sont disponibles dans le tableau 9.2 (elles sont issues de notre étude expérimentale et de la bibliographie).

Au vu de la grande hétérogénéité de réplication des Prions en fonction des cellules, au sein d'une même lignée cellulaire, la dynamique multicellulaire de la réplication des Prions semble difficile à étudier en extrapolant les comportements à partir des modèles théoriques acellulaires existants. Ainsi, la suite de notre travail consiste à coupler les modèles théoriques de réplication à un modèle multicellulaire de type automate cellulaire, plus apte à prendre en compte l'hétérogénéité de réplication et les interactions spatiales locales qu'un modèle de dynamique cellulaire par équations différentielles.

	Modèles cellulaires	Modèles <i>in vivo</i>
Réplication des Prions		
<i>Profil d'accumulation de la PrP^{res}</i>	Diminution au moment du passage, puis augmentation exponentielle jusqu'au niveau initial, stable au cours des passages	Accumulation exponentielle dans le cerveau, profil sigmoïdal dans la rate
<i>Effet sur le métabolisme cellulaire</i>	Pas d'effets apparents dans nos modèles	Neurotoxicité
Autres mécanismes liés à la cellule		
<i>Prolifération cellulaire</i>	Importante	Faible voire inexistante
<i>Propagation intercellulaire des Prions</i>	Faible et préférentiellement vers les cellules adjacentes dans nos modèles.	Importante. Mécanisme inconnu.
<i>Réaction cellulaire à l'infection</i>	Pas d'effets apparents dans nos modèles Diminution de la synthèse du précurseur, Diminution de la vitesse de prolifération, Induction de la dédifférenciation ?	Modification d'expression de gènes. Influence indéterminée.
Hétérogénéité spatiale		
<i>Nature de l'hétérogénéité</i>	1 seul type cellulaire Capacité intrinsèque des cellules à répliquer les Prions ? Vitesse de prolifération cellulaire ? Capacité des cellules à accumuler/disséminer les Prions	Plusieurs types cellules Capacité intrinsèque des cellules à répliquer les Prions Niveau de maturation (CFD) Capacité des cellules à accumuler/disséminer les Prions ? (<i>Tropisme de souche</i>)

TAB. 9.1 – Différences entre les différents modèles expérimentaux. Les modèles cellulaires et animaux se différencient des modèles de conversion *in vitro* par un environnement hautement hétérogène et la prise en compte du métabolisme cellulaire.

Paramètre	Valeurs	Méthode d'estimation/Contexte	Réf.
Taux de production de la PrP ^c	4400 molécules/jour	Estimation théorique à partir du modèle de réplication de Masel homogène et de données <i>in vivo</i> .	Masel 1999
Taux de dégradation de la PrP ^c	3-5 /jour	Estimation expérimentale (culture cellulaire)	Prusiner, 1991
Taux de dégradation de la PrP ^{res}	0.03-0.2 /jour	Estimation théorique à partir du modèle de réplication de Masel homogène et de données <i>in vivo</i> .	Masel, 1999
Taux de fragmentation des agrégats	0.0001 /jour	Estimation théorique à partir du modèle de réplication de Masel homogène et de données <i>in vivo</i> .	Masel, 1999
Taux d'élongation des agrégats	0.3 /jour	Estimation théorique à partir du modèle de réplication de Masel homogène et de données <i>in vivo</i> .	Masel, 1999
Taille du noyau de nucléation	2-3 molécules	Estimation théorique à partir du modèle de réplication de Masel homogène et de données <i>in vivo</i> .	Masel, 1999
Taille moyenne des agrégats de PrP ^{res}	10-1000 molécules	Estimations expérimentales et théoriques	Masel, 1999
Taux d'augmentation exponentielle de la PrP ^{res}	0.07-0.17 /jour	Estimation expérimentale (<i>in vivo</i>)	Masel, 1999
Concentration finale de PrP ^{res} dans un cerveau	100 µg/g de cerv.	Estimation expérimentale <i>in vivo</i> dans un cerveau de hamster en phase terminale	Beekes, 1996
Vitesse de progression de l'infection dans un nerf	0.7-2 mm/ jour	Estimation expérimentale	Glatzel, 2000
Coefficient de diffusion	0.05mm ² /jour	Estimation théorique	Matthaus 2005
quantité surfacique de PrP infecté : non infecté	environ 2 :3	Estimation expérimentale	-
Proportion de cellules infectées en culture	50% (10% - 80%)	Estimations expérimentales. Dépend de la lignée cell., de la souche et de la méthode d'estimation.	-
Durée d'un cycle cellulaire	1 jour (0.5-3 jours)	Estimations expérimentales. Dépend de la lignée cell.	-
Proportion de cellules mortes	5 - 10%	Estimation expérimentales (sauf pour GT1)	-

TAB. 9.2 – Estimation des valeurs cinétiques des paramètres.

Chapitre 10

Modèle de réplication des Prions dans une population cellulaire en division

Les mécanismes moléculaires de réplication sont étudiés grâce à des modèles théoriques, qui visent pour la plupart à reproduire la dynamique temporelle d'accumulation de la PrP^{res} [305], le temps d'incubation [297] (voir Partie I, Chapitre 4) ou plus récemment la distribution en taille des agrégats [412] (voir Partie II). Ces modèles théoriques de réplication ont notamment permis d'établir des procédures d'estimations des paramètres de réplication [299]. Toutefois, ils sont pour la plupart des modèles cinétiques acellulaires, dont la validité est estimée par comparaison avec des données expérimentales multicellulaires. Or, dans un contexte multicellulaire, l'influence du transport spatial des Prions (*in vivo*) ou de la croissance des cellules (culture cellulaire) sur les mécanismes de réplication des Prions reste mal caractérisée. Dans le cas d'une influence importante, les modèles cinétiques globaux risquent d'être trop imprécis pour permettre une estimation exacte des paramètres cinétiques ou même une inférence qualitative pertinente des mécanismes de réplication. Dans ce contexte, il est nécessaire d'établir un modèle théorique permettant d'étudier le lien qui existe entre les phénomènes collectifs (par exemple, niveau global d'infection dans une population cellulaire) et les phénomènes locaux au niveau de la cellule.

Il existe quelques modèles spatiaux de propagation des Prions, basés sur le couplage des équations de réplication mimant le modèle de l'hétérodimère (*i.e.* $\text{PrPc} + \text{PrPres} \rightarrow \text{PrPc} \bullet \text{PrPres} \rightarrow 2\text{PrPres}$) ou le modèle de polymérisation nucléée avec des équations de réactions-diffusion [274]. Toutefois, si ces modèles sont adaptés à la diffusion des Prions au sein d'un compartiment unidimensionnel simple, ils ne prennent pas en compte l'hétérogénéité d'une population cellulaire, mise en évidence expérimentalement à la partie précédente. Une alternative élégante proposée par Matthäus consiste à utiliser des automates cellulaires (AC) [274]. Toutefois, s'il existe des AC couplés au modèle de l'hétérodimère [276] ou à des modèles de propagation épidémiologiques de type Susceptible-Infected [274], aucun ne prend en compte spécifiquement les équations de polymérisation nucléée de Masel, qui est pourtant le modèle de réplication le plus complet disponible actuellement. De même, bien que la plupart des données expérimentales servant à la validation des modèles soient issues de cultures cellulaires, en perpétuelle division, ces automates n'intègrent pas la prolifération.

Ainsi, dans cette partie, nous présentons un modèle par automate cellulaire de la réplication

et de la propagation des Prions au sein d'une culture cellulaire, basé sur les données expérimentales obtenues au chapitre précédent. En particulier, nous étudions grâce à ce modèle dans quelle mesure la prolifération cellulaire (qui est l'une des différences majeures entre les lignées cellulaire en culture et les cellules répliquantes *in vivo*) influe sur le mécanisme de réplication.

1 Description du modèle

Notre AC a pour but de modéliser la réplication des Prions dans une culture cellulaire hétérogène. D'après les résultats expérimentaux obtenus précédemment, il doit notamment prendre en compte :

(i) la prolifération et la mortalité des cellules en culture, de façon indépendante de leur niveau d'infection ;

(ii) la réplication intracellulaire des Prions, selon le mécanisme de polymérisation nucléée décrit par Masel [299]

(iii) la dissémination intercellulaire des Prions, dont le mode (par le milieu ou par contact entre les cellules adjacentes) et l'intensité dépendent fortement du modèle cellulaire considéré.

(iv) l'hétérogénéité de susceptibilité cellulaire vis-à-vis de l'infection. D'après l'analyse expérimentale et bibliographique menée au chapitre précédent, l'hétérogénéité de susceptibilité cellulaire vis-à-vis de la réplication semble avoir plusieurs origines distinctes : la capacité de la cellule à s'infecter par des Prions exogènes, sa capacité intrinsèque à multiplier *de novo* ces Prions exogènes et sa capacité à accumuler les Prions néosynthétisés ou au contraire, à les propager vers les autres cellules.

La structure générale de l'AC est détaillée ci-dessous. Elle est récapitulée Figure 10.2 page 195. Par ailleurs, la liste des notations introduites est disponible ci-dessous :

c_1	Phénotype cellulaire (caractère répliquant ou non)
D_c	Durée du cycle cellulaire
V	Quantité de PrP ^c
U	Quantité d'agrégats de PrP ^{res}
P	Quantité de molécules de PrP ^{res}
E_a	Capacité cellulaire à accumuler des Prions
E_p	Capacité cellulaire à libérer de l'infection
PM	Quantité de PrP ^{res} dans le milieu de culture
UM	Quantité de molécules de PrP ^{res} dans le milieu de culture
M_{cycle}	Durée moyenne d'un cycle cellulaire
σ_{cycle}	Ecart-type
p_{TV}	Proportion de transmission verticale
p_{mort}	Probabilité de mortalité cellulaire
λ	Taux de production de la PrP ^c
γ	Taux de dégradation de la PrP ^c
μ	Taux de dégradation de la PrP ^{res}
β	Taux de fragmentation de la PrP ^{res}
τ	Taux d'élongation de la PrP ^{res}
n	Taille critique des agrégats

η	Facteur correctif de transmission par le milieu
δ_{diff}	Taux de diffusion des Prions dans le milieu
U_{max}	Quantité limite de PrP ^{res} avant réaction
U_{min}	Quantité minimale de PrP ^{res} nécessaire à la réplication
a	Facteur de diminution de la production de PrP ^c
p_s	Facteur de modification de la permissivité aux Prions
$p_{passage}$	Proportion de cellules conservées pendant un passage
$a_{passage}$	Retard de croissance induit par un passage (Durée de la phase de latence)
p_{occ}	Probabilité qu'une case soit initialement occupée par une cellule
p_{inf}	Probabilité qu'une cellule soit initialement infectée
a_{max}	Durée initiale maximale du cycle cellulaire
$Qm_{c,R}, Qm_{c,NR}$	Quantité moyenne initiale de PrP ^c par cellule répliquante (R) ou non (NR)
$Qet_{c,R}, Qet_{c,NR}$	Ecart-types
$Qm_{res,R}, Qm_{res,NR}$	Quantité moyenne initiale d'agrégats de PrP ^{res} par cellule (R ou NR)
$Qet_{res,R}, Qet_{res,NR}$	Ecart-types
$Tm_{res,R}, Tm_{res,NR}$	Taille moyenne initiale des agrégats de PrP ^{res} par cellule (R ou NR)
$ACcm$ ($ACCet$)	Valeur initiale moyenne du coefficient E_a (et écart-type)
$LIBm$ ($LIBet$)	Valeur initiale moyenne du coefficient E_p (et écart-type)

1.1 Topologie générale de l'automate cellulaire

1.1.1 Géométrie de l'AC et voisinage

Notre AC est un modèle qui évolue de façon discrète dans le temps et dans l'espace (en deux dimensions). L'espace est représenté par un **maillage carré régulier**, permettant une programmation informatique aisée. En effet, l'AC est directement programmé sous forme d'une matrice ($AC_{i,j}$) (avec $AC(i,j)$ la caractéristique j de la i^{eme} cellule). Des alternatives sans maillage, qui prennent en compte les interactions entre les individus via des structures de graphe (permettant par exemple de simuler des interactions à plus grande échelle comme les connexions neuronales dans un cerveau), sont également possibles. Toutefois, nous cherchons ici à étudier l'effet de la propagation des Prions via les cellules adjacentes ou le milieu de culture environnant, et l'effet de la confluence locale dans une culture cellulaire. Ces interactions locales sont restreintes à un voisinage géographique direct, bien représenté par un maillage régulier fixe.

Par ailleurs, nous considérons ici une géométrie des cellules fixes, ainsi chaque case de la grille représente une et une seule cellule. Cette géométrie fixe entraîne des contraintes sur la modélisation de la croissance cellulaire. En effet, nous négligeons la possibilité d'une déformation élastique des cellules, permettant d'augmenter la densité cellulaire dans un espace restreint. Toutefois, pour maximiser le nombre de voisins directs de chaque cellule (et limiter ainsi la forte inhibition de contact introduite par la géométrie fixe), le voisinage considéré est un **voisinage de Moore** (*i.e.* la case et ses 8 voisins immédiats). La correspondance entre le maillage choisi et une culture cellulaire est représentée figure 10.1.

Enfin, une culture cellulaire comprend entre 1 et 10 millions de cellules selon la nature du support de culture. L'AC ne représente donc qu'une petite partie de la culture complète, et les

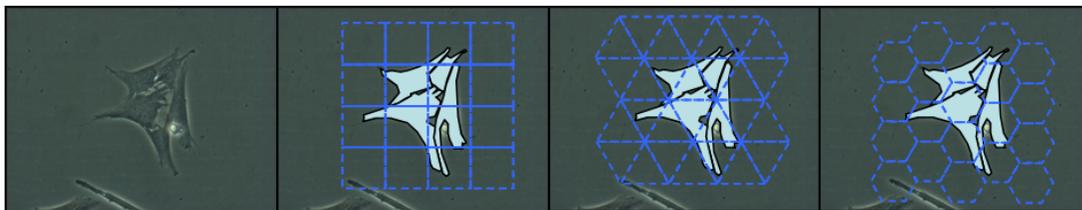


FIG. 10.1 – **Superposition des maillages réguliers classiques et d'une culture cellulaire** de MovS6 après 48h de culture. Aucun maillage régulier ne reproduit exactement la morphologie des cellules.

phénomènes de bord (ralentissement de la prolifération par exemple) sont considérés comme négligeables. Des **conditions aux frontières périodiques** sont donc retenues.

1.1.2 Type d'évolution et états possibles

Classiquement, une case d'un AC est définie par un nombre fini d'états, évoluant de façon déterministe en fonction de l'état de ses voisins immédiats. Dans notre cas, le modèle doit prendre en compte explicitement l'évolution du niveau d'infection d'une cellule selon le mécanisme de polymérisation nucléée décrit par un système d'équations différentielles couplées [299]. Un automate cellulaire continu (*i.e.* dont l'état d'une case peut avoir un nombre infini d'états, représentés par une grandeur continue, à valeur dans \mathbb{R}) semble donc plus adapté. Ce type d'AC est équivalent à un système différentiel discrétisé dans le temps et dans l'espace. Toutefois, il a pour avantage de prendre en compte l'hétérogénéité individuelle des cellules dans le cas où les mêmes règles d'évolution ne sont pas appliquées à toutes les cellules, contrairement aux équations différentielles très sensibles aux discontinuités d'espace.

En outre, l'AC défini ici n'est pas entièrement déterministe. En effet, les règles d'évolution qui seront présentées en détail par la suite (section 1.3) peuvent faire intervenir de l'aléatoire, inhérent au processus de culture cellulaire (par exemple, position initiale des cellules, choix de la direction de croissance ou encore mortalité aléatoire des cellules).

1.2 Description d'une cellule

Chaque case de l'automate cellulaire représente une cellule, capable de se diviser, de mourir, de répliquer ou non les Prions et de les propager. Chaque cellule est associée à 9 caractéristiques, pouvant varier de façon discrète ou continue selon la caractéristique :

- c_1 est relatif au phénotype de la cellule considérée : une cellule peut être capable de répliquer l'infection ($c_1 = -1$) ou non ($c_1 = 1$). Une case peut également être vide ($c_1 = 0$).
- D_c représente le temps qui doit s'écouler avant la prochaine division de la cellule considérée.
- V , U et P représentent le niveau d'infection d'une cellule. Elles correspondent respectivement aux quantités de PrP^c, de particules infectieuses (c'est-à-dire d'agrégats de PrP^{res}) et de molécules de PrP^{res} constituant les agrégats.
- E_a et E_p représentent la perméabilité cellulaire à l'infection, respectivement la capacité à "accepter" des Prions exogènes et la capacité à les propager.

- UM et PM représentent le niveau d'infection contenu dans le milieu de culture au niveau de la case considérée. Elles correspondent respectivement aux quantités de particules infectieuses (c'est-à-dire d'agrégats de PrP^{res}) et de molécules de PrP^{res} constituant les agrégats.

Ces caractéristiques sont initialisées de façon aléatoire. Initialement, chaque case est occupée par une cellule selon la probabilité p_{occ} . Une cellule est alors répliquante avec une probabilité p_{inf} et sa durée initiale du cycle cellulaire est choisi selon une loi de probabilité uniforme sur l'intervalle $[a_{passage}; a_{max}]$.

Ses quantités de PrP^c et d'agrégats de PrP^{res} sont choisies selon une loi de probabilité normale de moyenne $Qm_{c,R}$ (respectivement $Qm_{res,R}$) et d'écart-type $Qet_{c,R}$ (respectivement $Qet_{res,R}$) dans le cas d'une cellule répliquante, de moyenne $Qm_{c,NR}$ (respectivement $Qm_{res,NR}$) et d'écart-type $Qet_{c,NR}$ (respectivement $Qet_{res,NR}$) dans le cas d'une cellule non répliquante. Sa quantité totale de PrP^{res} est alors définie d'après la taille moyenne $Tm_{res,R}$ (respectivement $Tm_{res,NR}$).

Son coefficient d'accumulation (respectivement de propagation) est choisi selon une loi normale de moyenne $ACCM$ (respectivement $LIBm$) et d'écart-type $ACCet$ (respectivement $LIBet$) (dans la limite de l'intervalle $[0; 1]$).

Enfin, les niveaux d'infection UM et PM contenus dans le milieu de culture sont initialisés à 0 (milieu de culture neuf, sans infection initiale).

1.3 Règles d'évolution

Les caractéristiques cellulaires évoluent dans le temps selon différentes règles, qui sont appliquées successivement et de façon synchrone à l'ensemble des cellules.

- (1) **Division cellulaire** : une cellule se divise si et seulement si le temps écoulé depuis sa dernière division est suffisant et s'il existe une case libre dans son voisinage. Si ces deux conditions sont vérifiées, alors une cellule fille est créée, et sa position est choisie aléatoirement parmi les cases libres du voisinage. Après division, le caractère répliquant ou non de la cellule fille est identique à celui de sa mère, qui reste inchangé.

La durée minimale du cycle cellulaire des 2 cellules est choisie aléatoirement selon une loi de probabilité normale de moyenne M_{Cycle} et un écart-type σ_{Cycle} . Cette distribution très simple permet d'introduire une variabilité des temps de division cellulaire, bien connue expérimentalement. Des lois différentes ont été utilisées dans les modèles de croissance cellulaire par équations différentielles, comme par exemple la distribution Gamma [381]. D'autres règles de croissance, incluant en détail les différentes étapes du cycle cellulaire sont également envisageables [413]. Toutefois, aucune altération n'ayant été constatée expérimentalement, nous avons choisi de conserver la règle la plus simple.

Une proportion p_{TV} d'infection de la cellule mère est transmise à la cellule fille. Ce coefficient prend en compte la possibilité d'une transmission asymétrique due à un stockage de l'infection dans un compartiment cellulaire particulier, comme par exemple les agrégosomes [354].

Dans le cas où la condition de division n'est pas remplie (cycle cellulaire non terminé ou inhibition de contact trop importante), seul le temps écoulé depuis la dernière division (D_c) est décrémenté d'un pas de temps.

- (2) **Mortalité** : les cellules meurent aléatoirement, selon une probabilité p_{mort} indépendante du niveau d'infection. En cas de mortalité, toutes les caractéristiques de la cellule sont mises à zéro, sauf les niveaux d'infection contenus dans le milieu de culture (UM et PM). Des règles d'évolution similaires sont couramment utilisées pour modéliser la mortalité des cellules lors de la propagation virale (les cellules meurent sous l'action des macrophages, sans libération de virus) [403]. Au contraire, des règles plus complexes de dissémination de l'infection au moment de la mort cellulaire ont été implémentées pour simuler la lyse des cellules sous l'effet de l'infection. Toutefois, cela ne semble pas être le cas pour les Prions.
- (3) **Réplication des Prions** : les cellules répliquantes ($c_1 = -1$) multiplient les Prions selon un mécanisme de polymérisation nucléée, où les agrégats peuvent convertir de la PrP^c , se fragmenter en 2 agrégats plus petits ou être dégradés. Les quantités de PrP^c , d'agrégats et de PrP^{res} sont mises à jour selon les équations de Masel macroscopiques décrites au chapitre 6. Pour les rendre compatibles avec l'AC (qui évolue de façon discrète dans le temps), ces équations sont discrétisées dans le temps selon le schéma des trapèzes semi-implicites suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} V_t^{i,j} = \frac{V_{t-1}^{i,j} \left(1 - \frac{\Delta t}{2} (\gamma^{i,j} + \tau^{i,j} U_{t-1}^{i,j})\right) + \Delta t (\lambda^{i,j} + n(n-1)\beta^{i,j} U_{t-1}^{i,j})}{1 + \frac{\Delta t}{2} (\gamma^{i,j} + \tau^{i,j} U_{t-1}^{i,j})} \\ U_t^{i,j} = \frac{U_{t-1}^{i,j} \left(1 - \frac{\Delta t}{2} (\mu^{i,j} + (2n-1)\beta^{i,j})\right) + \Delta t \beta^{i,j} P_{t-1}^{i,j}}{1 + \frac{\Delta t}{2} (\mu^{i,j} + (2n-1)\beta^{i,j})} \\ P_t^{i,j} = \frac{P_{t-1}^{i,j} \left(1 - \frac{\Delta t}{2} \mu\right) + \Delta t (\tau^{i,j} U_{t-1}^{i,j} V_{t-1}^{i,j} - n(n-1)\beta^{i,j} U_{t-1}^{i,j})}{1 + \frac{\Delta t}{2} \mu} \end{array} \right.$$

où i et j représentent la position de la cellule dans la grille, λ , γ , μ , β et τ sont respectivement le taux de production de la PrP^c , le taux de dégradation de la PrP^c , le taux de dégradation de la PrP^{res} , le taux de fragmentation et le taux d'extension des agrégats de PrP^{res} . D'autres schémas numériques ont également été testés, toutefois, celui-ci présente le meilleur compromis entre stabilité numérique et vitesse d'exécution.

Les cellules non répliquantes ($c_1 = 1$) ne sont pas capables de convertir la PrP^c en PrP^{res} : leur coefficient de conversion τ est mis à 0.

