



HAL
open science

Identification de cibles intracellulaires de molécules à activité antiprion

Déborah Tribouillard-Tanvier

► **To cite this version:**

Déborah Tribouillard-Tanvier. Identification de cibles intracellulaires de molécules à activité antiprion. Biologie moléculaire. Rennes 1, 2007. Français. NNT : . tel-01118256

HAL Id: tel-01118256

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01118256v1>

Submitted on 18 Feb 2015

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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

THÈSE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Pour obtenir :

Le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Mention : Biologie

Par

Déborah TRIBOUILLARD-TANVIER

Equipe d'accueil : CNRS UPS 2682, Station Biologique de Roscoff & INSERM U 613, Brest

Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé (VAS)

Composante universitaire : Université de Rennes 1, école doctorale VAS

TITRE DE LA THÈSE :
**Identification des cibles intracellulaires de
molécules à activité antiprion**

SOUTENUE LE **03 Septembre 2007** devant la commission d'examen

COMPOSITION DU JURY :

M. Michel Aigle, rapporteur
M. Bruno André, rapporteur
M. Denis Michel, examinateur
M. Jean-Yves Thuret, examinateur
M. Daniel Boujard, examinateur
M. Marc Blondel, directeur de thèse

Professeur à l'université de LYON 1
Professeur à l'université de Bruxelles
Professeur à l'université de Rennes 1
Chargé de recherche CEA à Saclay
Professeur à l'université de Rennes 1
Professeur à l'université de Bretagne Occidentale, Brest

- ✚ *Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. Aristote*
- ✚ *Science sans conscience n'est que ruine de l'âme. Rabelais*

Merci

Je ne pouvais commencer ces remerciements sans évoquer la personne qui m'a encouragée à me diriger vers cette magnifique voie qui est celle de la recherche. Ma passion pour la biologie a débuté dès le lycée grâce à mon professeur des sciences de la vie et de la terre: **Liliane Lorfeuvre**. Elle m'a transmis son goût de la curiosité ainsi que cette petite « lueur » indispensable pour continuer dans cette direction. En effet, aujourd'hui, pour atteindre le grade de Docteur, il faut vraiment être passionné et dévoué à la recherche car c'est un peu comme un parcours du combattant : tout d'abord, la faculté : vaste brouillard épais dans lequel on est immergé parmi plein de gens et où on ne sait absolument pas si on arrivera à voir le jour. Ensuite, une fois s'être démarqué des autres et avoir aperçu une lueur, il nous faut trouver des personnes et des laboratoires qui sont prêts à nous faire confiance pour continuer ce bout de chemin ensemble. Sur mon sentier semé d'embûches, les laboratoires ont été nombreux à me faire confiance et à me permettre d'alimenter mon goût pour la biologie, les manipulations, les expérimentations et autres choses qui nous font passer aux yeux du grand public pour des savants FOUS.... Je remercie toutes ces personnes sans lesquelles je ne serais sûrement pas au stade auquel je suis arrivée....

La personne déterminante et très importante, qui a su me faire confiance durant près de 4 ans pour effectuer une thèse au sein de son équipe est **Marc Blondel**. Dès notre première rencontre, le « courant » est très bien passé. Il m'a appris énormément de choses, je lui dois pratiquement tout dans ce domaine. Marc est un scientifique hors pair, avec une très grande modestie. Il a su me transmettre son énergie, son enthousiasme, son engouement, sa curiosité et tant d'autres choses qui font de lui une personne exceptionnelle, tant au point du vue humain que scientifique. Grâce à Marc, j'ai pu développer mon sens de l'imagination, de l'exploration, émettre des hypothèses, tenter de les vérifier..... Marc a fortement contribué à mon épanouissement dans la recherche. Il m'a guidé « comme un vrai pilote » et il a fait preuve d'une grande patience et d'une grande disponibilité pour m'apprendre toutes les ficelles du métier de chercheur. Il m'a même laissé partager sa paillasse, ce qui m'a permis de

réaliser de formidables manips ! Marc est maintenant un grand ami et le sera encore pour très longtemps....Il a tellement de choses à m'apprendre encore... Marc est une source inépuisable de richesses. *Marc, Merci à toi.*

La prochaine personne que je tiens à remercier vivement est **Laurent Meijer**, directeur du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse. Ce grand Monsieur tant par la taille que par l'esprit est une personne formidable qui m'a permis de travailler dans des conditions rêvées par beaucoup d'autres thésards. En effet, Laurent est une personne très ouverte d'esprit qui a une totale confiance en ses étudiants, leur permettant ainsi de prendre des initiatives dans leurs recherches mais aussi d'aller promouvoir leurs recherches dans des congrès nationaux et internationaux. Marc et Laurent ont pour philosophie d'aller chercher les compétences là où elles se trouvent et non pas d'essayer dans son coin des choses que l'on ne sait pas faire. Ainsi, grâce à cette ouverture d'esprit, j'ai pu collaborer avec de nombreux laboratoires européens, me permettant ainsi d'aller découvrir de nombreux autres scientifiques, d'autres façons de travailler et m'ouvrir complètement. *Laurent, Merci à toi.*



Equipe ACDC (Amyloïdes et Cycle de Division Cellulaire)

Mon travail de thèse ne serait pas ce qu'il est si je ne l'avais pas effectué dans cette merveilleuse équipe que je tiens à remercier chaleureusement. Il y a tout d'abord **Nathalie**, notre assistante ingénieur préférée qui m'a appris énormément de choses : manipulation de la levure en général... Elle m'a mis le pied à l'étrier pour ensuite me permettre de voler de mes propres ailes tout en sachant qu'elle était présente s'il y avait le moindre problème. Nathalie est une personne sur laquelle on peut compter, et ceci est très important pour les manips et le

moral. *Nathalie, Merci à toi.* Ensuite, viennent tous mes camarades de bureau et de labo : Tout d'abord, **Stéphane** qui m'a supporté en partageant le labo avec moi.... Il m'a beaucoup apporté au point de vue manip et m'a révélé un tas de petits secrets pour effectuer de belles manips et avoir de beaux résultats : être surtout très soigneux et méticuleux !!

Steph, Merci à toi. Ensuite, **Damien** et **Sophie** qui ont partagé le même bureau et le même labo. Damien, toujours serviable à qui on peut demander « n'importe quoi, dans la limite du raisonnable, bien sûr !!! » et Sophie, très pertinente dans ses idées scientifiques.

Damien et Sophie, Merci à vous. Ensuite viennent les autres personnes permanentes du laboratoire qui sont également adorables et très serviables : **Blandine** qui a pu m'aider dans de nombreuses manipulations et **Olivier** qui a pu m'aérer l'esprit en pratiquant de la course à pied avec moi le midi. *Blandine et Olivier, Merci à vous.* Ensuite

viennent, tous les étudiants avec lesquels on s'estentraîdés : **Elodie, Karima, Jens, Yoan, Mélina, Morgane, Claire, Caroline** et **Fred**. Avec un remerciement particulier pour Cécile qui m'a beaucoup apportée pour la rédaction de ce manuscrit. *Cécile, Merci à toi.* Et

enfin, nos secrétaires préférées qui m'ont été d'une aide indispensable pour tout le côté administratif : *Laurence, Sophie et Emeline, Merci à vous.*

Et enfin, un remerciement tout particulier à « mon bureau » duquel on a une vue splendide dans laquelle j'ai pu m'évader et trouver de nouvelles idées.



Roscoff a été pour moi très important dans ma vie pour deux raisons :

1. La première, je l'ai déjà évoquée : lieu de ma thèse et de rencontre avec toute cette fantastique équipe qui m'a permis de travailler dans une ambiance exceptionnelle.
2. La deuxième et pas la moindre : lieu de rencontre avec mon mari **Christophe** qui a donc dû me supporter durant une grande partie de ma thèse. Il a su m'encourager dans des moments où je perdais confiance et me conseiller dans des moments où je perdais

ped. De cette union, un rayon de soleil a pu voir le jour (comme nous pouvons le constater sur la photo ci-dessus où j'étais enceinte) : **Sarah** notre petite fille qui a égayé mes moments d'écriture. A tous les deux, un grand Merci pour les encouragements que vous m'avez procuré, chacun à votre manière.



Enfin, un grand merci à toute ma famille, et tout particulièrement à mes parents qui depuis toute petite ont su m'encourager dans mes choix et me soutenir avec une grande ferveur.

J'aimerais terminer en remerciant tous les membres du jury : Michel Aigle et Bruno André, qui m'ont fait l'honneur d'être mes rapporteurs ; Denis Michel qui a eu la gentillesse de faire parti de cette aventure ; Jean-Yves Thuret qui en plus d'être présent dans mon jury était aussi présent dans mon comité de thèse. Il a ainsi pu juger ce travail régulièrement et me donner de précieux conseils au cours de discussions très enrichissantes ; Daniel Boujard qui en plus d'être dans mon jury ainsi que dans mon comité de thèse était aussi mon tuteur de thèse. Il a donc pu m'aider et me conseiller tout au long de ces 4 années et enfin Marc Blondel, directeur de ma thèse, envers lequel j'ai énormément de gratitude.

A vous tous, un grand merci. Je vous souhaite beaucoup de bonheur.....

<p>Ce travail a été soutenu par le Ministère de la Recherche pendant les trois premières années ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale pour la quatrième année.</p>
--

*« Une vie sans amour est une vie sans soleil. »
Hervé Bazin.*

A Sarah, mon rayon de soleil....

SOMMAIRE

SOMMAIRE

RESUME	14
ABBREVIATIONS	15
NOMENCLATURE	17
LISTE DES PUBLICATIONS	23
AVANT PROPOS	25
A. INTRODUCTION	29
I. LES MALADIES A PRIONS	29
I.1 LES MALADIES A PRIONS CHEZ LES MAMMIFERES	29
I.1.1 LES PRIONS DE MAMMIFERES : EPIDEMIE A GRANDE AMPLEUR	29
<i>I.1.1.1 Les encéphalopathies spongiformes transmissibles touchent de nombreux organismes</i>	<i>29</i>
<i>I.1.1.2 Les Encéphalopathies spongiformes transmissibles</i>	<i>31</i>
<i>I.1.1.3 L'épidémie</i>	<i>34</i>
<i>I.1.1.4 Les nouveaux variants : chez l'homme</i>	<i>34</i>
❖ Historique du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob	35
❖ Les Encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines :	35
<i>I.1.1.5 La vache folle : une crise annoncée</i>	<i>38</i>
❖ Lien entre la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et l'encéphalopathie spongiforme bovine	38
❖ La "crise de la vache folle"	38
I.2 LE COUPABLE	39
I.2.1 LES AGENTS TRANSMISSIBLES NON CONVENTIONNELS	39
I.2.2 HYPOTHESES VIRALES	40
I.2.3 HYPOTHESE PROTEIQUE : LE PRION	41
I.2.4 DEFINITION DU TERME PRION	43
<i>I.2.4.1 L'agent secret des maladies à prions</i>	<i>43</i>
<i>I.2.4.2 La protéine Prion : découverte</i>	<i>43</i>
I.2.5 LA PROTEINE PRION PrP^C : LES DEUX FACES DE LA PROTEINE	44
<i>I.2.5.1 PrP^C</i>	<i>44</i>
❖ Polymorphisme et mutations	44
❖ Structure de la protéine PrP	45
❖ Biosynthèse et localisation cellulaire de la PrP	48
❖ Fonctions de la PrP ^C	51
❖ Glycosylation et localisation de la PrP	54
❖ Glycosylation et conversion PrP ^C /PrP ^{res}	55
<i>I.2.5.2 PrP^{Sc}</i>	<i>55</i>
❖ Conversion de la PrP cellulaire en isoforme pathologique	57
❖ Routage intracellulaire	62
❖ Mort neuronale	64
I.2.6 NOTION DE SOUCHE, DE BARRIERE D'ESPECE ET MODELES ANIMAUX EXPERIMENTAUX	67
<i>I.2.6.1 Notion de souche</i>	<i>67</i>
<i>I.2.6.2 Glycosylation et typage de souche</i>	<i>68</i>
<i>I.2.6.3 Notion de barrière d'espèce</i>	<i>69</i>
<i>I.2.6.4 Modèles animaux expérimentaux</i>	<i>70</i>