- (4) **Propagation des Prions** : on suppose ici que la propagation des Prions s'effectue à la fois par contact cellulaire direct et par relargage des Prions dans le milieu de culture. Une

cellule libère une quantité d'infection proportionnelle à la quantité d'agrégats de PrP^{res} contenue dans la cellule, moyennées par un coefficient E_p représentatif de la capacité cellulaire à libérer de l'infection. Les Prions libérés sont propagés vers les cellules voisines, qui captent les Prions proportionnellement à leur coefficient de perméabilité aux Prions E_a (*i.e.* capacité à accumuler des Prions exogènes). La quantité de Prions non captée est relâchée dans le milieu de culture, où elle diffuse d'une case à l'autre selon un mécanisme classique de diffusion (loi de Fick). Les Prions libres peuvent à leur tour infecter les cellules se trouvant dans la même case qu'eux. Ces règles d'évolution sont données par :

$$\left\{ \begin{array}{l} U_{t+1}^{i,j} = U_t^{i,j}(1 - E_p^{i,j}) + E_a^{i,j} \sum_{l,k \in \Omega} \frac{U_t^{l,k} E_p^{k,l}}{N} + UM_t^{i,j} E_a^{i,j} \eta \\ P_{t+1}^{i,j} = P_t^{i,j}(1 - E_p^{i,j}) + E_a^{i,j} \sum_{l,k \in \Omega} \frac{P_t^{l,k} E_p^{k,l}}{N} + PM_t^{i,j} E_a^{i,j} \eta \\ UM_{t+1}^{i,j} = UM_t^{i,j}(1 - E_a^{i,j} \eta - \delta_{diff}) + \sum_{l,k \in \Omega} \frac{UM_t^{k,l} \delta_{diff}}{N} + UM_t^{i,j} E_a^{i,j} (1 - \sum_{l,k \in \Omega} \frac{E_p^{k,l}}{N}) \\ PM_{t+1}^{i,j} = PM_t^{i,j}(1 - E_a^{i,j} \eta - \delta_{diff}) + \sum_{l,k \in \Omega} \frac{PM_t^{k,l} \delta_{diff}}{N} + PM_t^{i,j} E_a^{i,j} (1 - \sum_{l,k \in \Omega} \frac{E_p^{k,l}}{N}) \end{array} \right.$$

où i, j, k et l sont des indices de positions de la cellule dans la grille, Ω correspond au voisinage d'une cellule, N est le nombre de voisins d'une cellule (on travaille ici avec un voisinage fixe), δ_{diff} représente le coefficient de diffusion de la PrP dans le milieu de culture, et η correspond à un facteur correctif, compris entre 0 et 1, permettant de pénaliser la transmission de l'infection par le milieu de culture.

Les règles (1) à (4) permettent de modéliser les principaux comportements d'une population cellulaire pendant le processus d'infection par des Prions, identifiés par notre analyse expérimentale. En particulier, l'hétérogénéité cellulaire et la susceptibilité cellulaire à l'infection sont représentées par 3 paramètres distincts : le caractère réplicant ou non des cellules (paramètre c_1) et les coefficients de perméabilité cellulaire à l'infection (E_p et E_a). Toutefois, la susceptibilité cellulaire à l'infection semble être un mécanisme peu stable au cours du temps, une cellule non susceptible pouvant devenir susceptible et inversement sous l'effet potentiel d'un équilibre épigénétique fluctuant au cours du temps [199].

(5) Susceptibilité cellulaire dynamique : à chaque division cellulaire, les niveaux de susceptibilité des cellules mères et filles sont choisis aléatoirement dans l'intervalle

$$[E_a^{mere} - p_s; E_a^{mere} + p_s] \text{ (dans la limite } [0; 1])$$

p_s représente le niveau de modification de la susceptibilité cellulaire aux Prions : une modification génétique correspond à un p_s proche de 0 ; une modification épigénétique ou aléatoire correspond à p_s proche de 1.

Expérimentalement, il est possible d'infecter transitoirement des cellules, c'est-à-dire qu'après exposition à un échantillon infectieux, les cellules en culture commencent à répliquer l'infection,

mais réussissent à désamorcer le processus de réplication [191]. La règle (5) de susceptibilité dynamique est indépendante du niveau d'infection des cellules et peut ne pas être suffisante pour qu'une culture cellulaire infectée soit capable de curer l'infection. Nous avons donc envisagé d'autres réponses cellulaires à l'infection, dépendantes de la présence d'infection dans une cellule.

(6) Saturation de la conversion : des résultats sur des souris transgéniques capables de répliquer les Prions humains lorsqu'elles expriment une PrP chimère Souris-Homme, mais pas lorsqu'elles expriment uniquement la PrP humaine, semblent indiquer que la présence d'un co-facteur de l'hôte (appelé Protéine X) soit requise pour la réplication des Prions [414]. Dans ce cas, la conversion de la PrP^c en PrP^{res} dépendrait alors de la quantité en protéine X. La façon la plus simple d'introduire cette dépendance sans modéliser explicitement la concentration en protéine X (qui reste inconnue) est d'introduire un seuil de PrP^{res} qui sature les protéines X présentes, stoppant ainsi la conversion.

Nous avons donc introduit la règle suivante : une cellule répliquante dont la quantité de PrP^{res} (en nombre d'agrégats ou en quantité totale) dépasse la valeur U_{max} devient non répliquante. Cette cellule redevient répliquante dès que sa quantité de PrP^{res} redevient inférieure à U_{min} .

(7) Diminution de la synthèse du précurseur : Cette règle découle de l'observation d'une diminution du gène *Prnp* observée suite à l'exposition de cellules neuroendocriniennes en culture à un inoculum infectieux [192]. Expérimentalement, cette diminution semble être indépendante de la production *de novo* de PrP^{res} par les cellules, et pourrait être due à la présence dans l'homogénat infectieux de facteurs produits au cours de l'infection (facteur d'inflammation, etc...). La production de ces facteurs n'est pas modélisée explicitement ici (nous supposons que leur niveau est proportionnel à la quantité de particules infectieuses intracellulaires).

La règle d'évolution est ainsi : une cellule dont la quantité de PrP^{res} dépasse la valeur Q_{max} diminue la synthèse de la PrP^c

$$\lambda_{U \geq U_{max}} = a\lambda, \text{ avec } a \in [0; 1].$$

Enfin, une dernière règle d'évolution est implémentée pour reproduire le mécanisme de culture cellulaire. En effet, lorsque les cellules sont mises en culture, elles s'attachent au fond de la boîte de culture et prolifèrent jusqu'à en couvrir le fond. Elles sont ensuite décollées et réintroduites à faible densité dans une nouvelle boîte. L'opération est renouvelée régulièrement. Ce mécanisme influence fortement la croissance des cellules. Ainsi, il est nécessaire de le prendre en compte dans le modèle.

(8) Passage cellulaire : au bout d'un temps donnée de culture, une proportion $p_{passage}$ de cellules sont choisies aléatoirement parmi les cellules de l'automate et repositionnées aléatoirement dans la grille. L'âge (caractéristique D_c) des cellules est alors incrémenté d'une valeur $A_{passage}$, représentant la perturbation du cycle cellulaire induite par le passage (un temps de latence est généralement observé, le temps que les cellules adhèrent au support de culture [415]). L'infection contenue dans le milieu de culture est remise à

0 (changement de milieu de culture au moment d'un passage). Aucun changement des autres caractéristiques cellulaires n'a été observé expérimentalement dans nos modèles en culture.

1.4 Sorties de l'automates

Le but de l'AC est d'étudier l'effet de la prolifération et de la division cellulaire sur la dynamique globale (*i.e.* moyennée sur toute la population) de l'infection, afin de comprendre dans quelle mesure l'inférence des mécanismes de réplication (qualitatif et quantitatif) est faussée par la dynamique multicellulaire. Ainsi, les sorties de l'automate sont destinées à reproduire les résultats expérimentaux obtenus classiquement. En outre, l'AC permet de suivre l'évolution spatiale, locale, de l'infection ou des cellules au cours du temps. Les différentes sorties sont récapitulées tableau 10.1.

Sortie de l'AC	Type de données expérimentales
Evolution temporelle	
Nombre de cellules	Comptage cellulaire
Nombre de cellules répliquantes	"Scrapie Cell Assay", Dilution limite
Nombre de cellules non répliquantes	"Scrapie Cell Assay", Dilution limite
Quantité de PrP ^c	WesternBlot, ELISA (non décorrélable de la PrP ^{res})
Quantité de PrP ^c moyenne par cell.	WesternBlot, ELISA (non décorrélable de la PrP ^{res})
Quantité de PrP ^c moyenne par cell. rép.	-
Quantité de PrP ^c moyenne par cell. non rép.	-
Quantité de PrP ^{res}	Western Blot, ELISA
Quantité de PrP ^{res} moyenne par cell.	Western Blot, ELISA
Quantité de PrP ^{res} moyenne par cell. rép.	-
Quantité de PrP ^{res} moyenne par cell. non rép.	-
Nombre d'agrégats de PrP ^{res}	-
Nombre d'agrégats de PrP ^{res} moyen par cell.	-
Nombre d'agrégats de PrP ^{res} moyen par cell. rép.	-
Nombre d'agrégats de PrP ^{res} moyen par cell. non rép.	-
Dynamique spatio-temporelle	
Cellules	Films, microscopie
PrP ^{res}	CellBlot, immunocytochimie (dynamique spatiale uniquement)

TAB. 10.1 – Description des sorties de l'AC

2 Résultats

Le modèle par automate cellulaire défini précédemment a été implémenté à l'aide du logiciel Scilab 4.1. Lors de l'analyse du modèle, nous nous sommes placés dans un contexte sans

P_{occ}

P_{inf}

a_{max}

$Qm_{c,R}, Qm_{c,NR}$

$Qet_{c,R}, Qet_{c,NR}$

$Qm_{res,R}, Qm_{res,NR}$

$Qet_{res,R}, Qet_{res,NR}$

$Tm_{res,R}, Tm_{res,NR}$

$ACCm (ACCet)$

$LIBm (LIBet)$

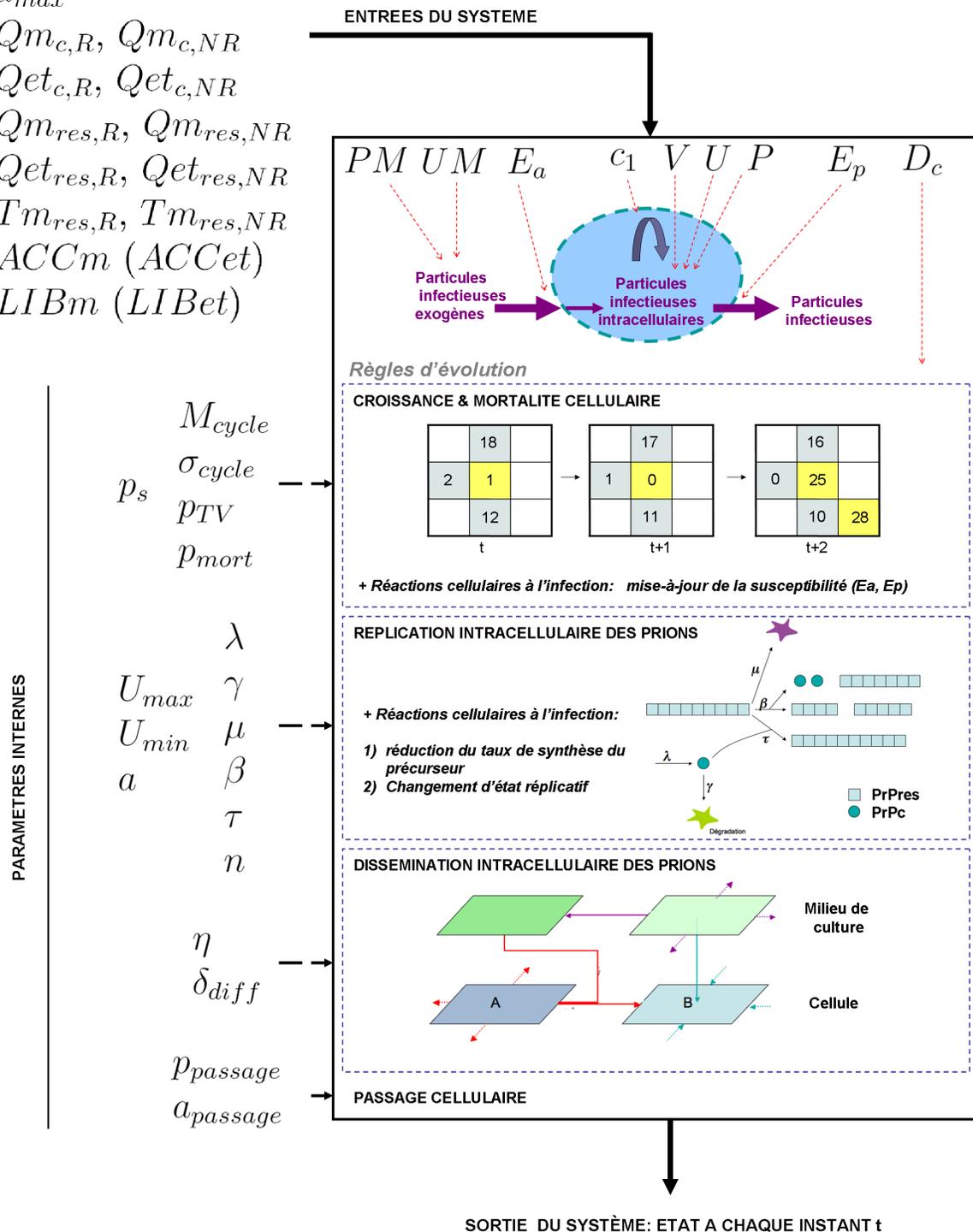


FIG. 10.2 – Modèle de la répllication et de la propagation des Prions au sein d'une culture cellulaire.

propagation intercellulaire des Prions (règle (4), inexistante dans nos modèles) et sans réaction cellulaire à l’infection, non observées dans nos modèles (règles (5) à (7)). Après une étude de la qualité numérique du modèle, nous avons cherché à évaluer numériquement l’effet de la prolifération des cellules sur le mécanisme de réplication dans les modèles cellulaires dont nous disposons au laboratoire. L’analyse numérique du modèle général, prenant en compte la totalité des règles d’évolution, constitue une des perspectives de ce travail.

2.1 Stabilité numérique et robustesse des sorties du modèle

2.1.1 Qualité du schéma de discrétisation des équations de Masel

L’implémentation numérique des équations différentielles de réplication des Prions selon le modèle de Masel nécessite une étape de discrétisation temporelle. Plusieurs schémas numériques classiques ont été testés (Runge-Kutta, Schéma d’Euler explicite ou implicite, Schéma des trapèzes). Dans la mesure où les paramètres cinétiques d’évolution sont inconnus et amenés à varier, les schémas implicites permettent de conserver une stabilité numérique quelles que soient les valeurs de paramètres, mais le temps d’intégration devient alors important. En revanche, les schémas explicites s’intègrent rapidement, mais sur des intervalles de stabilité restreints. Le schéma qui semble présenter le meilleur compromis entre vitesse d’exécution et intervalle de stabilité est le schéma des trapèzes semi-implicites détaillé précédemment (voir Règles d’évolution). Ce schéma est implicite pour la variable de l’équation (respectivement V, U et P) et explicite pour les variables couplées ; il n’est donc pas toujours stable. Sa stabilité numérique a été évaluée à l’aide d’une procédure OAT (*i.e.* variation d’un paramètre après l’autre) autour de la valeur standard estimée dans la littérature [299], pour différents pas de temps d’évolution. Le tableau 10.2 présente les intervalles de paramètres admissibles (*i.e.* aucune instabilité numérique n’est observée sur les grandeurs V,U et P).

Pour chaque simulation, l’erreur de discrétisation commise (*i.e.* l’écart par rapport à la sortie du pas de temps $dt = 0,01$ jour) a également été évaluée par le biais de l’erreur relative moyenne commise au cours du temps. La grandeur la plus sensible à la discrétisation semble être la quantité d’agrégats de PrP^{res} U. Le tableau 10.3 récapitule les intervalles de paramètres où l’erreur de discrétisation reste acceptable, c’est à-dire que l’erreur relative moyenne reste inférieure à 5% sur les trois sorties U, V et P. *Pour la suite de l’étude, nous resterons dans ces intervalles de paramètres cinétiques.*

	Réf.	Valeurs testées	Intervalle de stabilité			
			dt = 0.01	dt = 0.05	dt = 0.1	dt = 1
λ	4400	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^5$
γ	5	$10^{-4} - 10^2$	$10^{-4} - 10^2$	$10^{-4} - 10^2$	$10^{-3} - 10^2$	$10^{-1} - 10^2$
μ	0.04	$0, 10^{-5} - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$
τ	0.3	$0, 10^{-5} - 10^4$	$0 - 10^4$	$0 - 10^4$	$0 - 10^3$	$0 - 10^0$
β	10^{-4}	$0, 10^{-5} - 10^2$	$0 - 10^1$	$0 - 10^1$	$0 - 10^1$	$0 - 10^{-3}$

TAB. 10.2 – Intervalle de stabilité du modèle de Masel discrétisé. Le système de Masel discrétisé selon un schéma des trapèzes semi-implicite est simulé pour différents pas de temps (en jour), sur un intervalle de temps de 500 jours, avec pour conditions initiales $V = \lambda/\gamma$, $U = 10^{-6}$ et $P = 10^{-4}$.

Paramètre	dt=0.05	dt=0.1	dt=1
λ	$10^3 - 10^5$	$10^3 - 10^5$	10^3
γ	$10^{-2} - 10^1$	$10^{-1} - 10^1$	-
μ	$0 - 10^{-1}$	$0 - 10^{-1}$	10^{-1}
τ	$0 - 10^1$	$0 - 10^1$	$0 - 10^{-2}$
β	$0 - 10^0$	$0 - 10^0$	0

TAB. 10.3 – **Intervalle où l'erreur de discrétisation reste acceptable** Le système de Masel discrétisé selon un schéma des trapèzes semi-implicite est simulé pour différents pas de temps, sur un intervalle de temps de 500 jours, avec pour conditions initiales $V = \lambda/\gamma$, $U = 10^{-6}$ et $P = 10^{-4}$. Les paramètres testés sont ceux donnés au tableau 10.2. Les intervalles donnés correspondent à ceux où l'erreur de discrétisation relative moyenne commise par rapport à la simulation de pas de temps le plus faible reste inférieure à 5%.

2.1.2 Variabilité des sorties de l'automate cellulaire

Les règles d'évolution du système font intervenir des événements stochastiques (choix de la direction de croissance, choix de la mortalité cellulaire, initialisation de l'automate). Il est donc nécessaire d'évaluer la robustesse des sorties de l'automate, avant d'interpréter la significativité biologique des comportement observés. Une série de 100 simulations différentes effectuées pour un jeu de paramètres donné confirme que les sorties du modèle suivent une loi normale (Figure 10.3), hormis le nombre total de cellules (limité par la taille fixe de l'automate). Les différentes sorties (moyenne et écart-type sur 20 simulations) ont ensuite été évaluées pour trois jeux de paramètres distincts, sur des grilles de taille 50×50 et 100×100 (afin de tester l'influence de la taille de la grille). Elles sont résumées Table 10.4, page 199. De façon attendue, la variabilité des sorties diminue avec l'augmentation de la taille de l'automate. La sortie la moins robuste vis-à-vis de la stochasticité interne du modèle est la quantité moyenne de PrP^c dans les cellules capables de répliquer l'infection (variations relatives de plus de 30 % pour une grille 100x100, contre moins de 15% pour les autres sorties). *Pour la suite de l'étude, nous utiliserons une grille de taille 100x100.*

2.1.3 Effet du pas d'évolution temporelle de l'automate

Les mécanismes réels sont des mécanismes qui évoluent de façon continue dans le temps. Toutefois, le modélisation par automate cellulaire nécessite une discrétisation temporelle (*i.e.*

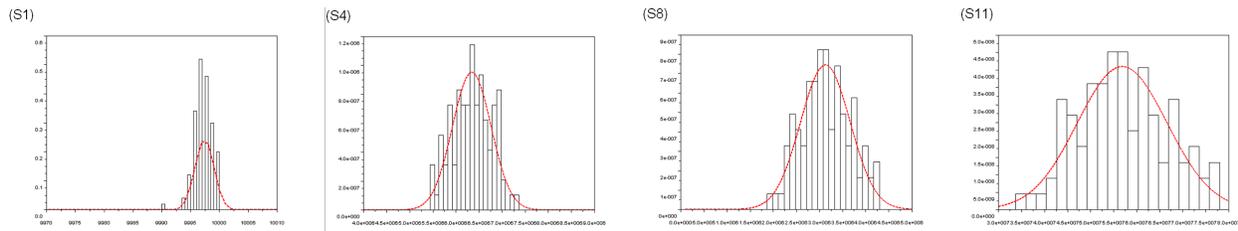


FIG. 10.3 – **Variabilité de quelques sorties de l'AC.** Les histogrammes représentent la répartition des sorties pour 100 simulations. Les courbes rouges correspondent aux répartition gaussienne de moyenne et d'écart-type correspondant à chaque sortie. S1 = Nombre de cellules; S4 = Quantité totale de PrP^c; S8 = Quantité d'agrégats de PrP^{res}; S11 = Quantité totale de PrP^{res}. Les paramètres d'évolution sont : $M_{cycle} = 1$ jour; $\sigma_{cycle} = 0.3$ jour; $p_{TV} = 0.3$; $p_{mort} = 0.005$ jour; $\lambda = 4400$ jour⁻¹; $\gamma = 5$ jour⁻¹; $\mu = 0.04$ jour⁻¹; $\beta = 0.3$ jour⁻¹; $\tau = 0.3$ jour⁻¹; $p_{passage} = 0.1$; $a_{passage} = 0.5$ jour. Les paramètres d'initialisation de l'AC sont $p_{occ} = 0.1$; $p_{inf} = 0.5$; $Q_{m_c, NR} = Q_{m_c, R} = \lambda/\gamma$; $Q_{m_{res}, NR} = 0$; $Q_{m_{res}, R} = 10^{-6}$; $T_{m_{res}, R} = 15$

le système est observé à l'instant t et $t+1$, mais pas entre les deux points de mesure) qui peut entraîner des erreurs sur les sorties du modèle. Ainsi, la robustesse des sorties vis-à-vis du pas d'évolution temporelle a été évaluée. Les sorties du modèle pour des pas de temps $dt_1 = 0,01$, $dt_2 = 0,05$, $dt_3 = 0,1$ et $dt_4 = 1$ (en jours) ont été comparées aux sorties du modèle pour un pas de temps $dt_0 = 0,001$ par un test de Student (Figure 10.4). Le pas de temps le plus grand pour lequel la variation des sorties reste non significative est de 0,05 jour (soit environ 1h). Ce pas de temps semble compatible avec l'ordre de grandeur des phénomènes biologiques pris en compte dans le modèle. En effet, concernant la vitesse de division cellulaire, de l'ordre d'une journée, un pas de temps d'une heure permet de prendre en compte la désynchronisation de la croissance cellulaire. De même, la vitesse de dissémination des Prions a été estimée expérimentalement de l'ordre de 0,7 mm/jour, soit l'équivalent de une à deux cellules par heure (pour une cellule d'environ $20\mu m$ de diamètre). Enfin, dans le cas des paramètres de réplication, présentant un temps caractéristique inférieur à l'heure, nous avons précédemment vérifié que l'erreur commise reste acceptable.

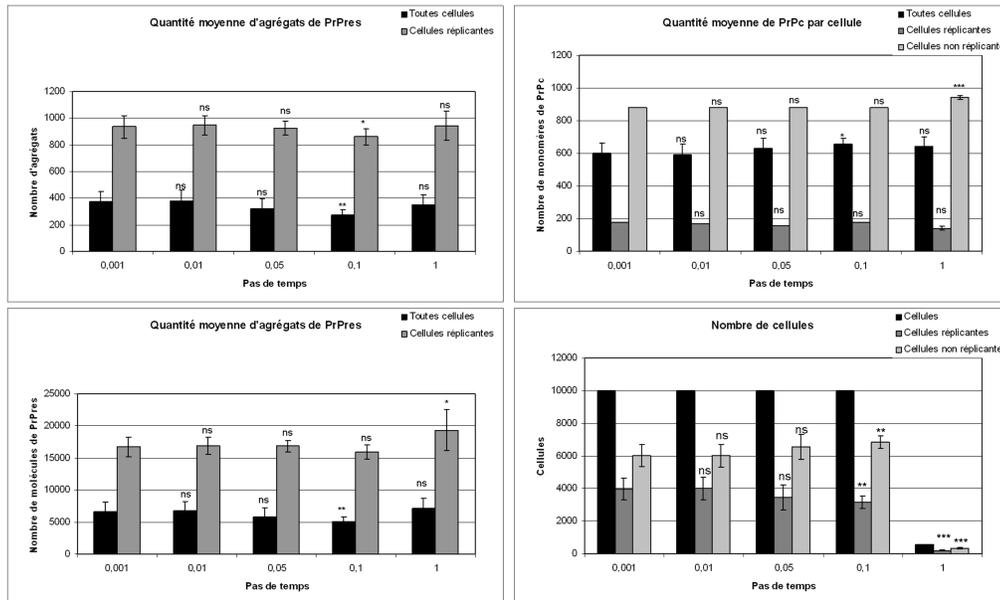


FIG. 10.4 – Robustesse des sorties du modèle vis-à-vis du pas temporel d'évolution. Chaque point de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type sur 10 simulations différentes d'une sortie de l'automate. Les sorties testées sont : le nombre de cellules (bas, droit, noir), le nombre de cellules répliquantes (bas, droit, gris foncé), le nombre de cellules non répliquantes (bas, droit, gris clair), la quantité moyenne de PrP^c par cellule (haut, droite, noire), par cellule répliquante (haut, droite, gris foncé) ou par cellule non répliquante (haut, droite, gris clair), la quantité d'agrégats de PrP^{res} moyenne par cellule (haut, gauche, noir) ou par cellule répliquante (haut, gauche, noir), la quantité moyenne de PrP^{res} par cellule (bas, gauche, noir) ou par cellule répliquante (bas, gauche, noir). Pour chaque pas de temps, la valeur d'une sortie est comparée à la valeur de la même sortie pour le pas de temps le plus faible par un test de Student (ns=non significatif, *=significatif à un risque de 5%, **=risque 1%, ***=risque 0.1%). Les simulations sont effectuées sur une grille de taille 100x100, sur 10 passages de 7 jours chacun. Les paramètres d'évolution sont : $M_{cycle} = 1$ jour ; $\sigma_{cycle} = 0.3$ jour ; $p_{TV} = 0.3$; $p_{mort} = 0.005$ jour ; $\lambda = 4400$ jour⁻¹ ; $\gamma = 5$ jour⁻¹ ; $\mu = 0.04$ jour⁻¹ ; $\beta = 0.3$ jour⁻¹ ; $\tau = 0.3$ jour⁻¹ ; $p_{passage} = 0.1$; $a_{passage} = 0.5$ jour. Les paramètres d'initialisation de l'AC sont $p_{occ} = 0.1$; $p_{inf} = 0.5$; $Qm_{c,NR} = Qm_{c,R} = \lambda/\gamma$; $Qm_{res,NR} = 0$; $Qm_{res,R} = 10^{-6}$; $Tm_{res,R} = 15$

		Paramètres 1 Taille 50(P10)			Paramètres 2 Taille 50(P10)			Paramètres 3 Taille 50(P10)		
		Moyenne	Ecart-type	ET/M	Moyenne	Ecart-type	ET/M	Moyenne (M)	Ecart-type (ET)	ET/M
Nombre de cellules (S1)		2492,05	3,32	0,13%	1752,15	124,34471	7,10%	2493,45	2,7810449	0,11%
Nombre de cellules répliquantes (S2)		1152,7	249,65747	21,66%	1752,15	124,34471	7,10%	456,95	192,21657	42,07%
Nombre de cellules non répliquantes (S3)		1339,35	248,6338	18,56%	0	0		2036,5	193,11232	9,48%
PrP ^c totale (S4)		1379408	115641,47	8,38%	1162271,6	307144,36	26,43%	24275661	1842045,5	7,59%
PrP ^c /cellule (S5)		553,54301	46,657955	8,43%	666,24215	185,69389	27,87%	9735,5272	735,97388	7,56%
PrP ^c /cellule rép. (S6)		169,61232	86,540714	51,02%	666,24215	185,69389	27,87%	2212,9612	1285,5708	58,09%
PrP ^c /cellule non rép. (S7)		872,22678	1,3362527	0,15%	x	x		11409,272	56,223333	0,49%
Nombre d'agrégats total (S8)		823732,85	117203,77	14,23%	779480,39	159634,5	20,48%	73439,076	31374,497	42,72%
Nombre d'agrégats /cellule (S9)		330,5229	46,883997	14,18%	443,2736	77,618665	17,51%	29,456932	12,605187	42,79%
Nombre d'agrégats /cellule rep (S10)		728,97478	89,405338	12,26%	443,2736	77,618665	17,51%	161,80867	22,44937	13,87%
PrP ^{res} totale (S11)		15867022	2250409,4	14,18%	6030876,7	1227065,1	20,35%	907475,57	387521,61	42,70%
PrP ^{res} /cellule (S12)		6366,6448	900,19741	14,14%	3430,0941	598,48554	17,45%	363,99475	155,69262	42,77%
PrP ^{res} /cellule rep (S13)		14043,684	1729,9493	12,32%	3430,0941	598,48554	17,45%	1999,6122	278,13914	13,91%

		Paramètres 1 Taille 50(P10)			Paramètres 2 Taille 50(P10)			Paramètres 3 Taille 50(P10)		
		Moyenne	Ecart-type	ET/M	Moyenne	Ecart-type	ET/M	Moyenne (M)	Ecart-type (ET)	ET/M
Nombre de cellules (S1)		9973,9	6,5686656	0,07%	7177,15	195,70097	2,73%	9972,5	4,8828378	0,05%
Nombre de cellules répliquantes (S2)		5146,45	600,80871	11,67%	7177,15	195,70097	2,73%	1687	341,71564	20,26%
Nombre de cellules non répliquantes (S3)		4827,45	602,53434	12,48%	0	0		8285,5	341,41077	4,12%
PrP ^c totale (S4)		5020666,1	473447,13	9,43%	4777477	679032,76	14,21%	98782711	2788701,1	2,82%
PrP ^c /cellule (S5)		503,37644	47,429967	9,42%	665,24322	88,997119	13,38%	9905,5081	279,51771	2,82%
PrP ^c /cellule rép. (S6)		156,70882	52,970229	33,80%	665,24322	88,997119	13,38%	2366,186	871,19299	36,82%
PrP ^c /cellule non rép. (S7)		872,04107	0,7401731	0,08%	x	x		11426,258	33,385363	0,29%
Nombre d'agrégats total (S8)		3817764,9	479997,15	12,57%	3192948,1	257628,94	8,07%	265446,97	50118,859	18,88%
Nombre d'agrégats /cellule (S9)		382,78036	48,174562	12,59%	444,95836	34,886693	7,84%	26,617889	5,026141	18,88%
Nombre d'agrégats /cellule rep (S10)		742,80475	54,343074	7,32%	444,95836	34,886693	7,84%	158,61124	15,342928	9,67%
PrP ^{res} totale (S11)		73535947	9287095,4	12,63%	24699927	1980700,9	8,02%	3281306	619392,79	18,88%
PrP ^{res} /cellule (S12)		7372,9271	932,03891	12,64%	3442,2178	269,79031	7,84%	329,03532	62,115256	18,88%
PrP ^{res} /cellule rep (S13)		14307,107	1049,255	7,33%	3442,2178	269,79031	7,84%	1960,6952	189,72843	9,68%

TAB. 10.4 – Variabilité intrinsèque des sorties de l'AC. Les valeurs correspondent à 20 simulations effectuées sur des grilles 50x50 ou 100x100, pour 3 jeux de paramètres choisis aléatoirement dans l'intervalle des paramètres admissibles. Le modèle est simulé sur 10 passages de 7 jours chacun, les paramètres d'initialisation sont les mêmes que pour la figure 10.4 (page 198).

2.2 Effet de la prolifération cellulaire sur la réplication des Prions

La prolifération cellulaire constitue l'une des différences majeures entre les outils expérimentaux acellulaires *in vitro* et les cultures cellulaires. Dans cette section, nous étudions théoriquement l'influence de cette prolifération cellulaire sur la dynamique spatio-temporelle de réplication des Prions, et plus particulièrement sur l'accumulation globale de PrP^{res} dans une population cellulaire en division asynchrone (mesurée expérimentalement par Western Blot ou ELISA).

2.2.1 Evolution spatio-temporelle de l'automate cellulaire

Dans un premier temps, nous avons étudié l'évolution spatio-temporelle des différentes sorties de l'automate cellulaire. La figure 10.5 donne l'évolution spatiale des cellules en culture (Figure 10.5, C) et de la quantité de PrP^{res} (Figure 10.5, D), à différents instants (répartis au cours du troisième passage). L'accumulation de PrP^{res} semble plus intense lorsque la cellule qui accumule la PrP^{res} est située au centre d'un amas de cellules, ce qui a pour effet d'inhiber sa croissance cellulaire. Au contraire, les cellules situées au bord des amas sont sujettes à une prolifération plus intense et accumulent moins de PrP^{res} .

La figure 10.5, A, représente l'évolution temporelle des différentes sorties du modèle. On observe que le nombre de cellules infectées est toujours inférieur au nombre de cellules capables de répliquer les Prions. Cette différence s'explique par le fait que le niveau d'infection initial des cellules répliquantes est initialisé selon une loi gaussienne (les quantités négatives remises à 0). Ainsi, toutes les cellules susceptibles (*i.e.* $c_1 = -1$) ne sont pas infectées. En revanche, le rapport du nombre de cellules infectées sur le nombre de cellules répliquantes reste stable au cours du temps (moins de 5% de variation). Ce résultat souligne l'importance des conditions initiales imposées par le protocole d'infection de la culture cellulaire.

Concernant l'évolution de la quantité de PrP^{res} moyenne en culture au cours d'un passage, une chute brutale du niveau d'infection moyen par cellule est d'abord observée. Cette chute semble due au fait que le niveau d'infection par cellule dans une culture ne suit pas une distribution symétrique autour du niveau moyen. La procédure de passage (consistant à choisir aléatoirement quelques cellules parmi la population) tend ainsi à sélectionner préférentiellement des cellules moins infectées, d'où la diminution du niveau d'infection moyen (Figure 10.6). Cette baisse d'infection est suivie d'un phénomène de rebond, pendant la phase de latence (pas de division cellulaire), puis d'une diminution de l'infection due à la croissance cellulaire importante. Enfin, lorsque la confluence cellulaire locale devient plus importante (ralentissement de la division cellulaire), le niveau d'infection moyen remonte à sa valeur de départ. Ce profil théorique est compatible avec le profil observé expérimentalement (figure 9.3 page 175 et [408]). Par ailleurs, lors de passages réguliers, la quantité moyenne de PrP^{res} mesurée au moment des passages semble stable au cours du temps.

Enfin, nous avons également observé l'évolution temporelle de la distribution de la quantité de PrP^{c} par cellule (Figure 10.5, E). Deux populations cellulaires sont observées : les cellules non répliquantes, présentant une quantité de PrP^{c} importante (correspondant au niveau d'équilibre sain prévu théoriquement par le modèle de réplication de Masel) et les cellules non répliquantes,

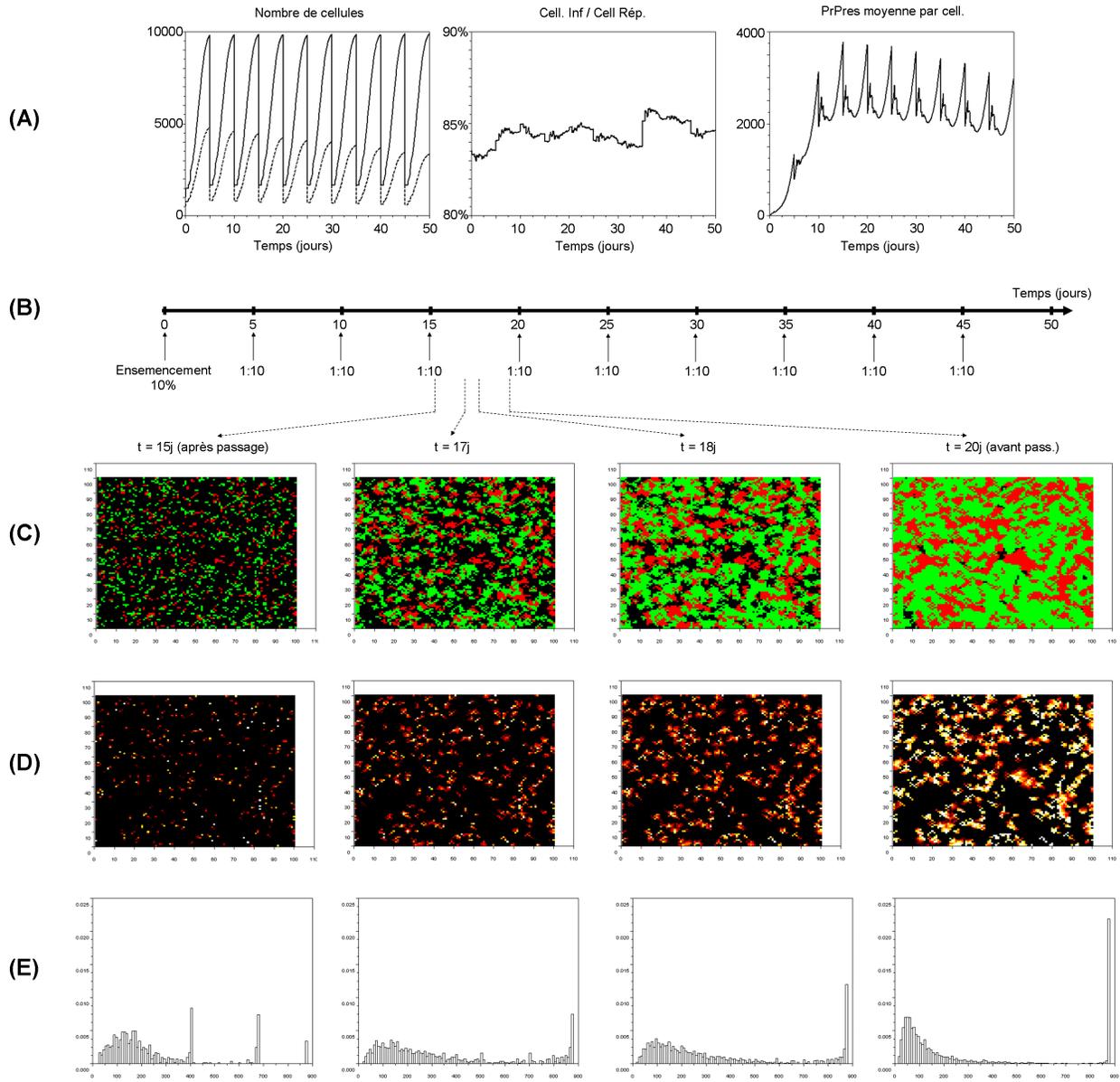


FIG. 10.5 – Effet de la prolifération cellulaire sur le niveau d'infection. (A) Evolution temporelle du nombre de cellules en culture (*Gauche*, ligne solide = Nombre total de cellules, ligne pointillée = Nombre de cellules répliquantes), de la proportion de cellules infectées (*i.e.* $PrPres > 0$) par rapport aux cellules capables de répliquer les Prions (*milieu*), et de la quantité moyenne de PrP^{res} par cellule (*droite*). (B) Représentation schématique du processus de culture modélisé. (C) Evolution spatio-temporelle des cellules en culture (*cellules répliquantes = rouge, cellules non répliquante = vert*). (D) Evolution spatio-temporelle de la PrP^{res}. Le niveau de PrP^{res} est représenté par un dégradé de rouge, allant du noir ($P = 0$) à du blanc ($P > 15000$ molécules). (E) Répartition du niveau de PrP^c dans les cellules répliquantes (*abscisse = quantité de PrP^c, ordonnées = proportion de cellules répliquantes*). Les paramètres utilisés pour la simulation sont : $M_{cycle} = 1$ jour $\sigma_{cycle} = 0.3$ jour $p_{TV} = 0.5$ $p_{mort} = 0.005$ jour⁻¹ $\lambda = 4400$ jour⁻¹ $\gamma = 5$ jour⁻¹ $\mu = 0.04$ jour⁻¹ $\beta = 0.01$ jour⁻¹ $\tau = 0.3$ jour⁻¹ $p_{passage} = 0.1$ $a_{passage} = 0.5$ $p_{occ} = 0.1$ $p_{inf} = 0.5$ $a_{max} = 2$ $Q_{m_{c,R}} = Q_{m_{c,NR}} = \lambda/\gamma$ $Q_{et_{c,R}} = Q_{et_{c,NR}} = 0$ $Q_{m_{res,R}} = 1$ $Q_{m_{res,NR}} = 0$ $Q_{et_{res,R}} = Q_{et_{res,NR}} = 0$ $T_{m_{res,R}} = 15$ $T_{m_{res,NR}} = 0$. Les cellules sont passées au 1/10^{ème} tous les 5 jours de culture. La simulation est effectuée sur une grille de taille 100x100, avec un pas d'évolution de 0.05 jours.

qui possèdent une quantité de PrP^c variable d'une cellule à l'autre, mais systématiquement plus faible que celles des cellules non répliquantes. La séparation des deux populations semble d'autant plus grande que le niveau de confluence est élevé.

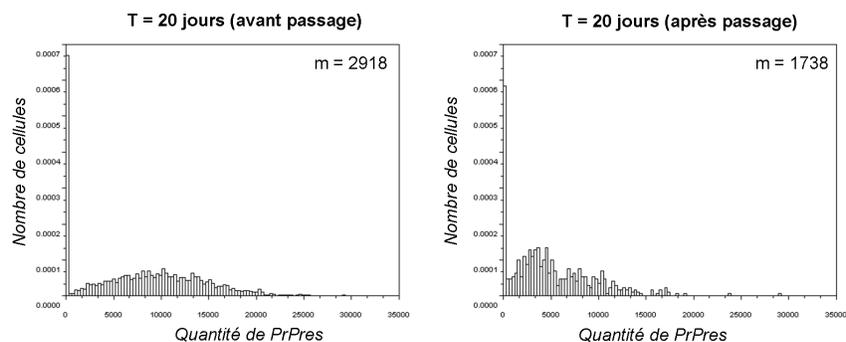


FIG. 10.6 – **Effet du passage sur la distribution de PrP^{res}** Les histogrammes représentent les distributions (normalisées en nombre de cellules) de la PrP^{res} par cellule répliquante juste avant et juste après le quatrième passage, pour la simulation représentée Figure 10.5. Les chiffres correspondent au niveau moyen global de PrP^{res} par cellule dans la culture.

2.2.2 Optimisation des conditions de culture

Le niveau de PrP^{res} détecté en Western Blot semble stable au cours des passages dans une culture cellulaire chroniquement infectée (données expérimentales non montrées et [408]). Afin d'étudier l'influence de la vitesse de prolifération sur cet état d'équilibre, nous avons fait varier la durée du cycle cellulaire (sans modifier les conditions de culture). A chaque passage, le niveau d'infection moyen atteint un état d'équilibre, d'autant plus important que la vitesse de croissance est faible (Figure 10.7, A).

Dans ce contexte de prolifération cellulaire, nous avons cherché à évaluer quelle est la meilleure stratégie de culture pour maximiser le niveau de PrP^{res} détectable, dans le but d'augmenter la sensibilité des modèles cellulaires (outils diagnostics plus rapides que les modèles animaux, mais moins sensibles [197]). En effet, expérimentalement, il est difficile de ralentir la croissance des cellules sans entraîner d'autres altérations du métabolisme cellulaire. En revanche, dans une culture, la croissance cellulaire est ralentie par inhibition de contact lorsque les cellules deviennent confluentes. Nous avons donc mesuré le niveau d'accumulation théorique pour différents temps de passages et différentes confluences d'ensemencement. La figure 10.7, B, montre qu'une durée prolongée de culture avant passage (avec une confluence d'ensemencement moindre) semble plus favorable à l'infection que des passages plus fréquents et plus confluentes. En revanche, pour les paramètres cinétiques utilisés, aucune condition testée n'a permis de désamorcer l'infection : maintenir une prolifération constante des cellules (par des passages avant confluence) conduit à un niveau d'infection moyen plus bas, mais non nul.

2.2.3 Criblage thérapeutique

Les modèles cellulaires sont couramment utilisés pour évaluer *in vitro* l'efficacité de composés anti-Prion [271]. Pour mimer l'effet de molécules thérapeutiques, nous avons fait varier les paramètres relatifs à la règle de réplication des Prions (*i.e.* paramètres cinétiques des équations de Masel), selon une procédure "One-Factor-At-A-Time" [378]. Dans une culture cellulaire en prolifération, le seul paramètre efficace pour augmenter la sensibilité des cellules à l'infection est d'augmenter le taux de production de la PrP^c λ (stratégie classique pour le développement de

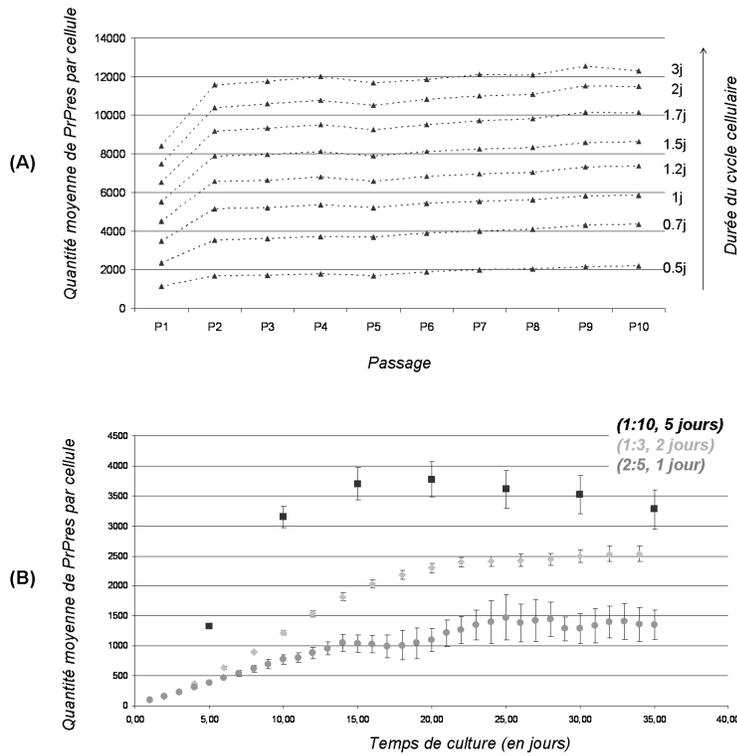


FIG. 10.7 – **Effet de la vitesse de prolifération cellulaire sur le niveau d'infection.** (A) Effet de la durée du cycle cellulaire (paramètre M_{cycle}). Les cellules sont passées au 1 :10 sur 10 passages de 7 jours chacun. $\sigma_{cycle} = 0.3M_{cycle}$. (B) Effet d'une dilution constante des cellules (phase de croissance exponentielle). $M_{cycle} = 1$ jour. Les cellules sont passées au 1 :10 pendant 7 passages de 5 jours (noir), au 1 :3 pendant 14 passages de 2 jours (gris clair) ou au 2 :5 pendant 35 passages d'une journée.