II. LES PRIONS CHEZ LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	71
II.1 LA LEVURE : ORGANISME MODELE POUR L'ETUDE DES PRIONS	71
II.1.1 MODELE DE SIMPLICITE	71
II.1.2 EXISTENCES DE PRIONS	72
II.2 LES PRIONS DE LEVURE	72
II.2.1 [URE3] : LE PRION PRECURSEUR	73
II.2.2 [PSI+], LE PRION « SUPERSTAR »	73
II.2.3 CARACTERISTIQUES GENETIQUES DES PRIONS DE LEVURES	74
II.2.4 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRIONS DE LEVURES	75
II.3 LES FORMES « NORMALES » DES PRIONS [URE3] ET [PSI⁺]	76
II.3.1 URE2P : FORME « NORMALE » DE LA PROTEINE PRION [URE3].....	76
<i>II.3.1.1 Structure</i>	<i>77</i>
<i>II.3.1.2 Formation de fibres amyloïdes</i>	<i>78</i>
<i>II.3.1.3 Systèmes rapporteurs pour la détection de [URE3].....</i>	<i>79</i>
❖ <i>Système utilisant l'USA</i>	<i>79</i>
❖ <i>Système utilisant la construction pDAL5-ADE2</i>	<i>79</i>
<i>II.3.1.4 Conversion conformationnelle de Ure2p.....</i>	<i>80</i>
II.3.2 SUP35P : FORME NON PATHOLOGIQUE DE LA PROTEINE PRION [PSI⁺]	81
<i>II.3.2.1 Structure</i>	<i>82</i>
<i>II.3.2.2 Système rapporteur pour la détection de [PSI⁺]</i>	<i>83</i>
<i>II.3.2.3 Conversion conformationnelle de Sup35p.....</i>	<i>83</i>
II.4 LES AUTRES PRIONS DE CHAMPIGNONS.....	86
II.4.1 [PIN⁺], LA « MAMAN » DES PRIONS	87
II.4.2 [NU⁺]	87
II.4.3 AUTRES PRIONS DE <i>S.CEREVISIAE</i>	88
II.4.4 AUTRES PRIONS DE CHAMPIGNONS : CHEZ <i>PODOSPORA ANSERINA</i>	88
II.4.5 PRIONS DIVERS.....	91
II.4.6 CONCLUSION	91
II.5 NOTION DE SOUCHES ET BARRIERE D'ESPECE	94
II.5.1 SOUCHES	94
II.5.2 BARRIERE D'ESPECES	95
II.6 PROPAGATION DES PRIONS.....	96
II.7 FACTEURS CELLULAIRES ET PROPAGATION DES PRIONS DE LEVURE	99
II.7.1 CHAPERONS DE PROTEINES	99
II.7.2 HSP104P : ESSENTIEL A LA PROPAGATION DES PRIONS.....	101
II.7.3 LES HSP70P.....	103
II.7.4 LES ARN RIBOSOMAux	106
<i>II.7.4.1 Les ribosomes : structure et fonction dans la synthèse protéique</i>	<i>106</i>
<i>II.7.4.2 Les ribosomes : fonction de chaperon de protéines.....</i>	<i>108</i>
<i>II.7.4.3 Les deux activités du ribosome : existence d'inhibiteurs ?.....</i>	<i>109</i>
II.8 EFFETS BENEFIQUES DES PRIONS	110
III. MALADIES A FIBRES AMYLOÏDES.....	111
III.1 MALADIES NEURODEGENERATIVES	114

III.2 REPLIEMENT D'UNE PROTEINE ET CONSEQUENCES S'IL NE SE PRODUIT PAS CORRECTEMENT	116
IV. DIAGNOSTICS ET THERAPIES DES MALADIES A PRIONS.....	121
IV.1 DIAGNOSTIC	121
IV.1.1 TESTS <i>POST-MORTEM</i>	121
IV.1.2 NECESSITE D'UN DIAGNOSTIC PRE-SYMPATOMATIQUE	122
IV.2 THERAPIES CONTRE LES MALADIES A PRIONS.....	126
IV.2.1 APPROCHES PHARMACOLOGIQUES	128
IV.2.2 APPROCHES IMMUNOLOGIQUES	126
IV.2.3 LES DIFFERENTES MOLECULES DEJA TESTEES.....	130
IV.3 CRIBLAGE DE MOLECULES ANTIPRION	136
IV.3.1 CRIBLAGE <i>IN VITRO</i> EN SYSTEME MAMMIFERE	137
IV.3.2 CRIBLAGE <i>IN VIVO</i> EN SYSTEME LEVURE	139
IV.3.3 TEST <i>IN VIVO</i> CHEZ LES MAMMIFERES	143
V. OBJECTIF ET PROJET DE LA THESE	144
V.1 L'OBJECTIF MAJEUR DE MA THESE.....	144
V.2 PROJET DE RECHERCHE.....	145
V.2.1 UNE APPROCHE GENETIQUE BASEE SUR LA LEVURE DE BOULANGER <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	146
V.2.2 UNE APPROCHE BIOCHIMIQUE	148
B. MATERIEL ET METHODES.....	154
I. MATERIELS	154
I.1 OLIGONUCLEOTIDES	154
I.2 VECTEURS ET BANQUES DE PLASMIDES	154
I.2.1 LES VECTEURS	154
I.2.2 BANQUE DE PLASMIDES.....	156
I.3 MATERIELS BIOLOGIQUES	157
I.3.1 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	157
I.3.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	160
I.3.3 CERVEAU DE PORC	160
I.3.4 LIGNEE DE CELLULES ROV ET MOV	160
II. METHODES	161
II.1 MILIEUX DE CULTURES ET CONDITIONS DE CULTURES	161
II.1.1 POUR LES LEVURES	161
II.1.2 POUR LES BACTERIES.....	161
II.1.3 POUR LES CELLULES MAMMIFERES MOV ET ROV	162
II.2 MESURE DE LA CROISSANCE	162
II.3 METHODES RELATIVES A <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	162
II.3.1 LES ACIDES NUCLEIQUES.....	162

<i>II.3.1.1 Extraction rapide de l'ADN génomique</i>	162
<i>II.3.1.2 Extraction des ARN totaux</i>	163
II.3.2 MUTAGENÈSE EN LEVURE : DELETION D'UN GÈNE	164
<i>II.3.2.1 Choix des amorces</i>	164
<i>II.3.2.2 Construction de la cassette de délétion</i>	164
<i>II.3.2.3 Transformation</i>	166
<i>II.3.2.4 Vérification</i>	166
<i>II.3.2.5 Stockage en glycérol</i>	166
<i>II.3.2.6 Exemple d'obtention d'un « mutant »</i>	166
II.3.3 TRANSFORMATION DES LEVURES	166
II.3.4 MICROSCOPIE A FLUORESCENCE	167
II.4 METHODES RELATIVES A <i>ESCHERICHIA COLI</i>	167
II.4.1 CLONAGE	167
<i>II.4.1.1 Choix des amorces</i>	167
<i>II.4.1.2 PCR pour amplifier la construction</i>	168
<i>II.4.1.3 Purification des produits de PCR</i>	168
<i>II.4.1.4 Digestion enzymatique</i>	168
<i>II.4.1.5 Purification des bandes sur gel d'agarose</i>	168
<i>II.4.1.6 Ligation</i>	169
<i>II.4.1.7 Transformation dans les bactéries compétentes</i>	169
<i>II.4.1.8 Passage en milieu liquide</i>	169
<i>II.4.1.9 Mini-prep</i>	169
<i>II.4.1.10 Vérification par digestion enzymatique</i>	169
II.4.2 CONSTRUCTION DES VECTEURS	170
<i>II.4.2.1 PDT1</i>	170
<i>II.4.2.2 PDT2</i>	171
<i>II.4.2.3 PDT3, PDT4, PDT5 et PDT6</i>	171
<i>II.4.2.4 PDT7</i>	171
<i>II.4.2.5 PDT8 et PDT9</i>	175
II.5 METHODES GENERALES DE BIOCHIMIE	175
II.5.1 LES PROTEINES	175
<i>II.5.1.1 Extractions</i>	175
❖ Extraction des protéines de levures : « propre ».....	175
❖ Extraction rapide des protéines de levure en vue d'analyse sur Western-Blot.....	176
<i>II.5.1.2 Analyses des protéines</i>	176
❖ Dosage des protéines	176
❖ Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide.....	176
❖ Western-blot : Immunodétection de protéines d'intérêts.....	176
❖ Coloration au bleu	177
❖ Coloration à l'argent.....	177
❖ Identification des protéines par spectrométrie de masse	177
II.6 METHODES PEU COMMUNES ET ORIGINALES M'AYANT SUIVIES TOUT AU LONG DE CETTE THESE	177
II.6.1 TEST DE SENSIBILITE	177
<i>II.6.1.1 Principe (figure 55)</i>	177
<i>II.6.1.2 Souches de levure utilisées</i>	178
<i>II.6.1.3 Approche pratique</i>	180
<i>II.6.1.4 Elimination des faux-positifs</i>	181
II.6.2 TESTS CELLULAIRES EN CELLULES DE MAMMIFERES	182
<i>II.6.2.1 Criblage de composés actifs contre le prion de mammifère</i>	182
<i>II.6.2.2 Test : Résistance à la protéinase K</i>	182
II.6.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR DROGUES IMMOBILISEES	183
<i>II.6.3.1 Tampons</i>	183

<i>II.6.3.2 Préparation des extraits</i>	183
<i>II.6.3.3 Chromatographie d'affinité</i>	184
II.6.4 CRIBLE GENETIQUE	186
<i>II.6.4.1 Principe</i>	186
<i>II.6.4.2 Criblage de molécules « pro-prion »</i>	186
<i>II.6.4.3 Criblage de molécules « antiprion »</i>	188