Les autres paramètres utilisés pour la simulation sont : $p_{TV} = 0.5$ $p_{mort} = 0.005 \text{ jour}^{-1}$ $\lambda = 4400 \text{ jour}^{-1}$ $\gamma = 5 \text{ jour}^{-1}$ $\mu = 0.04 \text{ jour}^{-1}$ $\beta = 0.01 \text{ jour}^{-1}$ $\tau = 0.3 \text{ jour}^{-1}$ $a_{passage} = 0.5$ $p_{occ} = 0.1$ $p_{inf} = 0.5$ $a_{max} = 2$ $Q_{m_c,R} = Q_{m_c,NR} = \lambda/\gamma$ $Q_{et_c,R} = Q_{et_c,NR} = 0$ $Q_{m_{res},R} = 1$ $Q_{m_{res},NR} = 0$ $Q_{et_{res},R} = Q_{et_{res},NR} = 0$ $T_{m_{res},R} = 15$ $T_{m_{res},NR} = 0$. La simulation est effectuée sur une grille de taille 100x100, avec un pas d'évolution de 0.05 jours. Les résultats sont une moyenne sur 10 simulations.

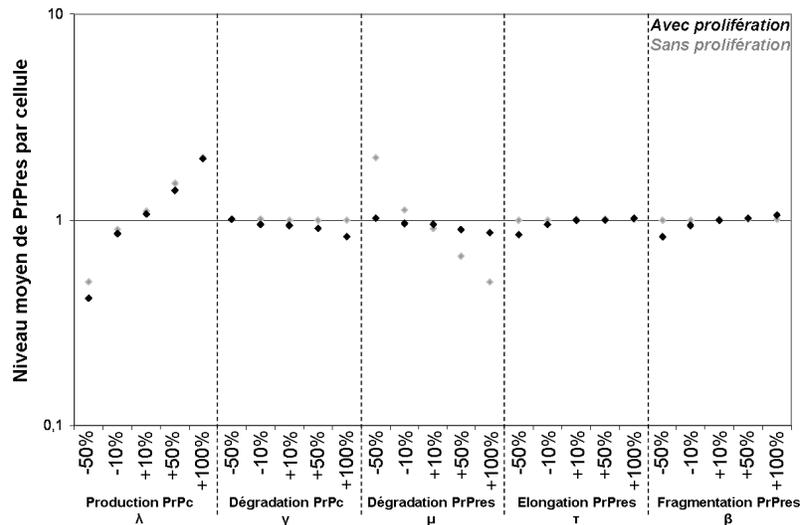


FIG. 10.8 – **Comparaison des effets anti-Prions avec ou sans croissance cellulaire.** Sur- ou sous expression de la quantité moyenne de PrP^{res} par cellule en fonction des paramètres cinétiques d'accumulation après 50 jours de culture pour le modèle avec division cellulaire (noir) ou sans division (gris). Chaque valeur est rapportée à la valeur standard. Les paramètres choisis pour les simulations de l'AC sont : $M_{cycle} = 1$ jour $\sigma_{cycle} = 0.3$ jour $p_{TV} = 0.5$ $p_{mort} = 0.005 \text{ jour}^{-1}$ $\lambda = 4400 \text{ jour}^{-1}$ $\gamma = 5 \text{ jour}^{-1}$ $\mu = 0.04 \text{ jour}^{-1}$ $\beta = 0.01 \text{ jour}^{-1}$ $\tau = 0.3 \text{ jour}^{-1}$ $p_{passage} = 0.1$ $a_{passage} = 0.5$ $p_{occ} = 0.1$ $p_{inf} = 0.5$ $a_{max} = 2$ $Q_{m_c,R} = Q_{m_c,NR} = \lambda/\gamma$ $Q_{et_c,R} = Q_{et_c,NR} = 0$ $Q_{m_{res},R} = 1$ $Q_{m_{res},NR} = 0$ $Q_{et_{res},R} = Q_{et_{res},NR} = 0$ $T_{m_{res},R} = 15$ $T_{m_{res},NR} = 0$.

nouveaux modèles cellulaires [197]). Dans le cas sans prolifération, une augmentation du taux de production de la PrP^c ou une diminution du taux de dégradation de la PrP^{res} conduisent à une augmentation du niveau de PrP^{res} moyen. Les stratégies visant à jouer sur les autres paramètres semblent peu efficaces pour augmenter l'accumulation de PrP^{res} , avec et sans prolifération .

A l'inverse, la stratégie thérapeutique (diminuant la quantité de PrP^{res}) la plus efficace sans prolifération semble être de diminuer la synthèse de la PrP^c ou d'augmenter la dégradation de la PrP^{res} . En culture cellulaire avec prolifération, jouer sur la synthèse de la PrP^c semble également efficace. En revanche, les effets curatifs d'une augmentation de la dégradation de PrP^{res} semblent moins importants en culture cellulaire pour les variations testées, bien que des variations plus importantes (multiplication par 10 ou par 100 du taux de dégradation de la PrP^{res}) conduisent à un effet curatif important (pouvant être jusqu'à 10^{10} fois plus efficace en cas de prolifération). Les effets curatifs des autres paramètres, quasiment inexistantes en l'absence de division (pour les paramètres cinétiques choisis) semblent amplifiés par la division cellulaire.

3 Discussion

L'enjeu de notre étude est d'étudier en quoi les comportements cellulaires individuels influencent la résultante globale de la réplication des Prions dans une population cellulaire. En effet, les modèles théoriques développés pour étudier les mécanismes de réplication des Prions sont pour la plupart des modèles acellulaires, reposant sur l'hypothèse d'une réplication homogène [298, 299]. Bien qu'ils s'appuient sur des données expérimentales issues de lignées cellulaires, ils ne prennent pas en compte les comportements cellulaires individuels, comme la division cellulaire, la prolifération ou l'hétérogénéité de réplication, pour pourtant influencer le profil d'accumulation de la PrP^{res} au sein d'une population cellulaire (voir chapitre précédent).

Nous avons donc développé un modèle de la réplication et de la propagation des Prions par automate cellulaire continu stochastique, permettant de prendre en compte l'hétérogénéité d'une population cellulaire. Cet automate couple le modèle individuel de réplication des Prions selon un mécanisme de polymérisation nucléée à des règles d'évolution mimant la prolifération asynchrone des cellules et la dissémination intercellulaire des Prions. Nous avons implémenté le modèle de polymérisation nucléée à coefficients constants, dans la mesure où trop peu de données expérimentales sont disponibles pour estimer la dépendance en taille des paramètres de réplication.

Par ailleurs, il existe différents types de cellules : des cellules qui s'infectent et d'autres qui ne s'infectent pas. Nous avons décomposé cette susceptibilité cellulaire à l'infection en trois mécanismes distincts : la capacité intrinsèque des cellules à répliquer les Prions, la capacité des cellules à accumuler ou relarguer les Prions et la capacité des cellules à diluer l'infection par division cellulaire. Les paramètres de réplication sont supposés fixes au cours du temps et identiques pour toutes les cellules (susceptibilité intrinsèque fixe). En revanche, les paramètres relatif à la propagation (capacité à capter des Prions exogènes notamment) sont supposés variables au cours du temps, permettant ainsi de reproduire la notion de susceptibilité dynamique au cours du temps [199].

3.1 Choix des paramètres de simulations

L'automate cellulaire, défini de façon très générale, est coûteux en temps de calculs, malgré de nombreuses optimisations du code informatique du modèle, exploitant notamment les propriétés du calcul matriciel du logiciel Scilab. Il est donc difficile de caractériser entièrement l'influence théorique des différents paramètres (*i.e.* leur effet sur les sorties du modèle ou leurs interactions). Dans le but de limiter le nombre de paramètres à étudier, nous avons d'abord tenté d'identifier quels sont les paramètres réellement influents sur le niveau global d'infection, par la méthode des effets élémentaires de Morris (détaillée au chapitre 8, section 3.2). Cette procédure semble en effet être une des méthodes les plus adaptées à des modèles coûteux en temps de calculs et ayant de nombreux paramètres en entrée dont seuls quelques uns sont influents [378]. Même si cette étude (menée sur un domaine de définition des paramètres très large) n'a pas permis de sélectionner quelques paramètres influents, elle a mis en évidence le fait que la très grande majorité des valeurs testées sont défavorables à l'infection. Dans ce contexte, il est préférable de mener une analyse détaillée de chaque règle, testée individuellement ou en petits groupes, pour identifier les valeurs paramètres compatibles avec le déclenchement d'une ESST, puis de refaire une analyse de sensibilité globale sur les intervalles de paramètres restreints pour identifier des effets plus précis.

Nous nous sommes intéressés par la suite uniquement à l'effet de la prolifération cellulaire sur la réplication des Prions, ce qui constitue le modèle théorique minimal des cellules en culture. Nous avons testé dans ce modèle minimal la compatibilité des valeurs de référence des paramètres cinétiques de réplication estimés dans la littérature pour un modèle acellulaire sur la base de données *in vivo* [299]. En absence de prolifération, ces valeurs sont compatibles avec une initiation de la réplication. En revanche, dans le modèle avec prolifération, elles conduisent à une perte de l'infection. Ce résultat est dû au fait que dans le cas d'une population cellulaire en division, la quantité de PrP^{res} est supposée être répartie équitablement entre les deux cellules. La vitesse de doublement de la PrP^{res} dans une cellule doit donc être supérieure à la vitesse de division de cette cellule (égale à 0 en absence de prolifération). Dans le cas contraire, la production de PrP^{res} ne compense plus la dilution par division, ce qui conduit à une perte de l'infection.

Dans le cas du modèle de Masel à paramètres constants, la condition de déclenchement d'une ESST est donnée par [412] :

$$\sqrt{\frac{\beta\tau V}{\gamma}} - (\mu + \beta x_0) > D_{division}$$

où $\sqrt{\beta\tau V}$ représente la production de PrP^{res} (avec V la quantité de PrP^c, β et τ les coefficients de fragmentation et d'élongation des agrégats) et $\mu + \beta x_0$ représente la disparition de la PrP^{res} (avec μ la dégradation de la PrP^{res} et x_0 la taille minimale des agrégats de PrP^{res}). Ainsi, à métabolisme de la PrP identique, le produit $\beta\tau$ mesurant le taux de fragmentation des agrégats (*i.e.* la capacité de production de particules infectieuses) et le taux d'élongation des agrégats (*i.e.* la capacité de production de la PrP^{res}) doit donc être plus efficace dans les modèles cellulaires en division que dans les cellules quiescentes. Toutefois, augmenter le coefficient d'élongation des agrégats (sans changement de la fragmentation) conduit à la formation de gros agrégats, qui, s'ils sont supposés inertes, désamorcent l'infection [343]. C'est pourquoi

nous avons choisi d'augmenter uniquement la capacité de fragmentation des agrégats β (valeur standard utilisée de 0.01 contre 0.0001 dans le modèle cinétique sans prolifération). Cette difficulté à calibrer les paramètres d'élongation et de fragmentation des polymères de PrP^{res} (ni trop faible, ni trop élevé) pourrait expliquer pourquoi seules quelques lignées cellulaires sont infectables par des Prions [197]. L'étude numérique précise de ce compromis (i.e. recherche des intervalles de paramètres compatibles avec le déclenchement d'une ESST), ainsi que l'étude des perturbations imposées par l'ajout progressif des autres règles d'évolution envisagées devrait permettre d'affiner les critères d'infectabilité des lignées cellulaires par différentes souches de Prions.

3.2 Mécanisme de réplication et niveaux d'équilibre de PrP^{res}

Expérimentalement, la quantité de PrP^{res} en culture atteint un niveau d'équilibre, dont le niveau dépend de la vitesse de division. En particulier, lorsque des cellules N2a infectées par une souche de Tremblante sont soumises à une division importante (grâce à des passages fréquents avant confluence, maintenant la culture en phase de croissance exponentielle), elles atteignent un niveau d'équilibre plus bas, mais non nul [408]. Sur la base de ces résultats, il a été proposé que toute la PrP^{res} produite ne participerait pas au mécanisme de conversion. En effet, sous cette hypothèse, le modèle cinétique global de l'hétérodimère conduit à un plateau bas (avec division importante) non nul, contrairement au modèle de l'hétérodimère classique, qui désamorce l'infection dès qu'une légère augmentation de croissance est induite [408]. Notre automate cellulaire permet de reproduire les résultats expérimentaux sans supposer de seuil dans le phénomène d'autocatalyse, mais en faisant intervenir les phénomènes locaux : bien que la culture soit globalement en phase de croissance exponentielle (tendant à diluer l'infection), la confluence locale entraîne la présence de cellules quiescentes, capables de répliquer l'infection à un niveau d'équilibre suffisant pour être détectable.

3.3 Effet du passage des cellules

La stochasticité de notre automate cellulaire nous a permis d'identifier des étapes critiques du processus de croissance cellulaire : la confluence locale et la sélection aléatoire des cellules. En effet, la confluence locale entraîne des niveaux de réplication différents, résultant des dilutions plus ou moins importante de l'infection par division. Au moment du passage, la sélection aléatoire d'une faible proportion de cellules s'effectue au détriment des cellules fortement infectées, très peu nombreuses, d'où la chute de l'infection moyenne par cellule observée expérimentalement au moment d'un passage. Ce processus de sélection pourrait aboutir à la perte de l'infection dans le cas où peu de cellules sont infectées. Ainsi, un protocole d'infection des cellules consistant à conserver le plus longtemps possible la totalité des cellules (même en division) pourrait éventuellement permettre de développer de nouveaux modèles cellulaires. Une telle approche a d'ores-et-déjà été utilisée dans notre laboratoire et a permis pour la première fois d'infecter de façon sub-chronique des cellules SN56 par des souches de Prions humains adaptées à la souris (article en préparation).

3.4 Orientations thérapeutiques et diagnostiques

Le paramètre théorique le plus efficace contre une infection à Prions *in vitro* semble être de diminuer la synthèse de la PrP^c. En revanche, le niveau d'accumulation de PrP^{res} *in vitro* est peu sensible à une variation des autres paramètres cinétiques. Toutefois, une diminution de la PrP^{res} plus importante dans le cas d'une population cellulaire en division par rapport au cas acellulaire, peut conduire à l'identification de molécules efficaces *in vitro*, mais peu efficaces *in vivo*. Ces résultats soulignent le besoin de développer de nouveaux modèles de criblage haut-débit des molécules thérapeutiques visant à étudier leur impact direct sur le mécanisme de réplication, comme par exemple la PMCA, plus éloignée du métabolisme cellulaire, mais permettant de s'affranchir de la dilution imposée par la prolifération cellulaire.

La dilution des Prions par la division cellulaire se traduit également sur les stratégies diagnostiques visant à augmenter la sensibilité des lignées susceptibles (par exemple, dans le but d'établir un test diagnostique de confirmation sanguin à partir de faibles titres infectieux). Le paramètre qui semble le plus efficace pour augmenter l'accumulation des Prions est la surexpression de la PrP^c, stratégie connue pour augmenter la susceptibilité des cellules N2a aux souches de Tremblante [197]. En revanche, les stratégies visant à modifier les autres paramètres semblent moins efficaces pour augmenter les seuils de détection. Cette absence d'amplification *in vitro* est uniquement due à la dilution de l'amplification par la croissance cellulaire, le développement de modèles cellulaires quiescents devrait permettre de disposer d'outils diagnostiques de confirmation performants [416].

Par ailleurs, notre modèle reproduit la diminution de la quantité de PrP^c observée dans les cellules infectées. Cet effet est observable sans supposer de réponses cellulaires à l'infection (contrairement à l'observation dans les cellules neuroendocriniennes [192]), et semble uniquement dû à la consommation de la PrP^c par la PrP^{res}. La prise en compte de l'hétérogénéité cellulaire entraîne des niveaux de PrP^c variable d'une cellule à l'autre, ce qui rend difficile l'utilisation du critère de la PrP^c pour trier efficacement les cellules non infectées. En effet, le niveau d'expression de la PrP^c moyen par cellule répliquante est la sortie du modèle la moins robuste vis-à-vis de la stochasticité du processus de culture. En revanche, les cellules exprimant le moins de PrP^c sont systématiquement celles qui sont les plus infectées. Ces résultats suggèrent que la méthode de tri semble adaptée pour enrichir une population en cellules infectées, et par conséquent est très utile pour disposer de modèles cellulaires plus sensibles comme outil diagnostique de confirmation.

Discussion et Conclusion générale

Les maladies à Prions, bien qu'initialement classées parmi les infections virales lentes [92], ne semblent pas dues à l'infection de l'organisme par un virus, mais à l'accumulation dans le système nerveux central de particules protéiques infectieuses [417]. Les Prions seraient ainsi le premier exemple connu d'agents pathogènes dénués d'acide nucléique spécifique. Ils illustrent une relation hôte-pathogène d'un genre nouveau : alors que la réplication virale fait intervenir des mécanismes complexes d'interactions entre le génome viral et le métabolisme cellulaire [418], le mécanisme de réplication des Prions ne semble faire intervenir qu'un nombre restreint de partenaires moléculaires. A l'extrême, et en témoigne les données récentes d'amplification *in vitro*, ce mécanisme pourrait ne faire intervenir que la PrP. Cette relative simplicité permet le recours à la modélisation mathématique pour étudier en détail les mécanismes hypothétiques de réplication des Prions, qui se produisent à des échelles de temps et de taille difficilement accessibles expérimentalement [94]. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la modélisation du mécanisme de polymérisation nucléée. Ce modèle est le seul à faire intervenir explicitement différentes tailles de polymères de PrP^{res} dans le mécanisme de réplication [299]. Nous l'avons enrichi à deux échelles, cellulaire et moléculaire.

A l'échelle cellulaire, nous avons tenté d'évaluer l'influence de l'hétérogénéité cellulaire sur la réplication des Prions, grâce au développement d'un automate cellulaire stochastique intégrant le mécanisme de réplication dans un environnement multicellulaire. Au préalable, une étude expérimentale a révélé l'existence d'une triple hétérogénéité au sein des lignées cellulaires exposées à un échantillon infectieux :

(1) hétérogénéité de la répartition spatiale des cellules. Cette hétérogénéité n'est pas influencée par l'infection. Elle est liée aux conditions initiales d'ensemencement des cellules, qui conduisent après croissance à des différences de densités cellulaires en culture.

(2) hétérogénéité de réplication des Prions par les cellules. A l'aide d'approche par dilution limite d'une culture chroniquement infectée, nous avons constaté des niveaux de réplication des Prions différents d'un clone à l'autre. En outre, le tri cellulaire et les outils d'immunocytologie ont mis en évidence des différences de réplication au sein d'une même lignée cellulaire. La nature de cette hétérogénéité reste mal comprise : elle pourrait être due, entre autres, à des différences intrinsèques des paramètres de réplication des Prions [419], ou à des différences de vitesse de prolifération cellulaire [408].

(3) hétérogénéité de susceptibilité cellulaire à l'infection. De façon similaire, à l'aide d'approches par dilution limite ou par fusion cellulaire, nous avons observé des différences de susceptibilité cellulaire à l'infection. L'absence de propagation intercellulaire des Prions (au moins dans nos lignées), associée à un niveau stable de PrP^{res} au cours du temps, suggère que les cellules infectées le sont stablement au cours du temps, sans perte d'infection liée à une prolifération importante ou à une réaction cellulaire à l'infection. Ainsi, la susceptibilité des cellules dans une lignée chroniquement infectable semble être un mécanisme indépendant de la machinerie cellulaire de réplication. Elle pourrait être liée soit à la perméabilité intrinsèques des cellules à un instant donné (non stable au cours du temps), soit à une mauvaise fixation de l'homogénat, soit encore à une internalisation de la PrP^{res} exogène dans un compartiment cellulaire non favorable à la réplication (comme par exemple, les agrésomes observés dans certaines cellules [354]).

Le modèle théorique par automate cellulaire nous a permis d'étudier l'influence de ces

différentes hétérogénéités cellulaires sur la réplication des Prions dans une population cellulaire sans dissémination intercellulaire.

En premier lieu, nous avons démontré, que pour des paramètres de réplication identiques pour toutes les cellules, la vitesse de prolifération suffit pour introduire une hétérogénéité du niveau de réplication des Prions. Ces différences de prolifération locale ont pour conséquence un faible nombre de cellules très infectées en culture. Ces cellules sont rarement sélectionnées au moment de la procédure de passage et conduisent à une diminution brutale de l'infection globale après passage. Cette chute brutale de l'infection au moment d'un passage pourrait expliquer la perte de l'infection dans les modèles cellulaires après quelques passages dans le cas des infections subaiguë [191] ou pour des lignées considérées comme non susceptibles. Dans ce contexte, la méthode de tri cellulaire sur le critère de la PrP^c constitue une méthode robuste utile pour enrichir une population en cellules très infectées (mais non pour purifier les cellules non infectées) et compenser ainsi les effets de la prolifération cellulaire. De même, des protocoles visant à conserver le plus longtemps possible le maximum de cellules (pour éviter la perte des cellules les plus infectées) semblent prometteurs pour augmenter la sensibilité des modèles cellulaires. Ces données sont très encourageantes pour le développement de tests diagnostiques de confirmation plus rapides et moins coûteux que les modèles animaux, capables de détecter les faibles doses infectieuses contenues dans les échantillons biologiques.

Par ailleurs, nous avons observé grâce au modèle par automate cellulaire que les paramètres cinétiques requis pour l'initiation de la réplication doivent être plus adaptés dans une culture cellulaire par rapport au contexte *in vivo* pour compenser la dilution des Prions par prolifération : augmentation de la vitesse d'élongation et de fragmentation. Cette propriété semble être à l'origine des divergences d'efficacité observées pour des médicaments anti-Prions testés *in vivo* ou *in vitro*. Les différences de réplication doivent donc être évaluées précisément pour continuer à utiliser les modèles cellulaires comme outils de criblage des molécules anti-Prions. D'après notre modèle, la prolifération cellulaire aboutit à une compétition entre deux phénomènes opposés, qui se régulent : une division cellulaire importante conduit à une dilution de l'infection, mais elle conduit aussi à une confluence locale plus élevée qui conduit à son tour à une augmentation de l'infection. Cette compétition liée aux phénomènes locaux n'est pas prise en compte dans les modèles cinétiques par équations différentielles. Elle justifie l'intérêt grandissant pour l'étude des phénomènes individuels en biologie et le recours à des techniques de plus en plus performantes, comme par exemple la microscopie en temps réel [420] ou la microscopie couplée à des marquages protéiques fluorescents [421].