C. ARTICLES : DEVELOPPEMENT/RESULTATS..... 192

I. MISE AU POINT D'UN CRIBLE HAUT-DEBIT EN LEVURE DANS LE BUT D'ISOLER DES DROGUES

ANTIPRION.	194
<i>Article 1</i>	194
<i>Article 2</i>	207

II. UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE POUR IDENTIFIER DES CIBLES

INTRACELLULAIRES DE DIVERSES DROGUES.....	214
<i>Article 3</i>	214

III. APPROCHES GENETIQUES ET BIOCHIMIQUES POUR COMPRENDRE LES MECANISMES D'ACTION DE DIFFERENTES DROGUES.....

225

<i>Article 4</i>	225
------------------------	-----

IV. CRIBLAGE D'UNE MOLECULE "MEDICAMENT" CONTRE LES MALADIES A PRIONS.....

233

<i>Article 5</i> :	233
--------------------------	-----

V. LA 6AP ET LE GA INHIBENT SPECIFIQUEMENT L'ACTIVITE DE CHAPERON DE PROTEINES DU RIBOSOME.....

254

<i>Article 6</i> :	254
--------------------------	-----

D. RESULTATS NON PUBLIES309

1. LES CHAPERONS DE PROTEINES HSP70P SONT IMPORTANTS POUR L'EFFET

ANTIPRION DE LA 6AP	309
----------------------------------	------------

I. DEVELOPEMENT D'UN CRIBLE GENETIQUE EN LEVURE POUR IDENTIFIER DES CIBLES

POTENTIELLES DE LA 6AP	309
-------------------------------------	------------

II. HSP90P N'EST PAS UNE CIBLE DE LA 6AP	311
---	------------

III. HSP70P POURAIT ETRE UNE CIBLE DE LA 6AP	312
---	------------

IV. L'INACTIVATION DE DIFFERENTES HSP70P DE LEVURE RECAPITULE L'EFFET DE CURE DE LA DROGUE ANTIPRION 6AP

315

V. EFFETS ANTAGONISTES DE DIFFERENTES HSP70P SUR LE MAINTIEN DES PRIONS	316
--	------------

VI. DEVELOPEMENT D'UN CRIBLE GENETIQUE EN LEVURE POUR CRIBLER DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES « ANTIPRION »

318

2. ETUDE DE L'EFFET ANTIPRION DE LA CHLORPROMAZINE : 320

I. EFFET DE LA BREFELDIN A SUR LA CURE	322
---	------------

II. EFFET DE LA DELETION DE PKC1P SUR LA CURE PAR LA CHLORPROMAZINE.....	323
III. MODELE FINAL	323
E. CONCLUSION ET MODELE.....	326
I. CONCLUSION.....	326
II. MODELE.....	326
F. DISCUSSION GENERALE	331
I. PRION : BOULEVERSEMENT DES DOGMES	331
II. PRION : ORIGINE DE LA VIE	332
III. PRION : QUESTIONS SANS REPONSES	333
IV. PRION : UTILITE DE LA LEVURE	334
V. PRION : APPORTS DE CETTE THESE	335
VI. PRION : CHAMPS D'INVESTIGATIONS PRESENTS ET FUTURS POUR LA RECHERCHE SUR LES PRIONS.....	336
G. BIBLIOGRAPHIE.....	340
RESUME	364

Résumé

Identification de cibles intracellulaires de molécules à activité antiprion.

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives touchant l'homme ainsi que l'animal et dont l'issue est toujours fatale.

Notre objectif était d'utiliser la 6AP et le GA, deux drogues antiprion isolées au laboratoire comme des hameçons moléculaires pour identifier leurs cibles cellulaires afin de mieux comprendre leur mode d'action ainsi que les phénomènes de prionisation.

Deux criblages, l'un génétique et l'autre biochimique ont révélé que les chaperons de protéines et les ribosomes sont impliqués. Les drogues antiprion testées ciblent spécifiquement la fonction de repliement des protéines portée par le grand ARNr 23S/25S/28S. Ceci suggère que l'activité de chaperon de protéines du grand ARNr est nécessaire pour le maintien et la propagation des prions.

Ces molécules semblent aussi être actives contre d'autres maladies liées à des problèmes de repliement et d'agrégation des protéines. Nos molécules ont donc un avenir potentiel dans le traitement de ces maladies.

Mots clés : prion, fibres amyloïdes, chaperons de protéines, ribosome, levure, criblage.

Abstract

Determining intracellular targets of antiprion drugs isolated using a yeast-based assay.

Prion-based diseases are fatal neurodegenerative disorders for which no efficient treatment is currently available.

We focussed our work on the identification of the intracellular biochemical targets of two drugs 6AP and GA, isolated in the laboratory as antiprion drugs using a yeast-based assay to uncover biochemical pathways controlling prion formation.

Using both genetic and biochemical approaches, we show an RNA-dependent interaction of 6AP and GA with ribosomes. 6AP and GA specifically inhibit the protein folding activity of the large ribosomal RNA of the large ribosome subunit. We thus propose that the ribosomal RNA protein folding activity is required for prion maintenance.

These drugs are also efficient against other protein misfolding diseases: Huntington disease or cystic fibrosis. 6AP and GA could have much wider applications than in prion diseases.

Keywords: prion, Amyloid fibers, protein folding, protein chaperone, ribosome, yeast, screening.

ABBREVIATIONS

6AP : 6 aminophénanthridine
Ac : Anticorps
AD : *Alzheimer's Disease* (maladie d'Alzheimer)
ALS : *Amyotrophic Lateral Sclerosis*
APP : *Amyloid precursor protein* (précurseur de la protéine amyloïde)
Asn : Asparagine
ATNC : Agent transmissible non conventionnel
BHE : Barrière Hémato Encéphalique
CJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob
CPEB : *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding*
Cu : Cuivre
CWD : *Chronic Wasting Disease* touchant les cervidés
DRM : Microdomaines résistants aux détergents (dans les membranes cellulaires)
DS500 : Dextran sulfate 500
ERAD : *Endoplasmic reticulum associated degradation* (dégradation associée au réticulum endoplasmique)
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
EST : Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
FDC : Cellules folliculaires dendritiques
fCJ : Forme familiale de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
GA : Guanabenz
GAG : Glycosaminoglycane
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GPI : Glycosyl phosphatidyl inositol
GST : Glutathione S-transférase
GuHCl : Chlorure de Guanidium
HD : Maladie de Huntington
HM : Héparane mimétique
HS : Héparane sulfate
i.c. : Intracérébral
iCJ : Forme iatrogène de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
IFF : Insomnie fatale familiale
i.p. : Intrapéritonéal
LRP : *Laminin receptor precursor* (précurseur du récepteur à la laminine)
LR : *laminin receptor* (récepteur à la laminine)
N-CAM : *Neuronal Cell Adhesion Molecule*
PCR : *Polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)
PD : Maladie de Parkinson
PK : Protéinase K
PMCA : *Protein misfolding cyclic amplification* (amplification cyclique de transconformation protéique)
PFD : *Prion Forming Domain*
PPS : Pentosane polysulfate
Prnp : Gène codant pour la protéine PrP
Prion : *Proteinaceous infectious particule*
CtmPrP : PrP localisée dans le réticulum endoplasmique car le peptide signal n'est pas clivé
PrP^C ou PrP^{sen} : Protéine prion cellulaire normale sensible aux protéases
PrP^{res} : Protéine prion pathologique résistante aux protéases
PrP^{Sc} : Protéine prion scrapie résistante aux protéases et infectieuse

PrnP0/0 : Souris dont le gène *Prnp* a été invalidé
RE : Réticulum endoplasmique
RNA : *Ribonucleic acid* (Acide ribonucléique)
RML : *Rocky Mountain Laboratory scrapie strain*
SAF : *Scrapie Amyloid Fibril* (PrP^{res} purifiée)
SD : *Synthetic Medium* : Milieu minimum pour les levures
SBD : *Substrat Binding Domain*
SGSS : Syndrome de Gerstmann –Sträussler-Sheinker
shRNA : *Short hairpin RNA*
Sinc: *Scrapie incubation period* (gène impliqué dans la période d'incubation de la tremblante)
sCJ : Forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
SNC : Système nerveux central
SOD : Superoxyde dismutase
USA : Ureidosuccinic acid
vCJ : Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
YPD : Milieu riche pour les levures

NOMENCLATURE

[*PSI*+]

Allèles

SUP35 : Gène sauvage codant le facteur de terminaison de la traduction Sup35p

sup35 : Mutant du gène *SUP35*

Protéine

Sup35p

Phénotype

[*PSI*⁺] : Phénotype prion

[*psi*⁻] : Phénotype non prion

[*URE3*]

Allèles

URE2 : Gène sauvage impliqué dans la répression du catabolisme azoté

ure2 : Mutant du gène *URE2*

Protéine

Ure2p

Phénotype

[*URE3*] : Phénotype prion

[*ure-0*] : Phénotype non prion

PrP

Allèles

PRNP : Gène sauvage codant la protéine prion humaine PrP

Protéine

PrP

Phénotype

PrP^{Sc} (PrP^{res}) : Phénotype prion

PrP^C : Phénotype non prion

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Enfants atteints par la maladie de Kuru (p.29).

Figure 2 : Coupe microscopique de cerveaux de patients infectés ou non par la maladie (p.30).

Figure 3 : Représentation de la structure du gène *PRNP* et de l'ARN messager correspondant (p.44).

Figure 4 : Position des différentes mutations et différents polymorphismes au niveau du gène *PRNP* humain (p.45).

Figure 5 : Pourcentage d'hélices α et de feuillets β au sein de la protéine PrP et structure tridimensionnelle de la protéine PrP recombinante (p.48).

Figure 6 : Biosynthèse de PrP^C (p.50).

Figure 7 : Fragment de PrP résistant à la digestion par la protéinase K (PK) (p.56).

Figure 8 : Mécanismes moléculaires possibles de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (p.60).

Figure 9 : Routage intracellulaire de la protéine PrP (p.62).

Figure 10 : Routage de la protéine PrP au sein de l'organisme (p.63).

Figure 11 : Rôle des cellules microgliales dans le processus de mort neuronale (p.66).

Figure 12 : Classification des différentes souches de prion en fonction des différents sites de coupure par les protéases et les différentes formes de glycosylation (p.68).

Figure 13 : Notion de barrière d'espèce (p.70).

Figure 14 : Structure de la protéine Ure2p (p.77).

Figure 15 : Formation de fibre amyloïde d'Ure2p (p.78).

Figure 16 : Systèmes rapporteurs de [URE3] (p.80).

Figure 17 : Schématisation des conformations des prions de champignons (p.81).

Figure 18 : Structure de la protéine Sup35p et système rapporteur (p.82).

Figure 19 : Système rapporteur de [PSI+] (p.84).

Figure 20 : Résumé des différents phénotypes liés au prion de levure [PSI+] (p.86).

Figure 21 : Technique de biolistique (p.89).

Figure 22 : Différents prions de champignons et les phénotypes résultants (p.93).

Figure 23 : Modèle de propagation des prions de levure (p.97).

Figure 24 : Méthode d'estimation de la propagation du prion de levure [PSI+] (p.98).

Figure 25 : Régulation des chaperons de protéines Hsp70p (p.100).

Figure 26 : Hsp104p et propagation des prions de levure (p.102).

Figure 27 : Effets de différents chaperons de protéines dans la propagation des prions de levures (p.104).

Figure 28 : Biogenèse du ribosome chez la levure (p.107).

Figure 29 : Structure d'un ribosome et sa fonction de traduction (p.108).

Figure 30 : Les différents inhibiteurs connus de la synthèse protéique par le ribosome (p.110).

Figure 31 : Toxicité ou non toxicité et inactivation versus activation des prions (p.113).

Figure 32 : Différentes maladies neurodégénératives (p.115).

Figure 33 : Les différents systèmes de repliement ou de dégradation d'une protéine (p.116).

Figure 34 : Passage d'un état normal à un état pathologique (p.117).

Figure 35 : Un équilibre fragile entre l'état normal et anormal (p.118).