A l'échelle moléculaire, nous avons enrichi la formulation moléculaire du modèle de polymérisation nucléée pour autoriser la dépendance en taille des propriétés réplcatives des différents agrégats de PrP^{res}, afin de tenir compte de données expérimentales récentes [219, 221, 324].

L'étude numérique du modèle suggère que la distribution en taille des agrégats est la donnée expérimentale macroscopique la plus informative sur les mécanismes élémentaires de réplication. Au contraire, l'accumulation globale de PrP^{res} reste insensible à l'introduction d'une dépendance en taille des paramètres de réplication. L'insolubilité des agrégats de PrP^{res} rend difficile l'étude expérimentale de cette distribution en taille dans un contexte *in vivo*, toutefois, des techniques de purification et de fractionnement sont en cours de mise au point et devraient permettre d'obtenir précisément cette distribution en taille [219, 221, 422]. L'obtention de cette distribution devrait permettre d'identifier rapidement les tailles d'agrégats les plus infectieuses,

grâce à la résolution de problèmes inverses basés sur le modèle de Masel généralisé. La connaissance des particules les plus infectieuses possède un intérêt applicatif important, d'un point de vue thérapeutique (où les particules doivent être stabilisées dans un compartiment non convertisseur, et où la recherche d'inhibiteurs structurels de la conversion est limitée par le fait que les polymères les plus convertisseurs sont les moins représentés parmi la PrP^{res} totale) et d'un point de vue diagnostique (où les particules doivent au contraire être ramenées dans le compartiment le plus convertisseur). En particulier, la PMCA (*i.e.* alternance de cycles d'incubation pour agrandir les agrégats et de cycles de sonication pour les fragmenter) est très sensible à la souche de Prions. Adapter les protocoles expérimentaux pourraient permettre une amplification plus rapide et plus robuste pour une souche donnée, le nombre de cycles réduits permettant en outre de s'affranchir des faux positifs, et ainsi de disposer d'un test diagnostique sanguin fiable.

Les deux axes de modélisation que nous avons développés séparément ici pourront par la suite être couplés au sein d'un même modèle, afin d'évaluer la relation entre l'hétérogénéité cellulaire et la distribution en taille des agrégats de PrP dans un contexte *in vivo* hautement hétérogène. Dans ce sens, nous avons testé une piste d'étude intéressante permettant de réduire la complexité du modèle moléculaire afin de la rendre compatible avec un modèle multicellulaire. Outre l'étude de la robustesse de la distribution en taille des agrégats (validation nécessaire à la mise en oeuvre des techniques d'estimation paramétriques des coefficients de réplication *in vivo*), un tel modèle pourrait permettre d'étudier théoriquement dans quelle mesure le mécanisme de polymérisation des Prions est spécifique d'une population cellulaire donnée, et ainsi, de continuer à approfondir le lien entre mécanisme de souche et polymérisation des Prions.

Dans un cadre plus général, les modèles développés au cours de ce travail pourront servir à l'étude des amyloïdoses. En effet, les amyloïdoses (telles que la maladie d'Alzheimer) sont caractérisées par l'accumulation de protéines mal conformées capables de s'agréger en fibrilles amyloïdes par des mécanismes similaires aux Prions. La possibilité d'amplifier des peptides $A\beta$ par une technique semblable à la PMCA [115], comme pour les Prions, illustre tout particulièrement la forte ressemblance des mécanismes de polymérisation. Toutefois, même si une forme de la maladie d'Alzheimer peut être accélérée par l'injection de fibrilles amyloïdes chez des hôtes génétiquement sensibles [114], ces fibrilles ne semblent pas pouvoir déclencher cette maladie, contrairement aux maladies à Prions. Ainsi, à travers la comparaison des paramètres de réplication, il pourrait être intéressant de considérer le caractère transmissible des Prions non pas en considérant les maladies à Prions comme une exception dans le monde microbiologique, mais plutôt comme une exception dans le monde des amyloïdoses. Dans cette optique, l'analyse théorique de la stabilité des états d'équilibre du modèle de polymérisation nucléée généralisée nous a d'ores-et-déjà permis de mettre en évidence des conditions nécessaires au déclenchement de la polymérisation. Ces conditions font intervenir les différents paramètres de réplication (en particulier, l'élongation, la fragmentation et la dégradation des agrégats protéiques) et nécessitent une estimation précise de ces paramètres. La comparaison quantitative des paramètres de réplication, estimés à partir de la distribution des agrégats, pourrait être envisagée entre différentes souches de Prions et les protéines $A\beta$, afin de mieux comprendre en quoi ces grandeurs différentes influent sur le caractère infectieux ou non.

Annexes

Matériels et méthodes

1 Modèles cellulaires

Trois modèles cellulaires ont été utilisés pour cette étude :

Les cellules GT1 : cellules neuronales d’hypothalamus de souris immortalisées par tumorigénèse exprimant la PrP murine et chroniquement infectables par la souche Chandler (tremblante adaptée à la souris). Le milieu de culture utilisé pour l’entretien de la lignée infectée ou non est un mélange d’Opti-MEM (Gibco), supplémenté de 5% en sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma), de 5% en sérum de cheval décomplémenté (Gibco), de 1% de pyruvate de sodium (Gibco) et de 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco).

Les cellules MovS6 : cellules issues des ganglions rachidiens dorsaux de souris surexprimant la PrP ovine et chroniquement infectables par la souche PG127 (tremblante ovine). Le milieu de culture utilisé pour l’entretien de la lignée infectée ou non est un mélange de 3/4 DMEM (Gibco), 1/4 F-12 (Ham) Nutrient Mixture (Gibco), supplémenté de 5% en sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma) et de 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco).

Les cellules SN56 : cellules de neurones cholinergiques issues de septum de souris et fusionnées à un neuroblastome murin. Elles sont infectables par les souches de Tremblante adaptées à la souris Chandler et 22L. Elles sont entretenues dans un milieu composé d’Opti-MEM (Gibco), supplémenté de 10% en sérum de veau fœtal décomplémenté et de 1% en PS.

Le milieu de culture est régulièrement remplacé par du milieu neuf, et les cellules sont entretenues régulièrement (retrait du milieu, lavage avec 10 mL tampon phosphate (PBS, Gibco), ajout et retrait immédiat de 1 mL de trypsine-EDTA (Gibco), reprise des cellules dans du milieu neuf et ensemencement dans une nouvelle flasque à la dilution adaptée).

2 Biologie cellulaire

2.1 Etude de la prolifération cellulaire

Etude de la croissance cellulaire La survie cellulaire est estimée par le test Cell Prolifération Reagent WST1 (Roche). Les cellules sont ensemencées dans 100 μ l de milieu dans des plaques 96 puits. Au bout d’un temps donné de culture, 10 μ l de WST1 par puit sont ajoutés.

La plaque est incubée pendant 2h à 37°C, 5% CO₂, puis la densité optique (DO) est mesurée au spectrophotomètre. La DO retenue est la résultante de la différence entre l'absorbance mesurée à 450 nm et celle mesurée à 650 nm.

Etude du cycle cellulaire Les cellules en culture sont trypsinées puis lavées en PBS. Elles sont centrifugées 5 min à 500g à 4°C, puis le surnageant est éliminé.

1. *Fixation des cellules* : le culot est repris dans 875µl de PBS à 4°C et 125µl de formaldéhyde 2% froid sont ajoutés. Le mélange est vortexé doucement, puis incubé pendant 30 min à 4°C. Les échantillons sont centrifugés pendant 5min à 500g à 4°C, et le surnageant est éliminé.

2. *Perméabilisation des membranes* : le culot est repris dans 300µl de PBS Tween-20 à 0,2% (à température ambiante) et incubé pendant 15min à 37°C. 1ml de PBS est ajouté et les échantillons sont centrifugés pendant 5min à 500g à 4°C, le surnageant est éliminé.

3. *Marquage de l'ADN* : le culot est repris dans 1mL de la solution de marquage (10µg/ml de Iodure de Propidium et 11,25 unités de Kunitz /ml de RNase), incubé pendant au moins 30 min à 4°C à l'obscurité. Les échantillons sont conservés dans la solution de marquage jusqu'à l'acquisition des données et analyse par cytométrie en flux (cf. 2.2.5).

Etude de la mortalité cellulaire. Les cellules en culture sont trypsinées puis lavées en PBS. Elles sont centrifugées 5 min à 500g à 4°C, puis le surnageant est éliminé. 500µl d'une solution d'iodure de propidium (10µg/mL dans du PBS) sont ajoutés ; l'analyse se fait au cytomètre de flux, après une incubation minimum de 30 min à 4°C.

2.2 Détection de la protéine PrP par immunofluorescence

Utilisation d'un traceur fluorescent (émission dans le vert). 50µg de traceur CMFDA (Molecular probe) sont repris dans 13µL de DMSO, dilués dans 13mL de milieu sans sérum. Ces 13mL sont déposés sur le tapis cellulaire lavé en PBS et laissés en contact 30 min à 37°C. Après 3 lavages en milieu complet, 15mL de milieu sont déposés sur les cellules et laissés en contact 30 min à 37°C. Après 3 lavages en PBS, les cellules sont trypsinées et utilisées.

Immunomarquage intracellulaire de la PrP : les cellules sontensemencées à faible confluence (30-50%) sur des lamelles de verre stériles en plaque 6 puits pendant 24 heures. Le volume des différents traitements et lavages est de 2 mL sauf indications contraires. Les cellules sont fixées au formol 4% pendant 15 min puis rincées 3 fois en PBS, elles sont ensuite perméabilisées au Triton X-100 (sigma) 0,1% en PBS pendant 10 min et rincées 3 fois en PBS. Elles sont ensuite traitées ou non à la protéinase K à 0,2 µg/mL pendant 5 min à 37°C, rincées 3 fois en PBS, traitées 10 min au Thiocyanate de guanidium 4.23 M et saturées en sérum de chèvre 10% pendant 30 min à 4 °C. A l'issue de la saturation, les cellules sont directement mises en contact avec 20 µL d'anticorps primaire C pendant 1h30 à 4°C. Elles sont ensuite rincées 3 fois en PBS puis incubées avec 20 µL d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (ALEXA 568 : CaM-A568, Molecular Probes, pour une émission dans le rouge). Les lamelles sont ensuite montées en milieu de montage Vectashield / Dapi et observées soit au microscope à épifluorescence (Leica 6000DPM), avec une acquisition des images par caméra Olympus, DP50, couplé à un logiciel d'acquisition (Studio ViewFinder 3.0.1, Pixera), soit au microscope confocal.

Immunomarquage de la protéine PrP à la surface des cellules. Les cellules en culture sont trypsinées puis lavées en PBS. Elles sont centrifugées 5 min à 500g à 4°C, puis le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 50 μ L d'anticorps primaire A1 ou A2 (1 μ g/mL), et incubé pendant 30 min à 4°C. Après deux lavages (ajout de 800 μ L de PBS, centrifugation 5 min à 500g à 4°C et retrait du surnageant), le culot est repris dans 50 μ L d'anticorps secondaire couplé à la Rhodamine-Phycoerythrine (RaM-RPE, 1 μ g/mL), et incubé pendant 30 min à 4°C. Après deux lavages, les cellules sont analysées par cytomètre de flux (cf. 2.3).

2.3 Acquisition et analyse par cytométrie en flux

Le cytomètre de flux (FACScan Becton Dickinson) est un appareil équipé d'un laser à Argon qui permet de mesurer la fluorescence après une excitation de l'échantillon à la longueur d'onde de 488 nm. L'appareil est couplé à un ordinateur permettant l'acquisition et l'analyse des données par le logiciel CellQuest (Becton Dickinson). Les paramètres de l'appareil sont étalonnés en fonction du type cellulaire étudié et affinés à chaque manipulation. Lors de l'acquisition, les cellules sont amenées à l'aide d'un circuit fluide dans une chambre de mesure, traversée par le laser monochromatique. Lors du passage des cellules devant le laser, l'intensité lumineuse résultante est mesurée simultanément en transmission et en réflexion par des photomultiplicateurs. Les différentes données permettent de mesurer 5 paramètres : la taille, la granulosité, et 3 paramètres de fluorescence émettant chacun sur une plage de longueur d'onde différente dans le domaine du visible : FL1 (de 500 à 560 nm, émission dans le vert), FL2 (de 543 à 627 nm, émission dans le rouge orange) et FL3 (650 nm, émission uniquement dans le rouge) . Les signaux analogiques sont transformés en signaux numériques permettant une analyse qualitative, quantitative et statistique des informations reçues.

2.4 Fusions des lignées cellulaires

Transfection des cellules. Les plasmides utilisés dans cette étude sont les plasmides pcDNA 3.1/Hygro+ , pcDNA6.2/V5-DEST et pcDNA3.1 (Invitrogen) contenant respectivement des gènes de résistance à l'hygromycine B, à la blasticidine et à la généticine. 500 000 cellules sont ensemencées en plaque 6 puits. Le lendemain, les cellules sont lavées en PBS et 1mL de milieu de culture sans sérum est ajouté. Dans un tube Eppendorf stérile, 100 μ L de milieu de culture sans sérum et 3 μ L de FuGene6 (Roche) sont mélangés, et incubés pendant 5 minutes à température ambiante, puis 1 μ g de plasmide est ajouté. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante, avant d'être déposé sur les cellules. 48 heures après transfection, et pendant 3 semaines, les cellules transfectées sont sélectionnées avec 200 μ g/mL d'hygromycine B (Roche), 525 μ g/mL de généticine G418 (Gibco) et de blasticidine 50 μ g/mL(Gibco)/ Ces doses ont été établies préalablement à l'aide de tests de toxicité sur les cellules non transfectées.

Fusion des cellules. 500 000 cellules murines résistantes à un antibiotique et 500 000 cellules murines résistantes à un autre antibiotique sont ensemencées dans un puits de plaques 6 puits, dans 2 ml de milieu de culture. Le lendemain, après adhésion des cellules, elles sont lavées au PBS, et 1 ml de PEG (50%, Roche) est ajouté sous agitation pendant 1 min. Les cellules sont lavées deux fois avec du milieu sans sérum et une fois avec du milieu avec sérum avant d'être

incubées à 37°C pendant la nuit. Le lendemain les cellules fusionnées sont sélectionnées par l'ajout des deux antibiotiques.

Analyse chromosomique des cellules fusionnées. Les cellules sont bloquées en métaphase par traitement à la colchicine (60 ng/ml) pendant 6h à 37°C. Les cellules sont ensuite trypsinées puis centrifugées 5 min à 500 g. Le culot est resuspendu dans une solution hypotonique de KCl à 0,075 M et incubé 20 min à 37°C. Les cellules sont préfixées en ajoutant 5 à 6 gouttes du fixateur (3 volumes d'éthanol absolu pour 1 volume d'acide acétique 100%) puis elles sont centrifugées (5 min à 500 g). Le surnageant est aspiré, le culot cellulaire est repris dans 8 ml de fixateur en vortexant. Les cellules sont gardées à 4°C sur la nuit. Le fixateur est changé. L'étalement se fait sur des lames rincées à l'eau et refroidies. Les lames sont séchées à température ambiante sur la nuit. Puis, les lamelles sont montées en milieu de montage Vectashield / Dapi et observées au microscope à fluorescence. L'acquisition des images se fait grâce à une caméra couplée à un logiciel d'acquisition (Studio ViewFinder)

2.5 Tri des différentes populations cellulaires par immunomarquage de la protéine PrP

Tri par "Magnetic Absorbant Cell sorting" (MACS). Les cellules en culture sont trypsinées, puis lavées avec du tampon phosphate (PBS, Gibco). Elles sont centrifugées 5 min à 500g à 4°C, puis le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 100 μ L d'anticorps primaire A1 à 1 μ g/mL, puis incubé pendant 1 heure à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées en PBS, centrifugées et le culot est incubé pendant 15 min à 4°C, avec un anticorps secondaire couplé à une bille magnétique dans un volume final de 100 μ L. A l'issue de ce couplage, l'anticorps secondaire RaM-RPE est ajouté (7 μ L). Les cellules sont lavées en PBS et déposées dans une colonne placée dans un champ magnétique. Après plusieurs lavages, l'élution des cellules marquées se fait en exerçant une forte pression à l'aide d'un piston sur la colonne, préalablement retirée du champ magnétique après ajout de 500 μ L de tampon d'élution. L'efficacité du tri magnétique est évaluée par cytométrie en flux (cf. 2.3)

3 Analyse biochimique

3.1 Détermination du niveau d'infection des différentes populations isolées par Western Blot

Purification de la PrPres. Les cellules sont lavées avec du PBS, puis lysées pendant 10 min à 4°C par un tampon de lyse contenant 0,5% de déoxycholate de sodium (Sigma), 0,5% de Triton X-100 (Sigma), 50 mM de Tris-HCl (Sigma) pH 7,4 (Sigma). Les fractions nucléaires sont éliminées par centrifugation (1 min à 15000 tours/min) et le surnageant correspondant au lysat protéique cellulaire est récupéré. Un dosage protéique est réalisé sur le lysat à l'aide du kit MicroBC Détection Protein Quantitation (Interchim). Un traitement à la protéinase K à dose adaptée est réalisé sur les échantillons pendant 30 min à 37°C, la PrPres est précipitée par centrifugation pendant 1h30 à 15000 tours/min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 20 μ L de tampon 4215 (4% de SDS, 2% de β -mercaptoéthanol, 1% de Tris-Glycine

pH 8,8 et 5% de sucrose en eau ultra pure MilliQ). Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min à 100°C.

Séparation et détection des protéines par Western Blot. Les protéines purifiées sont ensuite séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). 20 μ L de chaque échantillon et 4 μ L d'un marqueur coloré de poids moléculaire (Rainbow Marker Detection) sont déposés dans un gel de polyacrylamide à 12% où ils migrent pendant 1h30 à 150V. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue à 22V, sous agitation, pendant une nuit, dans du tampon de transfert Tris-CAPS (BioRad) supplémenté de 15% en éthanol absolu. Après transfert, les membranes de nitrocellulose sont saturées dans du Blocking Reagent (BioRad), 5% en PBST. Elles sont incubées 30min avec l'anticorps primaire B dilué au 1/5000. Après un rinçage rapide et 3 lavages de 5min, les membranes sont incubées pendant 20 min avec l'anticorps secondaire lapin anti-souris couplé peroxydase, dilué au 1/5000. Enfin, après un lavage rapide, deux lavages de 5 min et un lavage de 15 min, les membranes sont rincées dans du PBS, puis mises au contact d'ECL (Détection Pharmacia Biotech) permettant la révélation des protéines par émission d'un signal chimioluminescent sur Hyperfilm (Détection). Tous les lavages et toutes les dilutions se font en PBS 0,1% Tween 20 (PBST).

3.2 Détection de la PrP par ELISA (Sheep and Goat Detection Kit, BioRad)

Les cellules sont purifiées comme décrit précédemment et les culots sont repris dans 25 μ L de tampon C1. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min à 100°C. 125 μ L de tampon R6 sont ajoutés puis 100 μ L de chaque échantillon sont déposés dans une plaque 96 puits à fond plat pendant 75 min à 37°C. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon R2 au 1/10 à l'aide d'un laveur automatique (BioRad). 100 μ L de tampon R7 dilué au 1/10 dans le tampon R2 sont ensuite déposés dans chaque puits et incubés 60 min à 4°C. Les puits sont à nouveau rincés 5 fois comme précédemment décrit. 100 μ L de tampon R9 dilué au 1/11 dans du tampon R8 sont ensuite déposés dans chaque puits pendant 30 min à l'obscurité. La réaction est arrêtée par 100 μ L de tampon R10. L'acquisition des images se fait grâce à un lecteur de plaque (BioRad) à deux longueurs d'onde 450 et 620nm.

4 Biologie moléculaire

4.1 Détermination du niveau d'expression du gène de la PrP par RT-PCR

Lyse des cellules. Les cellules en culture sont trypsinées puis lavées en PBS. Elles sont centrifugées 5 min à 500g à 4°C, puis le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire (< 5.10⁶ Cellules) subit une lyse mécanique dans 350 μ L de tampon RLT (Qiagen) contenant 1% de β -mercaptoéthanol (Sigma) à l'aide d'une seringue sans volume mort (SubQ).

Extraction de l'ARN des cellules. 350 μ L d'éthanol 70% sont ajoutés, l'échantillon est déposé sur une colonne échangeuse d'anions, puis centrifugé 15s à 8000g. La colonne est lavée (350 μ L de tampon RW1 et centrifugation 15s à 8000g), puis traitée à la DNase (70 μ L de tampon RDD + 10 μ L de DNase) pendant 10 min. Après un lavage identique au précédent, la colonne est lavé deux fois avec 500 μ L de tampon RPE supplémenté en éthanol et centrifugé 15s à 8000g pour le premier lavage et 3 min à 21000g pour le second. L'ARN est ensuite élué avec 35 μ L d'eau RNase-free.

Synthèse de l'ADN complémentaire. La quantité d'ARN obtenue est évaluée par lecture de la densité optique à 260 nm et normalisée à 1 μ g pour chaque échantillon dans un volume final de 40 μ l. 20 μ l de la solution 1 (2,5 μ g d'Oligo dT, 15 μ g d'hexamères, 50nmol de dNTP, (Invitrogen)) sont ajoutés, puis l'échantillon est incubé 5min à 65°C. L'échantillon est ensuite immédiatement mis dans la glace. 35 μ L de la solution 2 (20 μ L de tampon 5x (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 12 mM MgCl₂) , 10 μ l de DTT 0,1M, 5 μ l d'un inhibiteur de RNase (RNase OUT, 40U/ μ L) (Invitrogen) sont ajoutés, puis l'échantillon est incubé 10min à 25°C. 1 μ l d'enzyme Reverse Transcriptase (SuperScriptII, Invitrogen 200U/ μ L) est ajouté, et l'échantillon est laissé 50min à 42°C, puis 15min à 70°C.

Amplification génique par PCR en temps réel. Les différents couples d'amorces ont été sélectionnés à l'aide du logiciel Beacon Designer :

Gène	Catégorie	Séquence 5'-3'
TFIID	Sens	TTGACCTAAAGACCATTTGCACTTC
	Antisens	CATGATGACTGCAGCAAATCG
PrP Ovine	Sens	ATGCTGAAGCTGAAACTCCAGTAC
	Antisens	AGTCCATGATGCCATCTAGCCAT
PrP Murine	Sens	GCTTGTTTCCTTCGCATTCTC
	Antisens	GGGTATTAGCCTATGGGGGA

Dans un mélange réactionnel de 25 μ L contenant 12,5 μ L de SuperMix (KCl 50mM, Tris-HCl 50mM pH 8,4 (BioRad), dNTP 8mM, iTaq DNA polymérase 50U/ml, MgCl₂ 3mM, SYBR Green I 10mM), 0,25 μ M d'amorce sens, 0,25 μ M d'amorce anti-sens et environ 10ng de cDNA, les échantillons subissent l'amplification par PCR à l'aide de l'appareil IQ Icycler Biorad conformément au programme suivant :

- (1) Dénaturation 1 min 30 à 95°C 1x
- (2) Dénaturation 15 sec à 95°C, Hybridation / Elongation 1 min à 60°C, 40x
- (3) Courbe de fusion 10 sec de 55°C à 95°C (incrémentations de 0,5°C à chaque cycle), 80x

Analyse en temps réel. Cette technique extrêmement sensible est basée sur la détection et la quantification de la fluorescence émise lors de l'incorporation de Syber-Green (intercalant fluorescent de l'ADN) entre les 2 brins d'ADN de chaque fragment nouvellement synthétisé. La mesure de fluorescence effectuée en temps réel à chaque cycle, permet i) d'établir la courbe

de fusion des différents fragments, ii) de déterminer l'efficacité des couples d'amorces pour l'amplification à l'aide d'une dilution série normalisée Détection, iii) de déterminer les variations d'expression des différentes cibles dans les différents échantillons par rapport au gène de référence commun (le TFIID, d'expression stable). La PCR est effectuée sur l'ensemble des échantillons en duplicat.

Les coefficients de variation Q_R de chaque cible sont calculés suivant la formule :

$$Q_R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

où $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Infecte} - \Delta CT_{Noninfect}$, $\Delta CT = CT_{Genecible} - CT_{TFIID}$ et CT le cycle pour lequel la fluorescence atteint un niveau donné.

Communication

Posters

Congrès NeuroPrion (2005, Düsseldorf)

- *New insight in prion pathogenesis : from theoretical model of neuropathogenesis to experimental evaluations*, **N. Lenuzza**, M. Charvériat, J.-G. Buon, C. Picoli, P.-H. Lampe, P. Santamaria, E. Correia, S. Freire, S. Benhamida, F. Iris, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

Journée des doctorants (2006, Fontenay-aux-Roses)

- *Etude de la dissémination des Prions à l'échelle cellulaire*, **N. Lenuzza**, F. Aubry, C. Picoli, V. Nouvel, M. Charvériat, S. Benhamida, F. Mouthon, P. Laurent, J.-P. Deslys.

Congrès NeuroPrion (2006, Turin)

- *A new assay in E. Coli to quantify the aggregation state of prion protein mutants*, M. Charvériat, C. Picoli, V. Nouvel, **N. Lenuzza**, F. Aubry, E. Correia, M. Reboul, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

- *Prnp Gene regulation during Prion infection and cell differentiation*, V. Nouvel, C. Picoli, **N. Lenuzza**, F. Aubry, M. Charvériat, E. Correia, M. Reboul, N. Guégan, Y. Bailly, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

- *Prion intercellular propagation : at the frontier of mathematical and biological approaches*, **N. Lenuzza**, F. Aubry, C. Picoli, V. Nouvel, M. Charvériat, E. Correia, M. Reboul, S. Fouliard, S. Benhamida, P. Laurent, C. Saguez, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

Journée des doctorants (2007, Fontenay-aux-Roses)

- *Etude des mécanismes de propagation des Prions à l'échelle de populations cellulaires*, **N. Lenuzza**, M. Eterpi, F. Aubry, C. Picoli, V. Nouvel, M. Charvériat, E. Correia, M. Reboul, P. Laurent, J.-P. Deslys, B. Perthame, D. Oelz, V. Calvez, F. Mouthon.

- *Recherche de nouvelles molécules anti-Prion et établissement de modèles cellulaires répliquant les Prions humains*, M. Charvériat, M. Reboul, **N. Lenuzza**, C. Picoli, V. Nouvel, F. Aubry, E. Correia, M. Eterpi, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

Congrès NeuroPrion (2007, Edinbourg)

- *A theoretical size-structured model of Prion replication*, **N. Lenuzza**, M. Eterpi, M. Charvériat, V. Calvez, D. Oelz, F. B. Perthame, P. Laurent, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

- *Attempts to develop cellular models infected by human Prions strains*, M. Charvériat, M. Reboul, **N. Lenuzza**, C. Picoli, V. Nouvel, F. Aubry, E. Correia, M. Eterpi, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

- *Investigating the relationship between cell and Prion*, V. Nouvel, C. Picoli, M. Bourai, F. Aubry, **N. Lenuzza**, M. Charvériat, E. Correia, M. Reboul, J.-P. Deslys, F. Mouthon.

Congrès NeuroPrion (2008, Madrid)

- *A theoretical size-structured model of Prion nucleated polymerization*, **N. Lenuzza**, V. Calvez, D. Oelz, M. Charvériat, P. Gabriel, J.-P. Deslys, P. Laurent, B. Perthame, F. Mouthon.

- *Evaluation of new anti-Prion chemical compounds*, M. Charvériat, M. Reboul, A. Montagnac, Q. Wang, C. Picoli, V. Nouvel, F. Aubry, **N. Lenuzza**, Z. Xu, E. Correia, F. Mouthon, F. Guéritte, J.-Y. Lallemand, J.-P. Deslys.

- *Prion infected cells sorting to develop robust cell models infectable by various prion strains*, F. Mouthon, F. Aubry, C. Picoli, E. Correia, J. Chapuis, M. Vassez, M. Reboul, V. Nouvel, **N. Lenuzza**, M. Charvériat, H. Laude, R. Hesp, J.-P. Deslys.

Communications orales

Congrès ECMTB (2008, Edimbourg)

Journée des Doctorants du CEA (2008, Fontenay-aux-Roses)

Articles

N. Lenuzza, V. Calvez, D. Oelz, J.-P. Deslys, P. Laurent, F. Mouthon et B. Perthame, *Size distribution dependence of prion aggregates infectivity*, Mathematical Biosciences. 217 (2009) 88-99.

N. Lenuzza, V. Calvez, M. Doumic, J.-P. Deslys, F. Mouthon et B. Perthame, *Prion dynamics with size dependency : strain phenomena*, accepté dans Journal of Biological Dynamics.

M. Charvériat, M. Reboul, Q. Wang, C. Picoli, **N. Lenuzza**, A. Montagnac, N. Nhiri, E. Jacquet, F. Guéritte, J.-Y. Lallemand, J.-P. Deslys et F. Mouthon, *New inhibitors of Prion replication that target amyloid precursor*, J Gen Virol. 90 (2009) 1294-301.

S. Fouliard, S. Benhamida, **N. Lenuzza** et F. Xavier, *Modeling and simulation of cell populations interaction*, Mathematical and Computer Modelling (2008).

Bibliographie

- [1] McIntyre, K. M., Gubbins, S., Goldmann, W., Hunter, N., and Baylis, M. *PLoS ONE* **3**(12), e3994 (2008).
- [2] Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. *Vet Rec* **121**(18), 419–420 Oct (1987).
- [3] Beghi, E., Gandolfo, C., Ferrarese, C., Rizzuto, N., Poli, G., Tonini, M. C., Vita, G., Leone, M., Logroscino, G., Granieri, E., Salemi, G., Savetieri, G., Frattola, L., Ru, G., Mancardi, G. L., and Messina, C. *Neurol Sci* **25**(3), 122–129 Jul (2004).
- [4] Wyatt, J. M., Pearson, G. R., Smerdon, T. N., Gruffydd-Jones, T. J., Wells, G. A., and Wilesmith, J. W. *Vet Rec* **129**(11), 233–236 Sep (1991).
- [5] Benbow, G. *Vet Rec* **135**(20), 488 Nov (1994).
- [6] Taylor, D. M. and Woodgate, S. L. *Rev Sci Tech* **16**(1), 187–198 Apr (1997).
- [7] Burger, D. and Hartsough, G. R. *J Infect Dis* **115**(4), 393–399 Oct (1965).
- [8] Williams, E. S. and Young, S. *J Wildl Dis* **16**(1), 89–98 Jan (1980).
- [9] Buschmann, A., Biacabe, A.-G., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J.-Y., Erhardt, G., Lühken, G., Baron, T., and Groschup, M. H. *J Virol Methods* **117**(1), 27–36 Apr (2004).
- [10] Buschmann, A., Gretzschel, A., Biacabe, A.-G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M., Baron, T., Casalone, C., and Groschup, M. H. *Vet Microbiol* **117**(2-4), 103–116 Oct (2006).
- [11] Wadsworth, J. D. F. and Collinge, J. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6), 598–609 Jun (2007).
- [12] Gajdusek, D. C. and Zigas, V. *N Engl J Med* **257**(20), 974–978 Nov (1957).
- [13] Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., and Gambetti, P. *N Engl J Med* **315**(16), 997–1003 Oct (1986).
- [14] Mastrianni, J. A., Nixon, R., Layzer, R., Telling, G. C., Han, D., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. *N Engl J Med* **340**(21), 1630–1638 May (1999).
- [15] Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P. G. *Lancet* **347**(9006), 921–925 Apr (1996).
- [16] Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alsheklee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M. A., Gonzalez-Romero, D., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Marder, K., Harris, C., Burke, J. R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D. W., Soto, C., Hulette, C. M., Mastrianni, J. A., Kong, Q., and Zou, W.-Q. *Ann Neurol* **63**(6), 697–708 Jun (2008).
- [17] Will, R. G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Mitrova, E., de Silva, R., D’Alessandro, M., Delasnerie-Laupretre, N., Zerr, I., and van Duijn, C. *Ann Neurol* **43**(6), 763–767 Jun (1998).
- [18] Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., and Chen, S. G. *Br Med Bull* **66**, 213–239 (2003).
- [19] Gambetti, P., Parchi, P., and Chen, S. G. *Clin Lab Med* **23**(1), 43–64 Mar (2003).
- [20] Cuillé, J. and Chelle, P.-L. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l’Académie des Sciences* **206**, 1687–1688 (1936).
- [21] Greig, J. R. *J Comp Pathol* **60**(4), 263–266 Oct (1950).
- [22] Beck, E., Daniel, P. M., Alpers, M., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J. *Lancet* **2**(7472), 1056–1059 Nov (1966).
- [23] Gibbs, C. J., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., and Matthews, W. B. *Science* **161**(839), 388–389 Jul (1968).
- [24] Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., and Hood, L. E. *Cell* **40**(4), 735–746 Apr (1985).
- [25] Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt,

- C., Lucero, M., and Mohandas, T. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(19), 7358–7362 Oct (1986).
- [26] Lee, I. Y., Westaway, D., Smit, A. F., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S. B., and Hood, L. E. *Genome Res* **8**(10), 1022–1037 Oct (1998).
- [27] Cabral, A. L. B., Lee, K. S., and Martins, V. R. *J Biol Chem* **277**(7), 5675–5682 Feb (2002).
- [28] Zawlik, I., Witusik, M., Hulas-Bigoszewska, K., Piaskowski, S., Szybka, M., Golanska, E., Liberski, P. P., and Rieske, P. *Neurosci Lett* **400**(1–2), 58–62 May (2006).
- [29] Saeki, K., Matsumoto, Y., Matsumoto, Y., and Onodera, T. *Biochem Biophys Res Commun* **219**(1), 47–52 Feb (1996).
- [30] Varela-Nallar, L., Toledo, E. M., Larrondo, L. F., Cabral, A. L. B., Martins, V. R., and Inestrosa, N. C. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(1), C271–C281 Jan (2006).
- [31] Haigh, C. L., Wright, J. A., and Brown, D. R. *J Mol Biol* **368**(4), 915–927 May (2007).
- [32] Goldmann, W., O’Neill, G., Cheung, F., Charleson, F., Ford, P., and Hunter, N. *J Gen Virol* **80** (Pt 8), 2275–2283 Aug (1999).
- [33] Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. *Annu Rev Pathol* **3**, 11–40 (2008).
- [34] Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. *Nature* **382**(6587), 180–182 Jul (1996).
- [35] James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19), 10086–10091 Sep (1997).
- [36] Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3), 640–645 Jan (2005).
- [37] Calzolari, L., Lysek, D. A., Pérez, D. R., Güntert, P., and Wüthrich, K. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3), 651–655 Jan (2005).
- [38] Ho, C.-C., Lee, L. Y.-L., Huang, K.-T., Lin, C.-C., Ku, M.-Y., Yang, C.-C., Chan, S. I., Hsu, R.-L., and Chen, R. P.-Y. *Proteins* Dec (2008).
- [39] Millhauser, G. L. *Annu Rev Phys Chem* **58**, 299–320 (2007).
- [40] Jansen, K., Schäfer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S. B., and Riesner, D. *Biol Chem* **382**(4), 683–691 Apr (2001).
- [41] Mangé, A. and Lehmann, S. *M/S* **18**, 1267–75 (2002).
- [42] Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. *Science* **279**(5352), 827–834 Feb (1998).
- [43] Ma, J. and Lindquist, S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26), 14955–14960 Dec (2001).
- [44] Campana, V., Sarnataro, D., and Zurzolo, C. *Trends Cell Biol* **15**(2), 102–111 Feb (2005).
- [45] Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. *Cell* **51**(2), 229–240 Oct (1987).
- [46] Wiseman, F., Cancellotti, E., and Manson, J. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5), 1094–1095 Nov (2005).
- [47] Cancellotti, E., Wiseman, F., Tuzi, N. L., Baybutt, H., Monaghan, P., Aitchison, L., Simpson, J., and Manson, J. C. *J Biol Chem* **280**(52), 42909–42918 Dec (2005).
- [48] Peters, P. J., Mironov, A., Peretz, D., van Donseelaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S. J., Burton, D. R., Williamson, R. A., Vey, M., and Prusiner, S. B. *J Cell Biol* **162**(4), 703–717 Aug (2003).
- [49] Harris, D. A. *Br Med Bull* **66**, 71–85 (2003).
- [50] Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M. W., and Morris, R. *EMBO J* **22**(14), 3591–3601 Jul (2003).
- [51] Kovács, G. G., Gelpi, E., Ströbel, T., Ricken, G., Nyengaard, J. R., Bernheimer, H., and Budka, H. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**(7), 628–636 Jul (2007).
- [52] Rongyan, Z., Xianglong, L., Lanhui, L., Xiangyun, L., and Fujun, F. *J Hered* **99**(6), 647–652 (2008).
- [53] Mallucci, G. R., Ratté, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G. R., and Collinge, J. *EMBO J* **21**(3), 202–210 Feb (2002).
- [54] Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. *Physiol Rev* **88**(2), 673–728 Apr (2008).
- [55] Wells, M. A., Jackson, G. S., Jones, S., Hosszu, L. L. P., Craven, C. J., Clarke, A. R., Collinge, J., and Waltho, J. P. *Biochem J* **399**(3), 435–444 Nov (2006).
- [56] Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J., and Jones, I. M. *Biochem J* **344** Pt 1, 1–5 Nov (1999).

- [57] Sakudo, A., chan Lee, D., Saeki, K., Nakamura, Y., Inoue, K., Matsumoto, Y., Itoharu, S., and Onodera, T. *Biochem Biophys Res Commun* **308**(3), 660–667 Aug (2003).
- [58] Brown, D. R., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. A. *J Neurochem* **70**(4), 1686–1693 Apr (1998).
- [59] Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. A. *Exp Neurol* **146**(1), 104–112 Jul (1997).
- [60] Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., and Kellermann, O. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23), 13326–13331 Nov (2003).
- [61] Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M., and Kellermann, O. *Science* **289**(5486), 1925–1928 Sep (2000).
- [62] Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Pradines, E., Pietri, M., Ermonval, M., Grassi, J., Richards, J. G., Mutel, V., Launay, J.-M., and Kellermann, O. *Ann N Y Acad Sci* **1096**, 106–119 Jan (2007).
- [63] Lopes, M. H., Hajj, G. N. M., Muras, A. G., Mancini, G. L., Castro, R. M. P. S., Ribeiro, K. C. B., Brentani, R. R., Linden, R., and Martins, V. R. *J Neurosci* **25**(49), 11330–11339 Dec (2005).
- [64] Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N. M., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R. O., Cabral, A. L. B., Lee, K. S., Juliano, M. A., de Oliveira, E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R. R., and Martins, V. R. *EMBO J* **21**(13), 3307–3316 Jul (2002).
- [65] Nieznanski, K., Podlubnaya, Z. A., and Nieznanska, H. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1), 391–399 Oct (2006).
- [66] Málaga-Trillo, E., Solis, G. P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., Thomanetz, V., and Stuermer, C. A. O. *PLoS Biol* **7**(3), e55 Mar (2009).
- [67] Mironov, A., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R. A., Burton, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Peters, P. J. *J Neurosci* **23**(18), 7183–7193 Aug (2003).
- [68] Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rüllicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., and Manson, J. C. *Nature* **380**(6575), 639–642 Apr (1996).
- [69] Colling, S. B., Khana, M., Collinge, J., and Jefferys, J. G. *Brain Res* **755**(1), 28–35 Apr (1997).
- [70] Paar, C., Wurm, S., Pfarr, W., Sonnleitner, A., and Wechselberger, C. *Eur J Cell Biol* **86**(5), 253–264 May (2007).
- [71] Ballerini, C., Gourdain, P., Bachy, V., Blanchard, N., Levavasseur, E., Grégoire, S., Fontes, P., Aucouturier, P., Hivroz, C., and Carnaud, C. *J Immunol* **176**(12), 7254–7262 Jun (2006).
- [72] Prusiner, S. B. *Science* **216**(4542), 136–144 Apr (1982).
- [73] Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., and Cohen, F. E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23), 10962–10966 Dec (1993).
- [74] Eghiaian, F., Grosclaude, J., Lesceu, S., Debey, P., Doublet, B., Tréguer, E., Rezaei, H., and Knossow, M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(28), 10254–10259 Jul (2004).
- [75] Sim, V. L. and Caughey, B. *Neurobiol Aging* Apr (2008).
- [76] DeMarco, M. L., Silveira, J., Caughey, B., and Daggett, V. *Biochemistry* **45**(51), 15573–15582 Dec (2006).
- [77] Dickinson, A. G., Meikle, V. M., and Fraser, H. *J Comp Pathol* **79**(1), 15–22 Jan (1969).
- [78] Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A., and Martinez, H. M. *Ann Neurol* **11**(4), 353–358 Apr (1982).
- [79] Hunter, G. D. *Biochem J* **114**(2), 22P–23P Sep (1969).
- [80] Dickinson, A. G. and Taylor, D. M. *N Engl J Med* **299**(25), 1413–1414 Dec (1978).
- [81] Brown, P., Rau, E. H., Johnson, B. K., Bacote, A. E., Gibbs, C. J., and Gajdusek, D. C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7), 3418–3421 Mar (2000).
- [82] Brown, P., Liberski, P. P., Wolff, A., and Gajdusek, D. C. *J Infect Dis* **161**(3), 467–472 Mar (1990).
- [83] Kimberlin, R. H., Walker, C. A., Millson, G. C., Taylor, D. M., Robertson, P. A., Tomlinson, A. H., and Dickinson, A. G. *J Neurol Sci* **59**(3), 355–369 Jun (1983).
- [84] Bellinger-Kawahara, C., Cleaver, J. E., Diener, T. O., and Prusiner, S. B. *J Virol* **61**(1), 159–166 Jan (1987).
- [85] Latarjet, R., Muel, B., Haig, D. A., Clarke, M. C., and Alper, T. *Nature* **227**(5265), 1341–1343 Sep (1970).
- [86] Gibbs, C. J., Gajdusek, D. C., and Latarjet, R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(12), 6268–6270 Dec (1978).
- [87] Spire, B., Dormont, D., Barré-Sinoussi, F., Montagnier, L., and Chermann, J. C. *Lancet* **1**(8422), 188–189 Jan (1985).

- [88] Brown, P., Rohwer, R. G., Green, E. M., and Gajdusek, D. C. *J Infect Dis* **145**(5), 683–687 May (1982).
- [89] Peretz, D., Supattapone, S., Giles, K., Vergara, J., Freyman, Y., Lessard, P., Safar, J. G., Glidden, D. V., McCulloch, C., Nguyen, H.-O. B., Scott, M., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. *J Virol* **80**(1), 322–331 Jan (2006).
- [90] Manuelidis, L. *J Neurovirol* **3**(1), 62–65 Feb (1997).
- [91] Brown, P., Rohwer, R. G., and Gajdusek, D. C. *J Infect Dis* **153**(6), 1145–1148 Jun (1986).
- [92] Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., and Raab, W. H.-M. *Brain Res Bull* **77**(6), 343–355 Dec (2008).
- [93] Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., and Clarke, M. C. *Nature* **214**(5090), 764–766 May (1967).
- [94] Griffith, J. S. *Nature* **215**(5105), 1043–1044 Sep (1967).
- [95] Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. *Cell* **73**(7), 1339–1347 Jul (1993).
- [96] Sailer, A., Büeler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. *Cell* **77**(7), 967–968 Jul (1994).
- [97] Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H.-O. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. *Science* **305**(5684), 673–676 Jul (2004).
- [98] Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6), 2168–2173 Feb (2005).
- [99] Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., and Caughey, B. *Nature* **370**(6489), 471–474 Aug (1994).
- [100] Wickner, R. B., Edskes, H. K., Shewmaker, F., and Nakayashiki, T. *Nat Rev Microbiol* **5**(8), 611–618 Aug (2007).
- [101] Patel, B. K. and Liebman, S. W. *J Mol Biol* **365**(3), 773–782 Jan (2007).
- [102] Manuelidis, L., Liu, Y., and Mullins, B. *J Cell Biochem* **106**(2), 220–231 Feb (2009).
- [103] Cobb, N. J. and Surewicz, W. K. *Nat Struct Mol Biol* **14**(10), 882–884 Oct (2007).
- [104] Morales, R., Abid, K., and Soto, C. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6), 681–691 Jun (2007).
- [105] Makarava, N. and Baskakov, I. V. *J Biol Chem* **283**(23), 15988–15996 Jun (2008).
- [106] Deleault, N. R., Lucassen, R. W., and Supattapone, S. *Nature* **425**(6959), 717–720 Oct (2003).
- [107] Sun, R., Liu, Y., Zhang, H., and Manuelidis, L. *Viral Immunol* **21**(3), 293–302 Sep (2008).
- [108] Manuelidis, L. and Fritch, W. *Virology* **216**(1), 46–59 Feb (1996).
- [109] Manuelidis, L., Sklaviadis, T., and Manuelidis, E. E. *EMBO J* **6**(2), 341–347 Feb (1987).
- [110] Weissmann, C. *Cell* **122**(2), 165–168 Jul (2005).
- [111] Barron, R. M., Campbell, S. L., King, D., Bellon, A., Chapman, K. E., Williamson, R. A., and Manson, J. C. *J Biol Chem* **282**(49), 35878–35886 Dec (2007).
- [112] Manuelidis, L., Yu, Z.-X., Barquero, N., Banquero, N., and Mullins, B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6), 1965–1970 Feb (2007).
- [113] Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzig, M. C., Radde, R., Staufenbiel, M., Lewis, J., Hutton, M., Tolnay, M., and Jucker, M. *Am J Pathol* **171**(6), 2012–2020 Dec (2007).
- [114] Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A. L., Vigouret, J.-M., Paganetti, P., Walsh, D. M., Mathews, P. M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L. C., and Jucker, M. *Science* **313**(5794), 1781–1784 Sep (2006).
- [115] Paravastu, A. K., Qahwash, I., Leapman, R. D., Meredith, S. C., and Tycko, R. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr (2009).
- [116] Ren, P.-H., Lauckner, J. E., Kachirskia, I., Heuser, J. E., Melki, R., and Kopito, R. R. *Nat Cell Biol* **11**(2), 219–225 Feb (2009).
- [117] Pattison, I. H. and Millson, G. C. *J Comp Pathol* **71**, 101–109 Apr (1961).
- [118] Collinge, J. and Clarke, A. R. *Science* **318**(5852), 930–936 Nov (2007).
- [119] Béringue, V., Vilotte, J.-L., and Laude, H. *Vet Res* **39**(4), 47 (2008).
- [120] Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. *Nat Med* **4**(10), 1157–1165 Oct (1998).
- [121] Peretz, D., Williamson, R. A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D. R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Scott, M. R. *Neuron* **34**(6), 921–932 Jun (2002).