Figure 36 : Les différents systèmes empêchant le mauvais repliement d'une protéine (p.119).

Figure 37 : Quelques exemples de la nécessité de la mise au point de diagnostics précoces (p.123).

Figure 38 : Technique de PMCA (p.125).

Figure 39 : Les différentes voies d'actions thérapeutiques (p.127).

Figure 40 : Différentes voies d'actions thérapeutiques contre les maladies à prions (p.136).

Figure 41 : Criblage « haut-débit » d'inhibiteurs de PrP^{Sc} en système mammifère (p.137).

Figure 42 : Criblage haut-débit en système levure d'inhibiteurs des prions (p.140).

Figure 43 : Les premiers composés à activité antiprion isolés grâce à un crible levure (p.141).

Figure 44 : tests des molécules antiprion dans les systèmes mammifère et levure (p.142).

Figure 45 : Schématisation du crible génétique pour l'identification de protéines « pro-prion » (p.147).

Figure 46 : Approche biochimique pour l'identification des cibles de molécules antiprion (p.149).

Figure 47 : Carte du plasmide p4XX promotor (p.154).

Figure 48 : Carte des plasmides pFA6a (p.155).

Figure 49 : Carte de la banque de cDNA de levure CMB102 (p.156).

Figure 50 : *Saccharomyces cerevisiae* (p.157).

Figure 51 : Les différentes étapes de délétion d'un gène de levure (p.165).

Figure 52 : Construction du vecteur PDT1 (p.172).

Figure 53 : Construction du vecteur PDT2 (p.173).

Figure 54 : Construction des vecteurs PDT8 et PDT9 (p.174).

Figure 55 : Criblage haut-débit en système levure, d'inhibiteurs des prions (p.178).

Figure 56 : Systèmes rapporteurs des deux prions de levure utilisés pour nos cribles (p.179).

Figure 57 : Elimination des faux positifs interférants avec le test colorimétrique (p.181).

Figure 58 : Tests cellulaires (p.182).

Figure 59 : Approche biochimique pour l'identification des cibles de molécules antiprion (p.185).

Figure 60 : Schématisation du crible génétique pour l'identification de protéines « pro-prion » (p.188).

Figure 61 : Hsp90p n'est pas une cible de la 6AP (p.311).

Figure 62 : Hsp70p est une cible potentielle de la 6AP (p.312).

Figure 63 : Hsp70p n'est pas une cible directe de la 6AP (p.313).

Figure 64 : La délétion de *FESI* augmente la sensibilité de cure des drogues 6AP et GA (p.314).

Figure 65 : L'inactivation de différents gènes d'*HSP70* récapitule l'effet antiprion de la 6AP chez la levure pour [*PSI+*] et [*URE3*] (p.315).

Figure 66 : Effets antagonistes de différentes Hsp70p sur le maintien des prions (p.317).

Figure 67 : Détermination des conditions du crible pour identifier des protéines "antiprion" (p.319).

Figure 68 : Effet de la délétion du gène *ZUO1* sur la cure du prion [*PSI+*] par la 6AP (p.320).

Figure 69 : Modèle proposé par Deloche et collaborateurs en 2004 (p.321).

Figure 70 : La Brefeldin A (BFA) cure les prions de levure (p.322).

Figure 71 : Effet de la délétion de *PKCI* sur la cure par la Chlorpromazine (p.323).

Figure 72 : Modèle proposé issu de l'article 5 (p.324).

Figure 73 : Modèle proposé (p.327).

Figure 74 : MG 132 inhibe la cure du prion [*PSI+*] par la 6AP et le GA (p.328).

Figure 75 : L'hérédité cytoplasmique basée sur des protéines à conformation en feuillets β (p.330).

Tableaux

Tableau 1 : Les différentes maladies à encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) (p.28).

Tableau 2 : Chronologie des grands évènements concernant les maladies à prions (p.28).

Tableau 3 : Chronologie des grands évènements concernant la recherche sur le prion (p.33).

Tableau 4 : Les différentes formes de maladie à prion (p.37).

Tableau 5 : Les différents rôles « présumés » de la protéine PrP (p.53).

Tableau 6 : Caractéristiques des différents prions de champignons (p.91).

Tableau 7 : Protéines prions ainsi que les phénotypes qui leur sont associés (p.93).

Tableau 8 : Maladies à fibre amyloïde et exemple d'une fibre amyloïde (p.114).

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés au cours de la thèse (p.152).

Tableau 10 : Souches de levures utilisées au cours de la thèse (p.159).

Tableau 11 : Plasmides utilisés au cours de la thèse (p.170).

Tableau 12 : cDNA dont la surexpression empêche la cure du prion [*PSI+*] par la 6AP (p.310).

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS

Article 1

Tribouillard D., Bach S., Gug F., Desban N., Beringue V., Andrieu T., Dormont D., Galons H., Laude H., Vilette D., and Blondel M., 2006. Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnology Journal*.

Article 2

Bach S., **Tribouillard D.**, Talarek N., Desban N. and Blondel M., 2006. A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods*.

Article 3

Tribouillard D., Guiffant D., Gug F., Galons H., Meijer L., Blondel M. and Bach S. 2007. Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnology Journal*.

Article 4

Tribouillard D., Gug F., Galons H., Bach S., Saupe S.J. and Blondel M., 2007. Antiprion drugs as chemical tools to uncover mechanisms of prion propagation. *Prion*.

Article 5

Tribouillard-Tanvier D., Beringue V., Desban N., Gug F., Bach S., Galons H., Laude H., Vilette D., and Blondel M., 2007. Antihypertensive drug Guanabenz is active *in vivo* against mammalian prions. Soumis.

Article 6

Tribouillard-Tanvier D., Dos Reis S., Gug F., Beringue V., Huang C., Talarek N., Bach S., Desban N., Saupe S.J., Thuret JY., Chedin S., Vilette D., Galons H., Sanyal S.C., and Blondel M., 2007. Protein folding activity of rRNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs. Soumis.

AVANT-PROPOS

Avant propos

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), encore appelées maladies à prions, sont des maladies neurodégénératives qui touchent l'homme ainsi que l'animal et dont l'issue est, à ce jour, fatale. Ces maladies peuvent être sporadiques, infectieuses ou génétiques et sont de plus transmissibles (infectieuses) ; ce qui constitue leur particularité par rapport aux autres maladies neurodégénératives.

Elles sont induites par des agents infectieux, agents transmissibles non conventionnels (ATNC). Ces maladies ont une période d'incubation asymptomatique pouvant être très longue (40 ans). En plus de leur extrême résistance aux procédés classiques d'inactivation des micro-organismes, de l'absence de toute réaction immunitaire spécifique, la composition chimique de ces agents oriente les hypothèses vers une nature exclusivement protéique actuellement la plus communément admise. Il s'agirait donc d'une protéine infectieuse (prion) sans particule nucléique spécifique, s'accumulant sous une forme anormalement conformée à l'origine du caractère pathogène de l'agent. Cette hypothèse, tout à fait révolutionnaire, excluant tout élément d'origine génétique, constitue un véritable bouleversement des dogmes de la biologie moléculaire actuelle.

Si, à l'heure actuelle, il n'existe aucun argument épidémiologique pour affirmer que l'agent de la tremblante du mouton, qui est une maladie connue depuis plus de deux cents ans, est pathogène pour l'homme, toutes les études effectuées sur le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJ) apparu en 1996, tendent à montrer qu'il est le résultat de la contamination de l'homme, probablement par voie alimentaire, par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). L'hypothèse selon laquelle plus d'un million de carcasses de bovins atteints d'ESB seraient passées dans la chaîne alimentaire humaine soulève alors un nouveau problème de santé publique s'ajoutant au risque iatrogénique en pathologie humaine causé par la contamination par des hormones de croissance humaines extractives infectées et les opérations neurochirurgicales. L'inquiétude suscitée par cette nouvelle épidémie est d'autant plus grande en l'absence de tout traitement efficace des EST.

A l'heure actuelle, quelques molécules, dont la Quinacrine anciennement utilisée pour le traitement du paludisme ainsi que le pentosan sulfate ont fait l'objet de traitements compassionnels pour les patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob entraînant des résultats peu encourageants, ceci probablement en raison de l'état avancé de la maladie au moment du traitement et des connaissances encore émergentes sur ces agents infectieux. L'étiologie encore inconnue des EST est un obstacle à l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, préalable indispensable à la mise en place de diagnostics et de traitements précoces. Dès lors, les données actuelles encore partielles sur la physiopathologie de ces affections ne permettent pas la mise en œuvre d'approches expérimentales précises pour la recherche de nouvelles thérapeutiques.

INTRODUCTION

Tableau 1 : les différentes maladies à encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST)

Maladies EST	Espèces affectées	Modes de transmission
Creutzfeldt-Jakob	Homme	
Nouveau Variant (vCJD)		Par ingestion de viande bovine infectée
Sporadique		mutations somatiques ou conversion de PrP ^C en PrP ^{Sc}
Iatrogène		Exposition à des tissus contaminés lors d'actes chirurgicaux
Familiale		mutations germinales dans le gène <i>PRNP</i>
Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Homme	mutations germinales dans le gène <i>PRNP</i>
Insomnie fatale familiale	Homme	mutations germinales dans le gène <i>PRNP</i>
Kuru	Homme	Rituels cannibales
Scrapie	Mouton, chèvre	Par ingestion
Encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)	Bovins	Par ingestion
Maladie du dépérissement chronique	Cerfs, élans	Par ingestion
Encéphalopathie spongiforme féline	Chats	Par ingestion
Encéphalopathie transmissible du vison	Visons d'élevage	Par ingestion
Encéphalopathie exotique	Kudu, nyala, oryx	Par ingestion

Tableau 2 : chronologie des grands événements concernant les maladies à prions.

1730: La tremblante du mouton est décrite (scrapie) pour la 1ère fois en Angleterre.
Rapport des éleveurs anglais à la chambre des communes.

1898: Charles Besnoit, professeur à l'école vétérinaire d'Alfort, observe au microscope des lésions nerveuses (vacuoles) de la tremblante.
Comptes rendus de la société de biologie.

1920-1923: Dans le service de neuropathologie d'Alois Alzheimer, Hans Creutzfeldt et Alfons Jakob décrivent les premiers cas de la maladie qui portera le leur nom.

1936: Les vétérinaires Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle démontrent que la tremblante est transmissible par inoculation.
Comptes rendus de l'académie des sciences.

1957: L'officier de santé australien Vincent Zigas et le médecin américain Carleton Gajdusek (prix Nobel 1976) décrivent la maladie de Kuru chez les Forés de Papouasie-Nouvelle Guinée.
New England Journal of Medicine.

1959: Le vétérinaire William Hadlow souligne dans une lettre aux médecins, la forte ressemblance entre le Kuru et la tremblante du mouton. Il suggère de réaliser des expériences d'inoculation du Kuru sur des primates.
The Lancet.

1961: Dick Chandler, vétérinaire, réussit à inoculer la tremblante à des souris de laboratoire.
The Lancet.

1966: Tikvah Alper, radiobiologiste, observe que l'agent de la tremblante résiste totalement à des doses de rayonnement qui, pourtant, inactivent les plus petits virus connus. Elle formule l'étrange hypothèse que l'agent se multiplierait sans contenir d'ADN (acides nucléiques).
Biochemical and biophysical research communications.