- [122] Sigurdson, C. J., Nilsson, K. P. R., Hornemann, S., Manco, G., Polymenidou, M., Schwarz, P., Lelcerc, M., Hammarström, P., Wüthrich, K., and Aguzzi, A. *Nat Methods* **4**(12), 1023–1030 Dec (2007).
- [123] Mahal, S. P., Baker, C. A., Demczyk, C. A., Smith, E. W., Julius, C., and Weissmann, C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52), 20908–20913 Dec (2007).
- [124] Sigurdson, C. J., Manco, G., Schwarz, P., Liberski, P., Hoover, E. A., Hornemann, S., Polymenidou, M., Miller, M. W., Glatzel, M., and Aguzzi, A. *J Virol* **80**(24), 12303–12311 Dec (2006).
- [125] Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., and Carlson, G. A. *Cell* **63**(4), 673–686 Nov (1990).
- [126] Windl, O., Buchholz, M., Neubauer, A., Schulz-Schaeffer, W., Groschup, M., Walter, S., Arendt, S., Neumann, M., Voss, A. K., and Kretzschmar, H. A. *J Virol* **79**(23), 14971–14975 Dec (2005).
- [127] Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fiorito, F., and Wüthrich, K. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3), 646–650 Jan (2005).
- [128] Vilotte, J.-L. and Laude, H. *Transgenic Res* **11**(6), 547–564 Dec (2002).
- [129] Nonno, R., Bari, M. A. D., Cardone, F., Vaccari, G., Fazzi, P., Dell’Omo, G., Cartoni, C., Ingrosso, L., Boyle, A., Galeno, R., Sbriccoli, M., Lipp, H.-P., Bruce, M., Pocchiari, M., and Agrimi, U. *PLoS Pathog* **2**(2), e12 Feb (2006).
- [130] Smith, A. J., Bagg, J., Ironside, J. W., Will, R. G., and Scully, C. *J Dent Res* **82**(10), 769–775 Oct (2003).
- [131] Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Wrede, A., Wemheuer, W., Brenig, B., Kratzel, C., Lemmer, K., and Beekes, M. *PLoS Pathog* **3**(5), e66 May (2007).
- [132] Bosque, P. J., Ryou, C., Telling, G., Peretz, D., Legname, G., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6), 3812–3817 Mar (2002).
- [133] Andréoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnerieu, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eyche, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J.-M., and Schelcher, F. *J Gen Virol* **83**(Pt 10), 2607–2616 Oct (2002).
- [134] Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., Maestrale, C., Cancedda, M. G., Madau, L., and Aguzzi, A. *Nat Med* **11**(11), 1137–1138 Nov (2005).
- [135] Shaked, G. M., Shaked, Y., Kariv-Inbal, Z., Halimi, M., Avraham, I., and Gabizon, R. *J Biol Chem* **276**(34), 31479–31482 Aug (2001).
- [136] Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Leon, P., Morales, R., and Soto, C. *FEBS Lett* **582**(21–22), 3161–3166 Sep (2008).
- [137] Kariv-Inbal, Z., Ben-Hur, T., Grigoriadis, N. C., Engelstein, R., and Gabizon, R. *Neurodegener Dis* **3**(3), 123–128 (2006).
- [138] Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C., and Hoover, E. A. *Science* **314**(5796), 133–136 Oct (2006).
- [139] Gregori, L., Gray, B. N., Rose, E., Spinner, D. S., Kasczak, R. J., and Rohwer, R. G. *J Virol Methods* **149**(2), 251–259 May (2008).
- [140] Gregori, L., Gurgel, P. V., Lathrop, J. T., Edwardson, P., Lambert, B. C., Carbonell, R. G., Burton, S. J., Hammond, D. J., and Rohwer, R. G. *Lancet* **368**(9554), 2226–2230 Dec (2006).
- [141] Safar, J. G., Lessard, P., Tamgüney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. *J Infect Dis* **198**(1), 81–89 Jul (2008).
- [142] Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., and Simmons, H. A. *BMC Vet Res* **4**, 14 (2008).
- [143] Heikenwalder, M., Zeller, N., Seeger, H., Prinz, M., Klöhn, P.-C., Schwarz, P., Ruddle, N. H., Weissmann, C., and Aguzzi, A. *Science* **307**(5712), 1107–1110 Feb (2005).
- [144] Ligios, C., Cancedda, G. M., Margalith, I., Santucci, C., Madau, L., Maestrale, C., Basagni, M., Saba, M., and Heikenwalder, M. *PLoS ONE* **2**(9), e859 (2007).
- [145] Heikenwalder, M., Kurrer, M. O., Margalith, I., Kranich, J., Zeller, N., Haybaeck, J., Polymenidou, M., Matter, M., Bremer, J., Jackson, W. S., Lindquist, S., Sigurdson, C. J., and Aguzzi, A. *Immunity* **29**(6), 998–1008 Dec (2008).
- [146] Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F. L., Fu, Y.-X., Lipp, M., and Aguzzi, A. *Nature* **425**(6961), 957–962 Oct (2003).
- [147] Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbühl, J. P., and Aguzzi, A. *Nat Med* **7**(9), 976–977 Sep (2001).
- [148] Cordier-Dirikoc, S. and Chabry, J. *J Virol* **82**(17), 8933–8936 Sep (2008).

- [149] Carp, R. I. and Callahan, S. M. *Intervirology* **16**(1), 8–13 (1981).
- [150] Maignien, T., Shakweh, M., Calvo, P., Marcé, D., Salès, N., Fattal, E., Deslys, J.-P., Couvreur, P., and Lasmezas, C. I. *Int J Pharm* **298**(2), 293–304 Jul (2005).
- [151] Huang, F.-P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E., and MacPherson, G. G. *J Gen Virol* **83**(Pt 1), 267–271 Jan (2002).
- [152] Beekes, M. and McBride, P. A. *FEBS J* **274**(3), 588–605 Feb (2007).
- [153] Mabbott, N. A., Young, J., McConnell, I., and Bruce, M. E. *J Virol* **77**(12), 6845–6854 Jun (2003).
- [154] Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. *Nat Med* **4**(12), 1429–1433 Dec (1998).
- [155] Porto-Carreiro, I., Février, B., Paquet, S., Vilette, D., and Raposo, G. *Blood Cells Mol Dis* **35**(2), 143–148 (2005).
- [156] Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26), 9683–9688 Jun (2004).
- [157] Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwalder, M. *Annu Rev Pathol* Aug (2007).
- [158] Paquet, S., Langevin, C., Chapuis, J., Jackson, G. S., Laude, H., and Vilette, D. *J Gen Virol* **88**(Pt 2), 706–713 Feb (2007).
- [159] Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G. P., Meeker, H. C., Kascsak, R., Kascsak, R., Carp, R. I., and Wisniewski, T. *J Clin Invest* **108**(5), 703–708 Sep (2001).
- [160] Favereaux, A., Quadrio, I., Vital, C., Perret-Liaudet, A., Anne, O., Laplanche, J.-L., Petry, K. G., and Vital, A. *Arch Neurol* **61**(5), 747–750 May (2004).
- [161] Glatzel, M., Heppner, F. L., Albers, K. M., and Aguzzi, A. *Neuron* **31**(1), 25–34 Jul (2001).
- [162] Glatzel, M. and Aguzzi, A. *J Gen Virol* **81**(Pt 11), 2813–2821 Nov (2000).
- [163] Hafezparast, M., Brandner, S., Linehan, J., Martin, J. E., Collinge, J., and Fisher, E. M. C. *Biochem Biophys Res Commun* **326**(1), 18–22 Jan (2005).
- [164] Kratzel, C., Krüger, D., and Beekes, M. *J Gen Virol* **88**(Pt 12), 3479–3485 Dec (2007).
- [165] Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, S., Chauvin, J.-P., Decavel, J.-P., Varea, R., Grassi, J., Fontès, M., and Cesbron, J.-Y. *J Virol* **76**(5), 2434–2439 Mar (2002).
- [166] Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D. T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., Olivo-Marin, J.-C., Männel, D., and Zurzolo, C. *Nat Cell Biol* **11**(3), 328–336 Mar (2009).
- [167] Moore, R. A., Taubner, L. M., and Priola, S. A. *Curr Opin Struct Biol* **19**(1), 14–22 Feb (2009).
- [168] Ma, J. and Lindquist, S. *Science* **298**(5599), 1785–1788 Nov (2002).
- [169] Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S. B., and Avraham, D. *J Cell Biol* **129**(1), 121–132 Apr (1995).
- [170] Sanghera, N. and Pinheiro, T. J. T. *J Mol Biol* **315**(5), 1241–1256 Feb (2002).
- [171] Supattapone, S., Nishina, K., and Rees, J. R. *Biochem Pharmacol* **63**(8), 1383–1388 Apr (2002).
- [172] Prado, M. A. M., Alves-Silva, J., Magalhães, A. C., Prado, V. F., Linden, R., Martins, V. R., and Brentani, R. R. *J Neurochem* **88**(4), 769–781 Feb (2004).
- [173] Ivanova, L., Barmada, S., Kummer, T., and Harris, D. A. *J Biol Chem* **276**(45), 42409–42421 Nov (2001).
- [174] Béranger, F., Mangé, A., Goud, B., and Lehmann, S. *J Biol Chem* **277**(41), 38972–38977 Oct (2002).
- [175] Oh, J.-M., Shin, H.-Y., Park, S.-J., Kim, B.-H., Choi, J.-K., Choi, E.-K., Carp, R. I., and Kim, Y.-S. *Mol Cell Neurosci* **39**(2), 238–247 Oct (2008).
- [176] Baker, C. A., Lu, Z. Y., and Manuelidis, L. *J Neurovirol* **10**(1), 29–40 Feb (2004).
- [177] Mouillet-Richard, S., Nishida, N., Pradines, E., Laude, H., Schneider, B., Féraudet, C., Grassi, J., Launay, J.-M., Lehmann, S., and Kellermann, O. *J Biol Chem* **283**(35), 23782–23790 Aug (2008).
- [178] O'Donovan, C. N., Tobin, D., and Cotter, T. G. *J Biol Chem* **276**(47), 43516–43523 Nov (2001).
- [179] Novitskaya, V., Makarava, N., Sylvester, I., Bronstein, I. B., and Baskakov, I. V. *J Neurochem* **102**(2), 398–407 Jul (2007).
- [180] Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., and Oldstone, M. *Science* **308**(5727), 1435–1439 Jun (2005).

- [181] Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.-G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., Schätzl, H., and Lasmézas, C. I. *PLoS Pathog* **3**(8), e125 Aug (2007).
- [182] Westergard, L., Christensen, H. M., and Harris, D. A. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6), 629–644 Jun (2007).
- [183] Chakrabarti, O. and Hegde, R. S. *Cell* **137**(6), 1136–1147 Jun (2009).
- [184] Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., Rüllicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., and Weissmann, C. *Cell* **93**(2), 203–214 Apr (1998).
- [185] Riemer, C., Neidhold, S., Burwinkel, M., Schwarz, A., Schultz, J., Krätzschar, J., Mönning, U., and Baier, M. *Biochem Biophys Res Commun* **323**(2), 556–564 Oct (2004).
- [186] Xiang, W., Windl, O., Wünsch, G., Dugas, M., Kohlmann, A., Dierkes, N., Westner, I. M., and Kretzschmar, H. A. *J Virol* **78**(20), 11051–11060 Oct (2004).
- [187] Miele, G., Manson, J., and Clinton, M. *Nat Med* **7**(3), 361–364 Mar (2001).
- [188] Baker, C. A. and Manuelidis, L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2), 675–679 Jan (2003).
- [189] Greenwood, A. D., Horsch, M., Stengel, A., Vorberg, I., Lutzny, G., Maas, E., Schädler, S., Erfle, V., Beckers, J., Schätzl, H., and Leib-Mösch, C. *J Mol Biol* **349**(3), 487–500 Jun (2005).
- [190] Julius, C., Hutter, G., Wagner, U., Seeger, H., Kana, V., Kranich, J., Klöhn, P., Weissmann, C., Miele, G., and Aguzzi, A. *J Mol Biol* **375**(5), 1222–1233 Feb (2008).
- [191] Vorberg, I., Raines, A., and Priola, S. A. *J Biol Chem* **279**(28), 29218–29225 Jul (2004).
- [192] Aguib, Y., Gilch, S., Krammer, C., Ertmer, A., Groschup, M. H., and Schätzl, H. M. *Mol Cell Neurosci* **38**(1), 98–109 May (2008).
- [193] Griffin, J. K., Terry, L. A., Jackman, R., Yousefi, M., and Cashman, N. R. *Neuroreport* **18**(1), 1–6 Jan (2007).
- [194] Austbo, L., Espenes, A., Olsaker, I., Press, C. M., and Skretting, G. *J Gen Virol* **88**(Pt 7), 2083–2090 Jul (2007).
- [195] Raeber, A. J., Brandner, S., Klein, M. A., Benninger, Y., Musahl, C., Frigg, R., Roeckl, C., Fischer, M. B., Weissmann, C., and Aguzzi, A. *Brain Pathol* **8**(4), 715–733 Oct (1998).
- [196] Clawson, M. L., Heaton, M. P., Keele, J. W., Smith, T. P., Harhay, G. P., Richt, J. A., and Laegreid, W. W. *BMC Res Notes* **1**, 32 (2008).
- [197] Vilette, D. *Vet Res* **39**(4), 10 (2008).
- [198] Uryu, M., Karino, A., Kamihara, Y., and Horiuchi, M. *Microbiol Immunol* **51**(7), 661–669 (2007).
- [199] Weissmann, C. *Communication orale, Congrès Neuroprion Turin* (2006).
- [200] Eigen, M. *Biophys Chem* **63**(1), A1–18 Dec (1996).
- [201] Laurent, M. *Biochem J* **318** (Pt 1), 35–39 Aug (1996).
- [202] Tompa, P., Tusnády, G. E., Friedrich, P., and Simon, I. *Biophys J* **82**(4), 1711–1718 Apr (2002).
- [203] Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T. *Cell* **73**(6), 1055–1058 Jun (1993).
- [204] Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L., Arnsdorf, M. F., and Lindquist, S. L. *Science* **289**(5483), 1317–1321 Aug (2000).
- [205] Féraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Créminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., and Grassi, J. *J Biol Chem* **280**(12), 11247–11258 Mar (2005).
- [206] Liemann, S. and Glockshuber, R. *Biochemistry* **38**(11), 3258–3267 Mar (1999).
- [207] Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Suppattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., and Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6), 3563–3568 Mar (2002).
- [208] Morrissey, M. P. and Shakhnovich, E. I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20), 11293–11298 Sep (1999).
- [209] Petchanikow, C., Saborio, G. P., Anderes, L., Frossard, M. J., Olmedo, M. I., and Soto, C. *FEBS Lett* **509**(3), 451–456 Dec (2001).
- [210] Ross, E. D., Minton, A., and Wickner, R. B. *Nat Cell Biol* **7**(11), 1039–1044 Nov (2005).
- [211] Noinville, S., Chich, J.-F., and Rezaei, H. *Vet Res* **39**(4), 48 (2008).
- [212] Moore, R. A., Herzog, C., Errett, J., Kocisko, D. A., Arnold, K. M., Hayes, S. F., and Priola, S. A. *Protein Sci* **15**(3), 609–619 Mar (2006).
- [213] Breydo, L., Sun, Y., Makarava, N., Lee, C.-I., Novitskaia, V., Bocharova, O., Kao, J. P. Y., and Baskakov, I. V. *Biochemistry* **46**(3), 852–861 Jan (2007).
- [214] DeMarco, M. L. and Daggett, V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8), 2293–2298 Feb (2004).

- [215] Wegmann, S., Miesbauer, M., Winklhofer, K. F., Tatzelt, J., and Muller, D. J. *Pflugers Arch* **456**(1), 83–93 Apr (2008).
- [216] Morris, A. M., Watzky, M. A., and Finke, R. G. *Biochim Biophys Acta* Nov (2008).
- [217] Eghiaian, F., Daubenfeld, T., Quenet, Y., van Audenhaege, M., Bouin, A.-P., van der Rest, G., Grosclaude, J., and Rezaei, H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18), 7414–7419 May (2007).
- [218] Bagriantsev, S. N., Gracheva, E. O., Richmond, J. E., and Liebman, S. W. *Mol Biol Cell* **19**(6), 2433–2443 Jun (2008).
- [219] Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. *Nature* **437**(7056), 257–261 Sep (2005).
- [220] Sim, V. *Communication orale, Baden 2008*.
- [221] Beringue, V. *Congrès Neuroprion 2008 Madrid* (2008).
- [222] Soto, C. and Estrada, L. D. *Arch Neurol* **65**(2), 184–189 Feb (2008).
- [223] Lansbury, P. T. and Caughey, B. *Curr Biol* **6**(8), 914–916 Aug (1996).
- [224] Kazlauskaitė, J., Sanghera, N., Sylvester, I., Vénien-Bryan, C., and Pinheiro, T. J. T. *Biochemistry* **42**(11), 3295–3304 Mar (2003).
- [225] Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., and Silva, J. L. *J Biol Chem* **276**(52), 49400–49409 Dec (2001).
- [226] Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R., and Supattapone, S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23), 9741–9746 Jun (2007).
- [227] Pushie, M. J., Rauk, A., Jirik, F. R., and Vogel, H. J. *Biometals* **22**(1), 159–175 Feb (2009).
- [228] Li Liu, M., Xing Li, Y., Mei Zhou, X., and Ming Zhao, D. *J Biochem* **143**(3), 333–337 Mar (2008).
- [229] Yu, S., Yin, S., Pham, N., Wong, P., Kang, S.-C., Petersen, R. B., Li, C., and Sy, M.-S. *FEBS J* **275**(22), 5564–5575 Nov (2008).
- [230] Adjou, K. T., Simoneau, S., Salès, N., Lamoury, F., Dormont, D., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Deslys, J.-P., and Lasmézas, C. I. *J Gen Virol* **84**(Pt 9), 2595–2603 Sep (2003).
- [231] DeBorja, S. K., Raymond, G. J., Caughey, B., and Lindquist, S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13938–13943 Dec (1997).
- [232] Caughey, B. and Baron, G. S. *Nature* **443**(7113), 803–810 Oct (2006).
- [233] Mishra, R. S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W.-Q., Mishra, R., Li, R., Chen, S. G., Gambetti, P., Fujioka, H., and Singh, N. *J Neurosci* **24**(50), 11280–11290 Dec (2004).
- [234] Mabbott, N. A. and MacPherson, G. G. *Nat Rev Microbiol* **4**(3), 201–211 Mar (2006).
- [235] Salmona, M., Capobianco, R., Colombo, L., Luigi, A. D., Rossi, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Quaglio, E., Chiesa, R., Donati, M. B., Tagliavini, F., and Forloni, G. *J Virol* **79**(17), 11225–11230 Sep (2005).
- [236] Pattison, I. H. and Jones, K. M. *Vet Rec* **80**(1), 2–9 Jan (1967).
- [237] Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. *Biochemistry* **23**(25), 5898–5906 Dec (1984).
- [238] Ward, H. J. T., Cousens, S. N., Smith-Bathgate, B., Leitch, M., Everington, D., Will, R. G., and Smith, P. G. *BMJ* **329**(7460), 277–279 Jul (2004).
- [239] Laude, H. and Beringue, V. *Pathol Biol (Paris)* Oct (2008).
- [240] Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R., and Wells, G. A. *Nature* **382**(6594), 779–788 Aug (1996).
- [241] Valleron, A. J. *C R Acad Sci III* **323**(5), 429–433 May (2000).
- [242] Cousens, S. N., Vynnycky, E., Zeidler, M., Will, R. G., and Smith, P. G. *Nature* **385**(6613), 197–198 Jan (1997).
- [243] Ghani, A. C., Ferguson, N. M., Donnelly, C. A., and Anderson, R. M. *Nature* **406**(6796), 583–584 Aug (2000).
- [244] Valleron, A. J., Boelle, P. Y., Will, R., and Cesbron, J. Y. *Science* **294**(5547), 1726–1728 Nov (2001).
- [245] d’Aignaux, J. N., Cousens, S. N., and Smith, P. G. *Science* **294**(5547), 1729–1731 Nov (2001).
- [246] Alperovitch, A. and d’Aignaux, J. H. *Médecine/Sciences* **18**, 1081–1088 (2002).
- [247] Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., and Anderson, R. M. *BMC Infect Dis* **3**, 4 Apr (2003).
- [248] Boëlle, P.-Y., Cesbron, J.-Y., and Valleron, A.-J. *BMC Infect Dis* **4**, 26 Aug (2004).