1967: John Griffith, mathématicien, énonce lui aussi l'hypothèse qu'une protéine pourrait à la fois être infectieuse et responsable de sa propre synthèse.
Nature.

1968: Carleton Gajdusek et ses collaborateurs transmettent à des chimpanzés le Kuru, puis la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

1981: Françoise Cathala, chercheur Inserm, se pose avec Carleton Gajdusek la question des liens entre la transmission de la tremblante et la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Elle mène sur 12 ans une enquête épidémiologique pour établir ce lien mais ne peut conclure à cette hypothèse.
Journal of Neurological Sciences.

La température de chauffage des farines animales est abaissée en Angleterre.

1982: Stanley Prusiner (prix Nobel 1997) purifie l'agent infectieux qu'il nomme "prion" pour "protéine infectieuse".
Science.

1985: Les premiers enfants traités par l'hormone de croissance développent la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Début de l'épidémie de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine chez les bovins anglais.

1996: Identification d'un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob; dix cas diagnostiqués en Angleterre (premier cas français en 1998).

A. Introduction

I. Les Maladies à prions

I.1 Les Maladies à Prions chez les mammifères

I.1.1 Les prions de mammifères : épidémie à grande ampleur

I.1.1.1 Les encéphalopathies spongiformes transmissibles touchent de nombreux organismes

La tremblante du mouton a été la première de ces maladies à être découverte puisque c'est en 1730 qu'elle a été décrite pour la première fois en Angleterre. Par la suite, elle a également été trouvée chez d'autres animaux tels que les chats, les vaches, les visons, les biches, les élans ... (Collinge, 2001; Prusiner, 2001) et malheureusement ces encéphalopathies, n'ont pas épargné l'homme (tableaux 1 et 2). Dans les années 1920, deux neurologues allemands, Creutzfeldt et Jakob, identifient une nouvelle maladie neurodégénérative fatale qui portera par la suite leur nom : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJ). Il existe d'autres maladies humaines reliées telles que la maladie de Kuru (figure 1), le syndrome de Gerstmann-Straussler et le syndrome de l'insomnie familiale fatale.



D'après Gajdusek, 1996

Figure 1 : Enfants atteints par la maladie de Kuru.

Les lésions qui caractérisent les encéphalopathies spongiformes bovines (EST) sont : **1-** la spongiose (apparition de trous au sein du cerveau, d'où le terme d'encéphalopathie

spongiforme), **2-** la gliose astrocytaire, **3-** la perte neuronale et **4-** la présence de plaques amyloïdes (figure 2). Ces différentes caractéristiques peuvent varier selon l'organisme touché et la forme de la maladie.

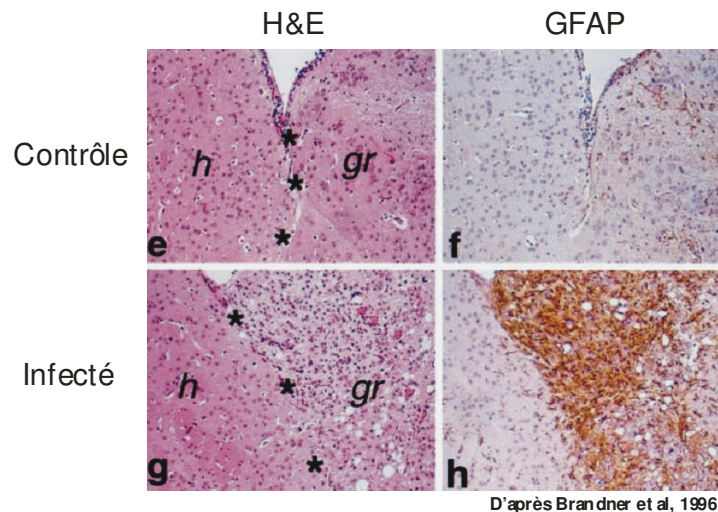


Figure 2 : Coupe microscopique de cerveaux de patients infectés ou non par la maladie.
H&E : marquage contrôle des tissus à l'Hématoxyline et l'Eosine; et GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) : marqueur des cellules gliales. h : host ; gr : graft.

- ✚ **La tremblante du mouton et de la chèvre ou "scrapie"** est connue depuis plus de deux siècles, son caractère infectieux a été démontré dès la fin des années 1930 (Cuillé and Chelle, 1938 : Cuille J, Chelle PL. La tremblante du mouton est bien inoculable. CR Acad Sci Paris 1938 ; 206: 1687-8).
- ✚ **Le terme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob** à été introduit en 1922 par Spielmeyer pour décrire une maladie neuronale humaine caractérisée par une ataxie et une démence vue pour la première fois par Creutzfeldt (1920) et Jakob (1921) et touchant 2 individus sur 1 million par an. En France, environ 80 personnes meurent chaque année de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.
- ✚ **La maladie de Kuru** est décrite en 1950, en étudiant en Australie, les populations de Papouasie de Nouvelle-Guinée qui pratiquent des rites de cannibalisme. Ces populations mangeaient le cerveau des individus décédés pouvant être infecté par le prion. L'interdiction de ces rites cannibales dans le milieu des années 1950 a permis l'interruption de la transmission de la maladie de Kuru ; Ceci est aujourd'hui une opportunité pour l'étude de la période d'incubation de cette maladie. L'étude de John

Collinge révèle une période d'incubation pouvant dépasser le demi-siècle (Collinge et al., 2006). En effet, 11 patients atteints de la maladie de Kuru ont été identifiés entre juillet 1996 et juin 2004 (Collinge et al., 2006). Selon ces derniers résultats, une nouvelle vague de la maladie de Creutzfeldt-Jakob liée au nouveau variant, pourrait être à craindre dans les années à venir.

✚ **L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la "vache folle"**, a été décrite pour la première fois en Grande-Bretagne en 1986. Des études épidémiologiques concluent que l'apparition de la maladie serait due à l'incorporation dans l'alimentation des ruminants, de farines d'origine animale stérilisées de façon incomplète. Les farines auraient pu être contaminées par des carcasses de moutons atteints de tremblante. L'ESB serait ensuite à l'origine du nouveau variant de la maladie de CJ (vCJ) chez l'homme, apparu en Grande-Bretagne en 1995. Par ingestion de viandes contaminées, de nombreuses autres espèces ont développé la maladie (primates, félins et chats domestiques).

✚ **La maladie du dépérissement chronique des cervidés et l'encéphalopathie du vison** sont deux autres exemples d'EST qui touchent respectivement les cerfs, les élans et les visons d'élevage aux Etats-Unis et au Canada. En moins de dix ans, la maladie du dépérissement chronique s'est propagée sur 12 états américains et touche maintenant les cervidés sauvages. Le fait que les cheptels ovin, bovin et que les cervidés d'élevage partagent les mêmes pâturages, a fait craindre aux autorités sanitaires la possibilité d'une transmission inter-espèces de la maladie.

En plus de ces encéphalopathies naturelles, **des encéphalopathies expérimentales** ont été obtenues par inoculations de broyats de cerveaux infectés de différentes espèces (homme, mouton, chèvre, vache) à de petits animaux de laboratoire (souris, hamsters). Ces modèles expérimentaux ont permis une avancée dans le développement des études sur ces EST.

1.1.1.2 Les Encéphalopathies spongiformes transmissibles

Les EST présentent une grande variété de signes cliniques tels que des troubles cognitifs, un dysfonctionnement moteur et une ataxie.

Toutes ces maladies présentent des caractéristiques communes :

- une période d'incubation asymptomatique longue pouvant atteindre jusqu'à 40 ans voire 50 ans (Collinge et al., 2006), alors que la phase clinique est relativement courte (quelques semaines à quelques mois).
- une maladie progressive, irréversible et toujours fatale.
- un examen clinique qui traduit une dégénérescence du système nerveux central (SNC) : incoordination motrice, tremblements et démence mais aussi une atteinte rétinienne (Hortells et al., 2006).
- A l'examen histopathologique *post-mortem*, des lésions confinées au système nerveux central sont mises en évidence. Elles se caractérisent par la formation de vacuoles de spongieuses au niveau des corps cellulaires, des prolongements axonaux et des dendrites neuronales (Hauw et al., 1998), d'une perte neuronale et d'une gliose astrocytaire (Dormont et al., 1981). Pour certaines EST, des plaques amyloïdes constituées de dépôts protéiques amorphes sont parfois observées.
- Aucune réponse immunitaire spécifique cellulaire ou humorale n'est identifiable chez les sujets infectés.
- Par définition, ces maladies sont toutes transmissibles à d'autres individus au sein d'une même espèce et parfois même, d'autres espèces.
- Malgré la présence de titres infectieux très élevés dans le système nerveux central (SNC), aucun agent infectieux ni aucune structure évocatrice d'un micro-organisme n'ont pu être mis en évidence. Les agents responsables de ces encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont donc appelés agents transmissibles non conventionnels (ATNC).
- Le seul marqueur moléculaire spécifique des EST est une forme anormale d'une protéine de l'hôte, la PrP^C, qui s'accumule dans le SNC sous une forme pathologique (PrP^{res} ou PrP^{Sc}), en général proportionnellement au titre infectieux (notion que l'on approfondira plus tard, dans ce manuscrit).

L'ESB, touchant principalement les bovidés (bovins domestiques et diverses espèces de bovidés sauvages, dont les bisons) ainsi que les félidés (dont le chat domestique), est transmise par l'ingestion d'aliments contenant des prions (provenant d'extraits de carcasses d'animaux d'équarrissage, dont l'assouplissement des règles d'incinération (baisse de la température) à permis à une contamination par du prion de persister). Cette affaire aura permis de donner à la recherche les moyens de progresser sur ce type de maladie (tableau 3).

Tableau 3 : Chronologie des grands événements concernant la recherche sur le prion.

Milieu du 18ème siècle: Description de la tremblante du mouton (Scrapie)

1898: Découverte de vacuoles dans le cerveau de mouton atteints de Scrapie.

1920: Description des premiers cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJ) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921).

1939: Transmission expérimentale du Scrapie (cuille et Chelle, 1939).

1955-1957: Découverte de la maladie de Kuru chez les Forés de Papouasie-Nouvelle Guinée (Gajdusek et Zigas, 1957).

1959: Similitudes entre le Kuru et le Scrapie (Hadlow, 1959).

1961: Description de multiples souches de l'agent du Scrapie (Pattison et Millson, 1961).

1961: Transmission du Scrapie à des souris (Chandler, 1961).

1963: Transmission du Kuru à des chimpanzés (Gajdusek et al, 1966).

1966: L'agent du Scrapie est résistant à des radiations ionisantes et aux rayons ultra-violet (Alper et al, 1966).

1967: Annonce de l'hypothèse "Protein-only" (Griffith, 1967).

1968: Transmission du CJ à des chimpanzés (Gibbs et al, 1968).

1974: Première transmission iatrogène documentée (par greffe de cornée) (Duffy et al, 1974).

1980: Découverte d'une protéine hautement hydrophobe et résistante aux protéases dans le cerveau de hamsters infectés par le scrapie (Prusiner et al, 1980).

1982: Annonce du concept prion (Prusiner, 1982).

1982: Clonage du gène codant la PrP^C (Chesebro et al, 1985; Oeschet al, 1985).

1986: Les isoformes PrP^C et PrP^{Sc} sont codées par le même gène (Basler et al, 1986).

1987: Lien entre *Prnp* et les périodes d'incubation du scrapie dans la souris (Westaway et al, 1987)
Premier cas d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) chez les bovins (Wells et al, 1987).

1989: Mutation dans *Prnp* liée au syndrome de Gerstmann-Sträussler (Hsiao et al, 1989).

1992: Délétion du gène *Prnp* chez la souris (Büeler et al, 1992).

1993: Des souris *Prnp0/0* sont résistantes à l'inoculation du Scrapie (Büeler et al, 1993; Sailer et al, 1994).
Différences de structures entre PrP^C et PrP^{Sc} (Pan et al, 1993).

1994: Conversion *in vitro* de PrP^C en PrP^{Sc} (Kocisho et al, 1994).

1996: Identification du nouveau variant du CJ (Will et al, 1996)
Les différentes souches d'ESB ont différentes signatures de glycosylation (Collinge et al, 1996).
Première structure tridimensionnelle du noyau central de la PrP^C murine (Riek et al, 1996).

1997: Preuve que le nouveau variant du CJ est causé par l'agent de l'ESB (Bruce et al, 1997; Hill et al, 1997)
Les lymphocytes B sont nécessaires à la genèse de la pathologie (Klein et al, 1997)

2001: Méthode d'amplification de PrP^{Sc} par "Protein Misfolding Cyclic Amplification" (PMCA) (Saborio et al, 2001).

2003: Stimulation de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} par les ARN (Deleault et al, 2003).

2004: Infection de levures par des fibres de Sup35p recombinantes (Sparrer et al, 2000; Tanaka et al, 2004).

2004: Infection de souris par des fibres de PrP recombinantes (Legname et al, 2004).

2005: Nécessité de l'ancre GPI pour la toxicité du prion (Chesebro et al, 2005).

2006: La période d'incubation peut atteindre 40 ans (Collinge et al, 2006).

1.1.1.3 L'épidémie

La maladie est apparue en Grande-Bretagne en 1986. Depuis cette date et jusqu'à fin septembre 2004, près de 200 000 cas y ont été constatés. Le pic de l'épidémie s'est produit entre 1990 et 1995, le maximum de cas enregistrés s'établit à près de 38 000 en 1992 (source Office International des Epizooties (OIE)).

La maladie a été exportée hors de Grande-Bretagne à partir de 1989, année où 15 cas se déclarent en Irlande. Dans la période 1989-2004, près de 5 000 cas sont recensés hors de Grande-Bretagne, essentiellement en Europe continentale, ainsi que :

- 🇮🇱 En Israël (1 cas en 2002)
- 🇨🇦 Au Canada (3 cas dont 1 en 1993 et 2 en 2003)
- 🇯🇵 Au Japon (13 cas de 2002 à 2004)
- 🇺🇸 Aux Etats-Unis (2 cas de 2004 à 2005)

Les pays les plus touchés sont :

- 🇮🇪 L'Irlande (1 488 cas)
- 🇵🇹 Le Portugal (954 cas)
- 🇫🇷 La France (951 cas)
- 🇨🇭 La Suisse (457 cas)
- 🇩🇪 L'Allemagne (369 cas)

Le 1^{er} août 1999, les instances européennes ont décidé, au grand soulagement des éleveurs britanniques, la levée de l'embargo décrété en Europe en 1996, sur la viande britannique en raison de la crise de la « vache folle ». La France a décidé de ne pas appliquer immédiatement cette décision. Au Canada il a suffi d'un seul cas en Alberta pour que les clients les plus importants, les Etats-Unis et le Japon, prennent des mesures de boycott très sévères.

1.1.1.4 Les nouveaux variants : chez l'homme

Depuis 1996, un lien est fortement soupçonné entre l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), maladie animale et un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jacob, maladie humaine.

❖ **Historique du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob**

En 1994 apparaît en Grande-Bretagne, pays le plus touché par l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Ce variant touche une population plus jeune, proche de la trentaine, qui présente des symptômes très voisins de ceux de l'ESB, tels que bave et perte d'équilibre. Une appréhension gagne alors le milieu scientifique avant de se répandre dans la population.

❖ **Les Encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines :**

Lors de la première description de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJ) en 1920, du syndrome de Gertsman-Straüssler-Scheinker (SGSS) en 1936, et du Kuru en 1957, le caractère transmissible de ces pathologies n'avait pas été suspecté (pour revue : (Richardson and Masters, 1995). C'est seulement en 1959, que William Hadlow montre les similitudes histopathologiques existantes entre le scrapie du mouton qu'il étudiait au *Rocky Mountain Laboratory* et le Kuru.

Il a étudié plus particulièrement la possible transmission du Kuru à des primates (Hadlow, 1959). Il a fallu sept années à Carleton Gajdusek et ses collaborateurs pour transmettre le Kuru puis la maladie de CJ à des chimpanzés (Gajdusek et al., 1966; Gajdusek et al., 1967; Gibbs et al., 1968). À partir de ce moment, les EST humaines et animales sont regroupées au sein d'un seul et même groupe de pathologies.

Les EST humaines peuvent être classées en trois groupes : familiales, iatrogènes (ou infectieuses) et sporadiques (**Tableau 4**).

✚ Les formes familiales ont un mode de transmission de type autosomal dominant, c'est-à-dire que le gène responsable de la maladie est situé sur les chromosomes non sexuels et qu'un seul allèle suffit à exprimer le phénotype. Les formes familiales (fCJ) de la maladie de CJ représentent 15% des cas de CJ. Parmi ces fCJ, le syndrome de Gertsman-Straüssler-Scheinker (SGSS) et l'insomnie familiale fatale (IFF) sont des EST associées à des mutations dans le gène *PRNP* codant la protéine prion. Aujourd'hui, il y a au moins quatorze mutations qui sont liées à cette forme de maladie (Gambetti et al., 2003). L'une d'elle est une mutation insertionnelle dans la région N-terminale de la protéine PrP se traduisant par des copies surnuméraires du motif octapeptidique P(H/Q)GGG(-/G)WGQ. La protéine normale contient cinq copies alors que la plupart des protéines qui ont une mutation insertionnelle en possèdent

neuf. Des travaux récents du groupe de Suzette Priola montrent qu'en système mammifère, une augmentation du nombre de répétitions d'octapeptides est corrélée avec une formation spontanée beaucoup plus rapide d'amyloïdes PrP^{res} due à une plus grande capacité de liaison de cette dernière avec d'autres molécules PrP (Moore et al., 2006). Cette région octapeptidique liant les ions divalents lierait encore plus d'ions Cu²⁺ dans le cas d'une augmentation du nombre de répétitions et favoriserait ainsi l'agrégation des molécules de PrP, les rendant résistantes à la digestion par la protéinase K (Yu et al., 2006). Cette forme familiale survient assez tôt au cours de la vie (entre 30 et 50 ans).

✚ Les formes iatrogènes (iCJ) sont les plus rares (5% de l'ensemble des cas de CJ). Ces formes comprennent le Kuru, dont le cannibalisme tribal a favorisé la propagation en Nouvelle-Guinée au cours des années 1950 à 1970 ; mais aussi les formes iatrogènes de CJ dont la cause principale est l'utilisation d'implants (dure-mère, cornée) ou de produits d'origine humaine (hormone de croissance) provenant de donneurs CJ non détectés. Le nouveau variant de la maladie de CJ (vCJ) serait dû à la consommation de viande bovine infectée par l'agent de l'ESB. En plus du caractère infectieux qui n'est aujourd'hui plus contesté, il existe aussi une composante génétique non négligeable. Tous les patients atteints du vCJ (150 cas dans le monde, à ce jour) sont homozygotes sur le codon 129 de la PrP (Méthionine (M)/Méthionine (M)), alors que cet allèle n'est présent qu'à 37 % dans la population caucasienne, suggérant qu'il sagirait d'un allèle « sensible ». La prédiction du nombre total de cas de vCJ est difficile à estimer car la période d'incubation, les doses reçues ainsi que la fréquence d'exposition ne sont absolument pas connues. Le nombre de personnes ayant été exposées à l'agent de l'ESB est sans doute beaucoup plus important que celui des personnes décédées ou actuellement atteintes. Ceci suggère que l'homme pourrait être partiellement résistant à l'agent de l'ESB. Mais il est également possible que des personnes développent des formes asymptomatiques de l'infection. Ces personnes posent un véritable problème de santé publique pour de futures transmissions sanguines, dons d'organes ou examens exploratoires non invasifs (coloscopie, endoscopie, etc). L'existence d'un état silencieux de l'agent infectieux dans certains organismes a été rapportée au cours d'expériences de transmission inter-espèces souris/hamster (Hill et al., 2000; Race and Chesebro, 1998; Yuan et al., 2006).

La forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sCJ) est la plus fréquente, elle représente 85 à 90 % des cas de CJ et a une incidence de 1 à 2 individus/ million/ an. Aucune mutation génétique ne lui est encore associée. Cependant, dans la population caucasienne, le fait d'être hétérozygote au niveau du codon 129 de la protéine PrP (Méthionine (M)/Valine (V)) diminue nettement la probabilité de développer la maladie. Dans cette population, la fréquence allélique pour le codon 129 est de : 51 % M/V, 37 % M/M et 12 % V/V. La quasi-totalité des patients atteints de sCJ est homozygote (V/V ou M/M) sur le codon 129 de la protéine PrP.

L'origine de la forme sporadique de CJ est encore très floue. Les hypothèses citées ont été : **1-** des mutations somatiques dans la phase ouverte de lecture du gène *PRNP* codant la protéine PrP; **2-** l'exposition à un virus non encore identifié et **3-** la conversion spontanée de la PrP^C en son isoforme pathologique PrP^{Sc} en l'absence de toute mutation.

Les premiers signes observés sont l'apparition de la démence vers l'âge de 60 ans puis de signes neurologiques et moteurs.

Tableau 4 : Les différentes formes de maladie à prion.

Etiologie	Phénotype	Fréquence
<p>Sporadique</p> <p>Distribution aléatoire avec une incidence annuelle de 2 personnes sur un million</p>	<p>Sporadique CJ : Souches multiples associées à différentes signes cliniques</p>	<p>85%</p>
<p>Héréditaire</p> <p>Maladie génétique à transmission autosomique dominante du gène <i>PRNP</i></p>	<p>Plus de 30 mutations ont été identifiées dans les maladies GSS, CJ familiale et l'insomnie fatale familiale</p>	<p>10-15%</p>
<p>Acquise</p> <p>Exposition iatrogène à des prions humains lors d'interventions médicales via des hormones extraites de cerveaux de cadavres infectés, des greffes de tissus infectés, des instruments chirurgicaux contaminés</p>	<p>Iatrogénique CJ</p>	<p>< 5%</p>
<p>Exposition iatrogène à des prions humains lors de rituels cannibales</p>	<p>Kuru</p>	<p>Uniquement dans une petite aire de Nouvelle Guinée</p>
<p>Exposition environnementale (surtout par voie alimentaire) à des souches de prion ESB</p>	<p>Variant de CJ</p>	<p>Principalement en Angleterre (150), en France (6)</p>

CJ: maladie de Creutzfeldt-Jakob; ESB: Encéphalopathie spongiforme bovine; GSS: syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker; PRNP: Gène codant la protéine prion PrP.

1.1.1.5 La vache folle : une crise annoncée

La tremblante du mouton, les farines animales contaminées, la vache rendue folle, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, le Kuru, la contamination par l'hormone de croissance, le prion : comment tous ces éléments ont-ils participé à l'histoire des encéphalopathies spongiformes transmissibles ?