- [249] Valleron, A. J., Boelle, P. Y., Chatignoux, E., and Cesbron, J. Y. *Rev Epidemiol Sante Publique* **54**(2), 111–115 Apr (2006).
- [250] Ferguson, N. M., Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Hagensars, T. J., and Anderson, R. M. *Nature* **415**(6870), 420–424 Jan (2002).
- [251] Yves Boëlle, P., Thomas, G., Valleron, A.-J., Cesbron, J.-Y., and Will, R. *Stat Methods Med Res* **12**(3), 221–233 Jun (2003).
- [252] Clarke, P., Will, R. G., and Ghani, A. C. *J R Soc Interface* **4**(15), 675–684 Aug (2007).
- [253] Garske, T., Ward, H. J. T., Clarke, P., Will, R. G., and Ghani, A. C. *J R Soc Interface* **3**(11), 757–766 Dec (2006).
- [254] Clarke, P. and Ghani, A. C. *J R Soc Interface* **2**(2), 19–31 Mar (2005).
- [255] Bourvis, N., Boelle, P.-Y., Cesbron, J.-Y., and Valleron, A.-J. *PLoS ONE* **2**(12), e1330 (2007).
- [256] Lawson, V. A. *Methods Mol Biol* **459**, 97–103 (2008).
- [257] Akimov, S., Yakovleva, O., Vasilyeva, I., McKenzie, C., and Cervenakova, L. *J Virol* **82**(21), 10959–10962 Nov (2008).
- [258] Mays, C. E., Kang, H.-E., Kim, Y., Shim, S. H., Bang, J.-E., Woo, H.-J., Cho, Y.-H., Kim, J.-B., and Ryou, C. *Brain Res* **1208**, 170–180 May (2008).
- [259] Takakura, Y., Yamaguchi, N., Nakagaki, T., Satoh, K., Ichi Kira, J., and Nishida, N. *Biochem Biophys Res Commun* **377**(3), 957–961 Dec (2008).
- [260] Mouillet-Richard, S., Laurendeau, I., Vidaud, M., Kellermann, O., and Laplanche, J. L. *Microbes Infect* **1**(12), 969–976 Oct (1999).
- [261] Clarke, M. C. and Haig, D. A. *Nature* **225**(5227), 100–101 Jan (1970).
- [262] Raymond, G. J., Olsen, E. A., Lee, K. S., Raymond, L. D., Bryant, P. K., Baron, G. S., Caughey, W. S., Kocisko, D. A., McHolland, L. E., Favara, C., Langeveld, J. P. M., van Zijderveld, F. G., Mayer, R. T., Miller, M. W., Williams, E. S., and Caughey, B. *J Virol* **80**(2), 596–604 Jan (2006).
- [263] Vorberg, I., Raines, A., Story, B., and Priola, S. A. *J Infect Dis* **189**(3), 431–439 Feb (2004).
- [264] Dlakic, W. M., Grigg, E., and Bessen, R. A. *J Virol* **81**(9), 4615–4624 May (2007).
- [265] Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Ogihara, K., Hoshino, M., Takata, M., Imamura, M., Tagawa, Y., Hayashi-Kato, H., Ushiki-Kaku, Y., Shimizu, Y., Okada, H., Shinagawa, M., Kitani, H., and Yokoyama, T. *J Virol* **81**(3), 1524–1527 Feb (2007).
- [266] Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S., and Laude, H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7), 4055–4059 Mar (2001).
- [267] Taraboulos, A., Serban, D., and Prusiner, S. B. *J Cell Biol* **110**(6), 2117–2132 Jun (1990).
- [268] Lawson, V. A., Vella, L. J., Stewart, J. D., Sharples, R. A., Klemm, H., Machalek, D. M., Masters, C. L., Cappai, R., Collins, S. J., and Hill, A. F. *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12), 2793–2801 (2008).
- [269] Courageot, M.-P., Daude, N., Nonno, R., Paquet, S., Bari, M. A. D., Dur, A. L., Chapuis, J., Hill, A. F., Agrimi, U., Laude, H., and Vilette, D. *J Gen Virol* **89**(Pt 1), 341–347 Jan (2008).
- [270] Arima, K., Nishida, N., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Atarashi, R., Yamaguchi, N., Yoshikawa, D., Yoon, J., Watanabe, K., Kobayashi, N., Mouillet-Richard, S., Lehmann, S., and Katamine, S. *J Virol* **79**(11), 7104–7112 Jun (2005).
- [271] Charvériat, M., Reboul, M., Wang, Q., Picoli, C., Lenuzza, N., Montagnac, A., Nhiri, N., Jaquet, E., Guéritte, F., Lallemand, J.-Y., Deslys, J.-P., and Mouthon, F. *J Gen Virol* Mar (2009).
- [272] Asante, E. A., Gowland, I., Grimshaw, A., Linehan, J. M., Smidak, M., Houghton, R., Osiguwa, O., Tomlinson, A., Joiner, S., Brandner, S., Wadsworth, J. D. F., and Collinge, J. *J Gen Virol* **90**(Pt 3), 546–558 Mar (2009).
- [273] Groschup, M. H. and Buschmann, A. *Vet Res* **39**(4), 32 (2008).
- [274] Matthäus, F. *J Theor Biol* **240**(1), 104–113 May (2006).
- [275] Payne, R. J. and Krakauer, D. C. *J Theor Biol* **191**(4), 345–352 Apr (1998).
- [276] Stumpf, M. P. and Krakauer, D. C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19), 10573–10577 Sep (2000).
- [277] Payne, R. J. and Krakauer, D. C. *Proc Biol Sci* **265**(1412), 2341–2346 Dec (1998).
- [278] Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, G. J., Chesebro, B., Lansbury, P. T., and Caughey, B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9), 3923–3927 Apr (1995).
- [279] Kurt, T. D., Perrott, M. R., Wilusz, C. J., Wilusz, J., Supattapone, S., Telling, G. C., Zabel, M. D., and Hoover, E. A. *J Virol* **81**(17), 9605–9608 Sep (2007).
- [280] Thorne, L. and Terry, L. A. *J Gen Virol* **89**(Pt 12), 3177–3184 Dec (2008).

- [281] Zhang, W., Wu, J., Li, Y., Carke, R. C., and Wong, T. *Transfus Med Rev* **22**(3), 234–242 Jul (2008).
- [282] Castilla, J., Gonzalez-Romero, D., Saá, P., Morales, R., Castro, J. D., and Soto, C. *Cell* **134**(5), 757–768 Sep (2008).
- [283] Shi, S., Dong, C.-F., Tian, C., Zhou, R.-M., Xu, K., Zhang, B.-Y., Gao, C., Han, J., and Dong, X.-P. *FEBS J* **276**(6), 1536–1545 Mar (2009).
- [284] Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., Johnson, L. M., Onwubiko, H. A., Priola, S. A., and Caughey, B. *Nat Methods* **5**(3), 211–212 Mar (2008).
- [285] Malolepsza, E. B. *Methods Mol Biol* **443**, 297–330 (2008).
- [286] Harrison, P. M., Chan, H. S., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. *Protein Sci* **10**(4), 819–835 Apr (2001).
- [287] Chen, J. Z. Y., Lemak, A. S., Lepock, J. R., and Kemp, J. P. *Proteins* **51**(2), 283–288 May (2003).
- [288] Dima, R. I. and Thirumalai, D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43), 15335–15340 Oct (2004).
- [289] Blinov, N., Berjanskii, M., Wishart, D. S., and Stepanova, M. *Biochemistry* **48**(7), 1488–1497 Feb (2009).
- [290] Malolepsza, E., Boniecki, M., Kolinski, A., and Piela, L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22), 7835–7840 May (2005).
- [291] Kazmirski, S. L., Alonso, D. O., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., and Daggett, V. *Chem Biol* **2**(5), 305–315 May (1995).
- [292] Zuegg, J. and Gready, J. E. *Glycobiology* **10**(10), 959–974 Oct (2000).
- [293] DeMarco, M. L. and Daggett, V. *Biochemistry* **46**(11), 3045–3054 Mar (2007).
- [294] DeMarco, M. L. and Daggett, V. *C R Biol* **328**(10-11), 847–862 (2005).
- [295] Come, J. H., Fraser, P. E., and Lansbury, P. T. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13), 5959–5963 Jul (1993).
- [296] Hall, D. and Edskes, H. *J Mol Biol* **336**(3), 775–786 Feb (2004).
- [297] Kulkarni, R. V., Slepoy, A., Singh, R. R. P., Cox, D. L., and Pázmándi, F. *Biophys J* **85**(2), 707–718 Aug (2003).
- [298] Laurent, M. *Biophys Chem* **72**(1-2), 211–222 May (1998).
- [299] Masel, J., Jansen, V. A., and Nowak, M. A. *Bio-phys Chem* **77**(2-3), 139–152 Mar (1999).
- [300] Mobley, D. L., Cox, D. L., Singh, R. R. P., Kulkarni, R. V., and Slepoy, A. *Biophys J* **85**(4), 2213–2223 Oct (2003).
- [301] Pöschel, T., Brilliantov, N. V., and Frömmel, C. *Biophys J* **85**(6), 3460–3474 Dec (2003).
- [302] Slepoy, A., Singh, R. R., Pázmándi, F., Kulkarni, R. V., and Cox, D. L. *Phys Rev Lett* **87**(5), 058101 Jul (2001).
- [303] Collins, S. R., Douglass, A., Vale, R. D., and Weissman, J. S. *PLoS Biol* **2**(10), e321 Oct (2004).
- [304] Nowak, M., Krakauer, D., Klug, A., and May, R. *Integrative biology*, 3–13 (1998).
- [305] Greer, M. L., Pujo-Menjouet, L., and Webb, G. F. *J Theor Biol* **242**(3), 598–606 Oct (2006).
- [306] Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. *J Neurochem* **101**(5), 1172–1184 Jun (2007).
- [307] Roberts, C. J. *Biotechnol Bioeng* **98**(5), 927–938 Dec (2007).
- [308] Galdino, M., de Albuquerque, S., Ferreira, A., Cressoni, J., and dos Santos, R. *Physica A* **295**, 58–63 (2001).
- [309] Ferreira, A., da Silva, M., and Cressoni, J. *Phys Rev Lett* **90** (2003).
- [310] Horton, R., Moran, L., Ochs, R., Rawn, D., and Scrimgeour, G. *Principe de biochimie*. (1994).
- [311] Laurent, M. *FEBS Lett* **407**(1), 1–6 Apr (1997).
- [312] Laurent, M. *Médecine/Sciences* **12**, 774–785 (1996).
- [313] Kacser, H. and Small, J. R. *J Theor Biol* **182**(3), 209–218 Oct (1996).
- [314] Kellershohn, N. and Laurent, M. *Biophys J* **81**(5), 2517–2529 Nov (2001).
- [315] Kellershohn, N. and Laurent, M. *Biochem J* **334** (Pt 3), 539–545 Sep (1998).
- [316] Masel, J., Genoud, N., and Aguzzi, A. *J Mol Biol* **345**(5), 1243–1251 Feb (2005).
- [317] Watzky, M. A., Finney, E. E., and Finke, R. G. *J Am Chem Soc* **130**(36), 11959–11969 Sep (2008).
- [318] Morris, A. M., Watzky, M. A., Agar, J. N., and Finke, R. G. *Biochemistry* **47**(8), 2413–2427 Feb (2008).
- [319] Watzky, M. A., Morris, A. M., Ross, E. D., and Finke, R. G. *Biochemistry* **47**(40), 10790–10800 Oct (2008).
- [320] Castilla, J., Saá, P., Morales, R., Abid, K., Maundrell, K., and Soto, C. *Methods Enzymol* **412**, 3–21 (2006).

- [321] Shorter, J. and Lindquist, S. *Mol Cell* **23**(3), 425–438 Aug (2006).
- [322] Masel, J. and Jansen, V. A. *Proc Biol Sci* **266**(1431), 1927–1931 Sep (1999).
- [323] Moustaine, D. E., Perrier, V., Smeller, L., Lange, R., and Torrent, J. *FEBS J* **275**(9), 2021–2031 May (2008).
- [324] Weber, P., Reznicek, L., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., and Giese, A. *Biochem Biophys Res Commun* **369**(3), 924–928 May (2008).
- [325] Clairambault, J. *Adv Drug Deliv Rev* **59**(9-10), 1054–1068 Aug (2007).
- [326] Masel, J. and Jansen, V. A. *Biophys Chem* **88**(1-3), 47–59 Dec (2000).
- [327] Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klöhn, P.-C., Brandner, S., and Collinge, J. *Science* **302**(5646), 871–874 Oct (2003).
- [328] White, M. D., Farmer, M., Mirabile, I., Brandner, S., Collinge, J., and Mallucci, G. R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29), 10238–10243 Jul (2008).
- [329] Shyng, S. L., Lehmann, S., Moulder, K. L., and Harris, D. A. *J Biol Chem* **270**(50), 30221–30229 Dec (1995).
- [330] Gilch, S., Winklhofer, K. F., Groschup, M. H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J., and Schätzl, H. M. *EMBO J* **20**(15), 3957–3966 Aug (2001).
- [331] Mangé, A., Nishida, N., Milhavet, O., McMahon, H. E., Casanova, D., and Lehmann, S. *J Virol* **74**(7), 3135–3140 Apr (2000).
- [332] Mok, S. W. F., Thelen, K. M., Riemer, C., Bamme, T., Gültner, S., Lütjohann, D., and Baier, M. *Biochem Biophys Res Commun* **348**(2), 697–702 Sep (2006).
- [333] Gilch, S., Kehler, C., and Schätzl, H. M. *Mol Cell Neurosci* **31**(2), 346–353 Feb (2006).
- [334] Iwamaru, Y., Shimizu, Y., Imamura, M., Murayama, Y., Endo, R., Tagawa, Y., Ushiki-Kaku, Y., Takenouchi, T., Kitani, H., Mohri, S., Yokoyama, T., and Okada, H. *J Neurochem* **107**(3), 636–646 Nov (2008).
- [335] Rudyk, H., Knaggs, M. H., Vasiljevic, S., Hope, J., Birkett, C., and Gilbert, I. H. *Eur J Med Chem* **38**(6), 567–579 Jun (2003).
- [336] Rudyk, H., Vasiljevic, S., Hennion, R. M., Birkett, C. R., Hope, J., and Gilbert, I. H. *J Gen Virol* **81**(Pt 4), 1155–1164 Apr (2000).
- [337] Shaked, G. M., Engelstein, R., Avraham, I., Kahana, E., and Gabizon, R. *Brain Res* **983**(1-2), 137–143 Sep (2003).
- [338] Tatzelt, J., Prusiner, S. B., and Welch, W. J. *EMBO J* **15**(23), 6363–6373 Dec (1996).
- [339] Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castaño, E. M., and Frangione, B. *Nat Med* **4**(7), 822–826 Jul (1998).
- [340] Perrier, V., Wallace, A. C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11), 6073–6078 May (2000).
- [341] Wong, C., Xiong, L. W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., and Caughey, B. *EMBO J* **20**(3), 377–386 Feb (2001).
- [342] Trevitt, C. R. and Collinge, J. *Brain* **129**(Pt 9), 2241–2265 Sep (2006).
- [343] Rubenstein, R., Gray, P. C., Cleland, T. J., Piltch, M. S., Hlavacek, W. S., Roberts, R. M., Ambrosiano, J., and Kim, J.-I. *Biophys Chem* **125**(2-3), 360–367 Feb (2007).
- [344] Germain, D. *Mol Microbiol* **70**(6), 1334–1341 Dec (2008).
- [345] Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. F., Kenaga, L., and Prusiner, S. B. *J Biol Chem* **263**(10), 4950–4955 Apr (1988).
- [346] Gabizon, R., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(12), 4017–4021 Jun (1987).
- [347] McKinley, M. P., Braunfeld, M. B., Bellinger, C. G., and Prusiner, S. B. *J Infect Dis* **154**(1), 110–120 Jul (1986).
- [348] Masel, J. and Jansen, V. A. *Biochim Biophys Acta* **1535**(2), 164–173 Feb (2001).
- [349] Porcher, E. and Gatto, M. *J Theor Biol* **205**(2), 283–296 Jul (2000).
- [350] Oosawa, F. and Kasai, M. *J Mol Biol* **4**, 10–21 Jan (1962).
- [351] Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., and Lansbury, P. T. *Chem Biol* **2**(12), 807–817 Dec (1995).
- [352] Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Bruce, M. E., McBride, P. A., and Fraser, J. R. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**(2), 93–101 Apr (1997).
- [353] Snow, A. D., Wight, T. N., Nochlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. *Lab Invest* **63**(5), 601–611 Nov (1990).
- [354] Beaudoin, S., Goggin, K., Bissonnette, C., Grenier, C., and Roucou, X. *BMC Cell Biol* **9**, 59 (2008).

- [355] Smoluchowski, M. *Physik Zeitschr* **17**, 557–599 (1916).
- [356] Simons, S. and Simpson, D. *J Phys A* **21**, 3523–3536 (1988).
- [357] Menci, N., Cavaliere, A., Fontana, A., Giallongo, E., and Poli, F. *The Astrophysical Journal* **575**, 18–32 (2002).
- [358] Perelson, A. and Samsel, R. *Kinetics of red blood cell aggregation : an example of geometric, in Kinetics of aggregation and Gelation*. Elsevier, (1984).
- [359] Perthame, B. *Transport equations in biology : frontiers in mathematics*. Birkhäuser Basel, (2007).
- [360] Escobedo, M., Laurençot, P., and Mischler, S. *Commun. Partial Differ. Equat.* **28**, 1113–(2003).
- [361] Escobedo, M., Michler, S., and Ricard, M. R. *Ann Inst H Poincaré Anal Non-linéaire* **2005**, 99– (2005).
- [362] Michel, P. *Math Models Methods Appl Sci* **16**, 1125– (2006).
- [363] Michel, P., Mischler, S., and Perthame, B. *J Math Pure Appl* **84**, 1235– (2005).
- [364] Prüss, J., Pujó-Menjouet, L., Webb, G., and Zacher, R. *Discrete and continuous dynamical systems - Series B* **6**, 225–234 (2006).
- [365] Engler, H., Prüss, J., and Webb, G. *J. Math. Anal. Appl.* **324**, 98–117 (2006).
- [366] Kumar, R. and Murali, P. *Math Biosci* **213**(1), 50–55 May (2008).
- [367] Greer, M., van den Driessche, P., Wang, L., and Webb, G. *SIAM J Appl Math Biosci* **68**, 154–170 (2007).
- [368] Simonett, G. and Walker, C. *J. Math. Anal. Appl.* **324**, 580–603 (2006).
- [369] Laurençot, P. and Walker, C. *J evol Equ* **7**, 241–264 (2007).
- [370] Walker, C. *Electronic journal of Differential equation Conference* **15**, 387–397 (2007).
- [371] Laurençot, P. and Mischler, S. *Proc Roy Soc Edinburgh Sect A* **132**, 99– (2002).
- [372] Doumic, M., Perthame, B., and Zubelli, J. *Inverse Problems* **25** (2009).
- [373] Horn, R. and Johnson, C. *Matrix Analysis*. (1990).
- [374] Puchalla, J., Krantz, K., Austin, R., and Rye, H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38), 14400–14405 Sep (2008).
- [375] Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Peretz, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50), 19105–19110 Dec (2006).
- [376] Antoulas, A. C., Sorensen, D. C., and Gugercin, S. *Contemporary Mathematics, AMS Publications* **280**, 193–219 (2001).
- [377] Bergmann, M. Master’s thesis, Institut national polytechnique de Lorraine, (2004).
- [378] Saltelli, A., Ratto, M., Andres, T., Campolongo, F., and Tarantola, S. *Global sensitivity analysis*. Wiley, (2008).
- [379] Alonso, A., Banga, J., Kevrekidis, Y., and Frouzakis, C. *Computers & Chemical Engineering* **28**, 27–35 (2004).
- [380] Zhang, Y., Henson, M., and Kevrekidis, Y. *Chemical Engineering Science* **58**, 429–445 (2004).
- [381] Crauste, F. *Etude mathématique d’équations aux dérivées partielles hyperboliques modélisant les processus de régulation des cellules sanguines - Applications aux maladies hématologiques cycliques*. PhD thesis, Université de Pau et des Pays de l’Adour, (2005).
- [382] Beauchemin, C. *J Theor Biol* **242**(2), 464–477 Sep (2006).
- [383] Amblard, F. *Comprendre le fonctionnement de simulations sociales individus-centrées : Application à des modèles de dynamiques d’opinions*. PhD thesis, Université Blaise Pascal-Clermont II, (2003).
- [384] Orcutt, G. *Review of Economics and Statistics* **58**, 773–797 (1957).
- [385] Artzrouni, M. *Eur J Epidemiol* **19**(2), 171–179 (2004).
- [386] Artzrouni, M. and Gouteux, J. P. *IMA J Math Appl Med Biol* **18**(2), 99–117 Jun (2001).
- [387] von Neumann, J. *Theory of Self-Reproducing Automata*. University of Illinois Press, (1966).
- [388] Wolfram, S. *Nature* **311**, 419–424 (1984).
- [389] Broderick, G., Ru’aini, M., Chan, E., and Ellison, M. J. *In Silico Biol* **5**(2), 163–178 (2005).
- [390] Morita, K. *Theoretical Computer Science* **395**, 101–131 (2008).
- [391] Schönfisch, B. and de Roos, A. *Biosystems* **51**(3), 123–143 Sep (1999).
- [392] Zhu, H., Pang, P. Y. H., Sun, Y., and Dhar, P. *BMC Bioinformatics* **5**, 85 Jun (2004).
- [393] Gerlee, P. and Anderson, A. R. A. *J Theor Biol* **250**(4), 705–722 Feb (2008).

- [394] Conte, R. and Castelfranchi, C. *Ai and Society* **6**, 78–93 (1992).
- [395] .
- [396] Walker, D. C., Southgate, J., Hill, G., Holcombe, M., Hose, D. R., Wood, S. M., Neil, S. M., and Smallwood, R. H. *Biosystems* **76**(1-3), 89–100 (2004).
- [397] Breckling, B. *ScientificWorldJournal* **2**, 1044–1062 Apr (2002).
- [398] Zhang, L., Wang, Z., Sagotsky, J. A., and Deisboeck, T. S. *J Math Biol* **58**(4-5), 545–559 Apr (2009).
- [399] Chavali, A. K., Gianchandani, E. P., Tung, K. S., Lawrence, M. B., Peirce, S. M., and Papin, J. A. *Trends Immunol* **29**(12), 589–599 Dec (2008).
- [400] Bauer, A., Beauchemin, C., and Perelson, A. *Information Science* **179**, 1379–1389 (2009).
- [401] Louzoun, Y., Atlan, H., and Cohen, I. R. *J Autoimmun* **17**(4), 311–321 Dec (2001).
- [402] Funk, G. A., Jansen, V. A. A., Bonhoeffer, S., and Killingback, T. *J Theor Biol* **233**(2), 221–236 Mar (2005).
- [403] Beauchemin, C., Samuel, J., and Tuszynski, J. *J Theor Biol* **232**(2), 223–234 Jan (2005).
- [404] Düchting, W. and Vogelsaenger, T. *J Cancer Res Clin Oncol* **105**(1), 1–12 (1983).
- [405] Ollinger, N. *Automates Cellulaires : structures*. PhD thesis, Ecole Normale Supérieure de Lyon, (2002).
- [406] Jolicoeur. *USA : State University of New York at Binghamton* (2002).
- [407] Turanyi, T. *Journal of Mathematical Chemistry* **5**, 203–248 (1990).
- [408] Ghaemmaghami, S., Phuan, P.-W., Perkins, B., Ullman, J., May, B. C. H., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46), 17971–17976 Nov (2007).
- [409] Baron, G. S., Magalhães, A. C., Prado, M. A. M., and Caughey, B. *J Virol* **80**(5), 2106–2117 Mar (2006).
- [410] Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klöhn, P.-C., Brandner, S., Wadsworth, J. D. F., Collinge, J., and Tabrizi, S. J. *J Biol Chem* **280**(46), 38851–38861 Nov (2005).
- [411] Gordon, S. *J Cell Biol* **67**(2PT.1), 257–280 Nov (1975).
- [412] Calvez, V., Lenuzza, N., Oelz, D., Deslys, J.-P., Laurent, P., Mouthon, F., and Perthame, B. *Math Biosci* **217**(1), 88–99 Jan (2009).
- [413] Fouliard, S., Benhamida, S., Lenuzza, N., and Xavier, F. *Mathematical and Computer Modelling* (2008).
- [414] Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. *Cell* **83**(1), 79–90 Oct (1995).
- [415] Cooper, G. *La cellule : une approche moléculaire*. DeBoeck Universités, (1999).
- [416] Cronier, S., Laude, H., and Peyrin, J.-M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33), 12271–12276 Aug (2004).
- [417] Prusiner, S. B. *N Engl J Med* **344**(20), 1516–1526 May (2001).
- [418] Ouellet, D. L., Plante, I., Barat, C., Tremblay, M. J., and Provost, P. *Methods Mol Biol* **487**, 415–433 (2009).
- [419] Weissmann, C. *Nat Rev Microbiol* **2**(11), 861–871 Nov (2004).
- [420] Ji, N., Shroff, H., Zhong, H., and Betzig, E. *Curr Opin Neurobiol* **18**(6), 605–616 Dec (2008).
- [421] Yeh, H.-Y., Yates, M. V., Chen, W., and Mulchandani, A. *Semin Cell Dev Biol* **20**(1), 49–54 Feb (2009).
- [422] Sasaki, K., Minaki, H., and Iwaki, T. *J Pathol* May (2009).