❖ Lien entre la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et l'encéphalopathie spongiforme bovine

En décembre 1999, Stanley B. Prusiner, Prix Nobel de médecine 1997, et Michael R. Scott, fournissent la démonstration, que l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine est bien à l'origine de la nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJ) à la suite d'une élégante série d'expériences menées sur des souris transgéniques exprimant le gène codant le prion d'origine bovine (Scott et al., 1999).

Aujourd'hui, la communauté médicale admet que l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine est capable d'infecter l'homme.

❖ La "crise de la vache folle"

Dès que les médias se sont emparés de l'affaire et que le public découvre le problème, une violente crise éclate

✚ **Crise symbolique** : le public découvre que dans les élevages, les vaches ne mangent pas que de l'herbe, mais aussi des compléments alimentaires d'origine animale.

✚ **Crise économique** : le public applique, à son échelle, le principe de précaution et la consommation de viande bovine s'effondre. Les mesures de prévention des autorités, très médiatisées et très impressionnantes (en France : abattage du troupeau entier en cas de découverte d'un cas), loin de rassurer, contribue à alimenter l'inquiétude.

L'affaire de l'«équarri-taxe» en France

En France, l'équarrissage (enlèvement des animaux morts, en ferme ou en sortie d'abattoir, impropres à la consommation et qu'il convient d'éliminer le plus rapidement possible) relève du service public. Très coûteux, il constituait depuis longtemps un problème financier. Jusqu'à présent, il était possible de valoriser certains produits du traitement des cadavres,

mais depuis l'affaire de la « vache folle », il a été décidé de tout détruire, avec en conséquences, deux effets importants: perte de revenus directs, et hausse des volumes à détruire et donc des coûts. S'y ajoutait, en plus, un problème de stock et de frais de stockage. En 1996 c'est donc la distribution de viande qui sera taxée. En 2003, la cour de justice européenne condamna définitivement cette taxe. Désormais, la « taxe sur l'abattage » est la seule en vigueur car elle respecte le principe « pollueur-payeur ».

I.2 Le coupable

Mais en quoi consiste vraiment ce prion qui a causé toutes ces pertes ?

I.2.1 Les agents transmissibles non conventionnels

Le terme d'agent transmissible non conventionnel (ATNC) a été donné aux agents étiologiques des EST en raison de leurs particularités biologiques et physiques assez inhabituelles. En effet, ils sont résistants aux principaux procédés habituellement utilisés pour inactiver les microorganismes :

- ✚ Chaleur
- ✚ Rayonnements Ultra-Violets
- ✚ Radiations ionisantes
- ✚ Soude (NaOH)
- ✚ Hypochlorite de sodium
- ✚ Détergents
- ✚ Dérivés phénoliques
- ✚ Le peroxyde d'hydrogène
- ✚ Thiocyanate de guanidium

Nature des ATNC

La nature exacte des ATNC dont la taille a été estimée entre 15 et 40 nanomètres (Pocchiari et al., 1987) est longtemps restée un sujet à controverses. Virus, virino, prion ? Aujourd'hui, l'hypothèse du prion semble clairement la plus vraisemblable bien que plusieurs propriétés de ces agents démentiraient l'existence d'un agent purement protéique.

I.2.2 Hypothèses virales

Dans les années 1970, les travaux d'Alan Dickinson permettent d'ouvrir la voie sur la nature éventuelle de l'agent. Le travail de cette équipe sur des souris syngéniques (qui possèdent le même patrimoine génétique) a conduit à émettre l'idée d'un virus responsable de ces EST. Cependant, les études d'inactivation de ces agents par l'irradiation, la chaleur et les processus chimiques montrant que ces traitements étaient inefficaces, ont remis en cause cette conclusion (Rohwer, 1991). Mais l'hypothèse d'un virus ne peut pas être définitivement éliminée en raison de la résistance à la chaleur de l'agent, puisque certains virus isolés de bactéries ont été décrits comme pouvant résister à des températures de 93°C et des pH très faibles (Rice et al., 2001). Néanmoins, ce virus, responsables des EST, n'a jamais pu être observé.

De plus, les données concernant la présence d'acides nucléiques sont très ambiguës : certaines n'ont pas réussi à identifier un acide nucléique de la taille d'un génome potentiel (Kellings et al., 1994) alors que d'autres décrivent la présence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de très petite taille (Diringer et al., 1997; Ozel et al., 1994). Par ailleurs, l'équipe de Surachai Supattapone a montré que des molécules d'ARN de taille supérieure à 300 nucléotides pouvaient stimuler la conversion de la protéine PrP^C en protéine pathologique (Deleault et al., 2003).

Enfin l'absence de réaction immunitaire (Porter et al., 1973), contrairement à ce qui est observé pour toutes les autres infections virales conventionnelles humaines ou animales, la longueur inhabituelle de la période d'incubation et les propriétés exceptionnelles de ces agents ont conduit à plusieurs hypothèses :

- ✚ un virus lent (Kaneko et al., 1997).
- ✚ un rétrovirus conventionnel qui repose sur l'aptitude de certains virus neurotropes à induire des modifications membranaires sans réponse inflammatoire (Manuelidis et al., 1987).
- ✚ un virus amyloïdogénique contenant une information génétique propre. L'accumulation de la PrP^{res} sous forme amyloïde résulterait de la réplication du virus (Diringer, 1991).
- ✚ un virino composé d'une structure hybride contenant un petit acide nucléique infectieux nu (qui ne coderait pour aucune protéine virale susceptible d'être reconnue par le système immunitaire) protégé par une coque de protéines codées par l'hôte (Dickinson and Outram, 1988).

Cependant, aujourd'hui, aucune de ces hypothèses n'a pu être vérifiée.

I.2.3 Hypothèse protéique : le prion

Elaboration de l'hypothèse

L'hypothèse « purement protéique » a été pour la première fois avancée par **Tikvah Alper en 1966** suite à ses travaux montrant que les Ultra-Violets, qui détruisent habituellement les acides nucléiques et donc les virus, n'avaient aucun effet sur l'agent responsable de la tremblante du mouton (Alper et al., 1967).

J.S. Griffith en 1967 a repris le concept de la protéine seule en proposant que sous certaines conditions, des protéines pouvaient s'auto-répliquer et agir comme un agent infectieux (Griffith, 1967).

Cependant, cette théorie allait à l'encontre de tous les dogmes de la biologie moléculaire de l'époque et ses résultats ont été ignorés jusqu'en **1982**, date à laquelle **Stanley B. Prusiner** a publié une étude montrant que l'agent de la tremblante ne contenait pas d'acides nucléiques (Prusiner, 1982). Lorsque l'on exposait un extrait de cerveau infecté à des protéases, il était partiellement résistant. Ceci leur a permis d'en déduire que le marqueur de l'infection serait une protéine qu'ils ont appelé « prion » pour « proteinaceous infectious particle ». Pour cette découverte, Stanley B. Prusiner a été récompensé par le prix Nobel en 1997. La protéine infectieuse a ensuite été isolée et nommée PrP 27-30 en raison d'un poids moléculaire de la protéine entre 27 et 30 kDa après hydrolyse au niveau du domaine sensible à la protéinase K (PK). A cette époque, les scientifiques pensaient toujours que ce « prion » n'était qu'une protéine étrangère à l'hôte et utilisant toute la machinerie cellulaire pour se répliquer.

Ce n'est qu'en **1985**, que **Bruce Chesebro et Bruno Oesch** ont montré l'existence d'une protéine très similaire à celle du prion chez le hamster sain et la souris saine (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Ces travaux ont révélé que chez les animaux malades, la PrP existait à la fois sous une forme normale (PrP^C pour PrP cellulaire) et sous une forme anormale pathologique (PrP^{Sc} pour PrP scrapie, également nommée PrP^{res} pour PrP résistante à la dégradation par les protéases) (Meyer et al., 1986).

En 1993, les travaux de **Hansruedi Büeler** ont en partie permis de confirmer l'hypothèse de la protéine seule. En effet, l'inoculation, à des souris *Prn^{P0/0}* n'exprimant pas de PrP^C, avec un homogénat extrait d'un cerveau d'une souris infectée a montré que ces souris ne développaient pas la maladie (Büeler et al., 1993). La présence de PrP^C est indispensable à l'infection. Néanmoins, la démonstration de l'hypothèse de la protéine seule par ces expériences de souris transgéniques n'est pas suffisante pour certains auteurs qui postulent

que la PrP^C pourrait représenter le récepteur pour un virus encore non identifié. Selon eux, l'invalidation du gène *PrnP* pourrait plutôt conférer à la souris une résistance virale.

Mais, ces dernières années, plusieurs travaux vont clairement dans le sens de l'hypothèse protéique :

1- l'infectiosité est considérablement réduite par des agents qui détruisent la structure de la protéine tels que des anticorps anti-PrP (Enari et al., 2001; Peretz et al., 2001).

2- les études dans un système acellulaire et par PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*) ont permis de mettre en évidence la capacité de la PrP pathologique à convertir la PrP^C en PrP^{res} *de novo* (Castilla et al., 2005; Kocisko et al., 1994; Saborio et al., 2001). Cependant, cette technique ne conforte pas complètement la théorie de « la protéine seule » puisque l'infectiosité est générée à partir d'un extrait total et non de la PrP^C purifiée.

Cependant, cette hypothèse prion présente certaines limites :

1- les EST apparaissent sous la forme de différentes souches caractérisées par différentes périodes d'incubation, manifestations cliniques et neuropathologiques (Prusiner, 1998). Ce phénomène de souches fait également penser à ce que l'on retrouve dans le cas des infections virales. Il pourrait néanmoins être dû à une conformation ou un état d'agrégation différents (Caughey et al., 1998a; Safar et al., 1998)

2- l'infectiosité peut se propager sans PrP^{res} détectable (Lasmezas et al., 1997), et inversement, des échantillons peuvent contenir beaucoup de PrP^{res} sans être forcément infectieux (Hill et al., 2000)

3- un autre argument contre l'hypothèse de la protéine seule vient du fait que les EST, sont les seules des amyloïdoses classiques à être transmissibles expérimentalement. Les interactions protéiques communes à toutes les amyloïdoses ne peuvent donc pas expliquer à elles seules le caractère unique de transmissibilité des EST (Chesebro, 1998) ainsi que la grande variabilité des souches d'ATNC. Cependant, une étude a montré la transmissibilité d'une amyloïdose selon un mécanisme ressemblant à celui du prion (Lundmark et al., 2002). Si cela était confirmé par d'autres équipes et pour d'autres amyloïdoses, il semblerait alors que l'hypothèse de la protéine seule soit vérifiée.

Par ailleurs, une étude récente de l'équipe de Stanley B. Prusiner sur de la PrP recombinante semble confirmer cette hypothèse. En effet, le seul argument qui pourrait entièrement confirmer l'hypothèse du prion viendrait de la démonstration de la génération *de novo* de l'infectiosité à partir de PrP^C dans un système *in vitro* acellulaire, système qui ne permettrait la réplication d'aucun virus. Stanley B. Prusiner a montré que l'inoculation intracérébrale à

des souris de PrP murine synthétique produite chez *Escherichia coli* polymérisée en fibrilles amyloïdes entraînait l'apparition dans le cerveau de PrP^{res} et de signes neuropathologiques (Legname et al., 2004). Si ces données sont confirmées, cela pourrait représenter la démonstration finale que les agents étiologiques des EST sont bien des protéines infectieuses.

Il est à noter que de telles preuves biologiques ont déjà été rapportées pour les prions de différents champignons :

- levures (King and Diaz-Avalos, 2004; Sparrer et al., 2000; Tanaka et al., 2004)
- Podospora (Maddelein et al., 2002)

I.2.4 Définition du terme PRION

Le terme "prion" a été créé par Stanley B. Prusiner pour désigner les agents non conventionnels responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), maladies du système nerveux central qui peuvent être héréditaires, sporadiques ou infectieuses, mais toujours létales. De nature protéique, apparemment dépourvus d'acide nucléique spécifique, les prions sont caractérisés par la capacité qu'a la forme pathogénique de la protéine infectieuse à transmettre ses propriétés à l'isoforme normale de la même protéine *via* des interactions protéine-protéine. Cette propriété serait responsable de l'infectiosité et conduirait à une destruction sélective des cellules nerveuses chez les mammifères.

I.2.4.1 L'agent secret des maladies à prions

Que sait-on vraiment de la biologie du prion ? Cette mystérieuse protéine à (au moins) deux visages joue un rôle fondamental dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles. Lorsqu'elle s'accumule, elle est toxique pour les cellules du cerveau. Mais comment une protéine naturelle peut-elle devenir infectieuse ? Comment expliquer qu'au sein d'une même espèce elle puisse se présenter sous de nombreuses variantes ? La série de questions qui demeurent sans réponse semble plaider en faveur de l'existence d'un agent pathogène associé. Si ce dernier existe, il reste encore à découvrir.

I.2.4.2 La protéine Prion : découverte

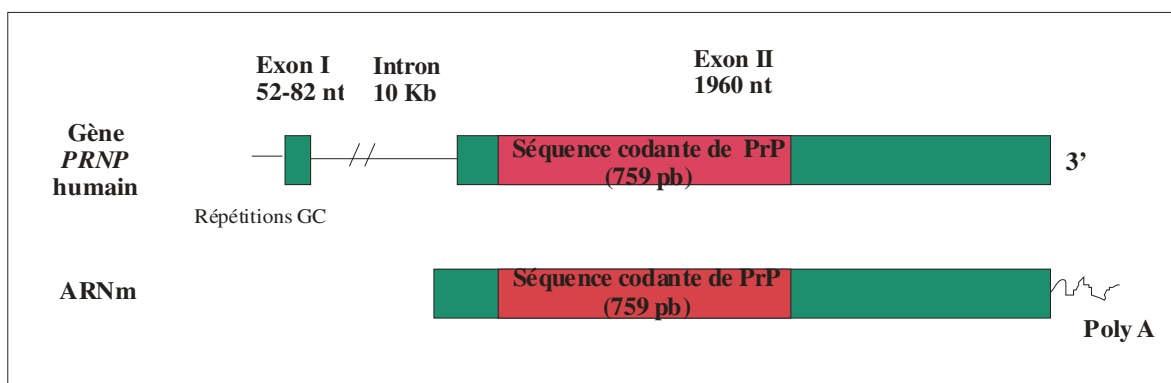
C'est la purification de fractions infectieuses à partir de cerveaux de hamsters infectés qui a permis la découverte de la protéine du prion ou PrP, protéine existant de manière naturelle chez l'hôte (PrP^C) et s'accumulant sous une forme pathologique (PrP^{res}) au cours des EST (Prusiner, 1982). Aujourd'hui, la forme pathologique de PrP représente le seul marqueur moléculaire détectable de ces maladies.

I.2.5 La protéine prion PrP : les deux faces de la protéine

I.2.5.1 PrP^C

Le gène *PRNP* humain code une protéine de 253 résidus qui peut être considérée comme le précurseur de la PrP.

Ce gène est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme (*PRNP*), le chromosome 2 chez la souris (*Prnp*), le chromosome 13 chez l'ovine (*Prnp*) et est très conservé chez tous les mammifères (Westaway and Prusiner, 1986), ce qui suggère une fonction essentielle pour ce gène. Récemment, un analogue conservé a été identifié en aval du gène *Prnp*, appelé *Prnd* et codant pour la protéine Doppel (acronyme de downstream prion protein-like gene) (Moore et al., 1999). Cette protéine ne possède que 19% d'identité avec la protéine prion mais la protéine Doppel a vraisemblablement eu une évolution divergente par rapport à la protéine PrP, ce qui l'aurait conduite à acquérir de nouvelles propriétés.



D'après Lee and Eisenberg, 2003

Figure 3 : Représentation de la structure du gène *PRNP* et de l'ARN messager correspondant.

❖ Polymorphisme et mutations

Chez l'homme, le polymorphisme le plus connu se situe au niveau du codon 129 (méthionine ou valine) et semble associé à l'infection. En effet, l'homozygotie pour la méthionine au codon 129 représente 83% des cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob (Hauw et al., 2000). Un polymorphisme au niveau des codons 171 et 219 a également été décrit. Par ailleurs, des mutations ponctuelles et des insertions représentées sur la figure 4 sont également liées aux maladies humaines familiales (fCJ, SGSS ou IFF).

Chez le mouton, le polymorphisme des codons 136 (Alanine ou Valine), 154 (Arginine ou Histidine) et 171 (Arginine ou Glutamine) est aussi associé à une sensibilité ou une résistance plus importante.

❖ Structure de la protéine PrP

Les formes pathologique et normale de la PrP possèdent la même structure primaire, mais diffèrent par leurs structures secondaires et tertiaires.

Structure primaire

Le gène *PRNP* code une protéine humaine de 253 acides aminés qui contient plusieurs domaines. Cette protéine est une protéine glycosylée de poids moléculaire compris entre 33 et 35 kDa.

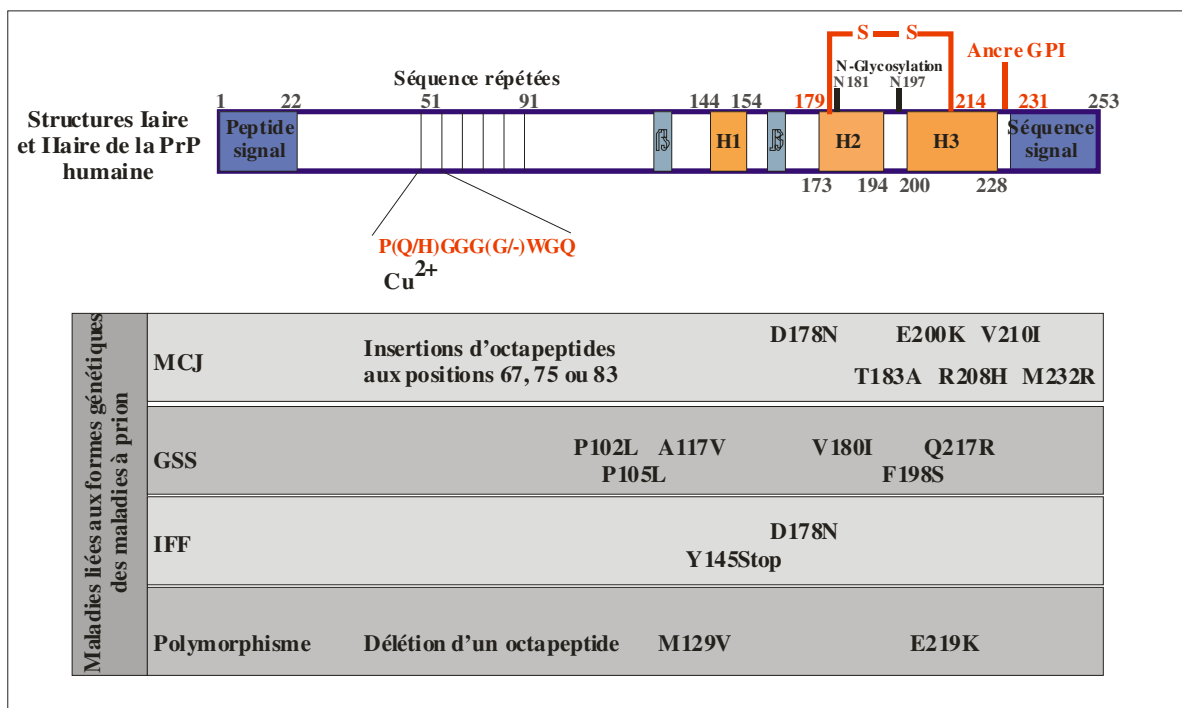


Figure 4 : Position des différentes mutations et différents polymorphismes au niveau du gène *PRNP* humain : La protéine précurseur comporte 253 acides aminés. Lors de sa maturation, le peptide signal N-terminal de 22 acides aminés est clivé et les 23 résidus C-terminaux sont remplacés par une ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI). Deux domaines composent la protéine PrP^C mature (23-231). D'une part, une région N-terminale (23-120) qui contient 5 répétitions d'un octapeptide riche en proline et en glycine, pouvant se lier à des ions cuivre. Elle ne présente aucune structure secondaire. D'autre part, un cœur structuré (120-231) présentant 3 hélices α (H1 : 144-154 ; H2 : 173-194 et H3 : 200-228) et un petit feuillet β anti-parallèle (128-131 et 161-164). Cette région C-terminale comprend aussi 2 sites de N-glycosylation sur les résidus Asn 181 et Asn 197 et un pont disulfure établi entre les 2 résidus Cys 179 et Cys 214. Ce sont dans les hélices α de ce second domaine que se retrouvent la plupart des mutations à l'origine des formes génétiques des maladies à prion humaines : maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJ), syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (SGSS) et insomnie fatale familiale (IFF). En outre, plusieurs polymorphismes de la protéine sont connus.

La séquence complète de la protéine PrP est composée de :

- ✚ un peptide signal de 22 acides aminés qui est clivé au niveau du réticulum endoplasmique dès le début de la traduction

- ✚ une extrémité N-terminale (23-91) qui contient des répétitions de cinq octapeptides et d'hexapeptides qui sont clivées lors de la digestion partielle par la protéinase K. Elle contient aussi à ce niveau les sites de liaison au cuivre ou pour les glycosaminoglycanes (23-35)

- ✚ la région 91-135 qui contient entre les acides aminés 115 et 135 une région hydrophobe très conservée entre les espèces. La séquence 110-135 correspond au site d'insertion transmembranaire potentiel de la protéine (TM1). Cette région contient également les acides aminés 106 à 126 dont le peptide correspondant a été fortement étudié en raison de ses propriétés neurotoxiques (pour revue, (Forloni, 1996))

- ✚ la région 136-231 qui contient deux sites de N-glycosylation au niveau des acides aminés 181 et 197, sur lesquels différents N-glycanes peuvent se positionner et sont responsables des trois états de glycosylation de la protéine (non glycosylée, mono ou bi-glycosylée). Cette région comprend aussi deux cystéines en position 179 et 214 permettant la formation d'un pont di-sulfure. C'est également dans cette région que se trouve le site de liaison (144-179) de la PrP au LRP/LR (*Laminin Receptor Precursor*) qui semble jouer le rôle de récepteur à la protéine (Hundt et al., 2001) et intervenir dans l'endocytose de la PrP. Enfin, la sérine en position 231 permet la liaison d'une ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) qui autorise l'ancrage de la PrP au feuillet extracellulaire de la membrane plasmique (Stahl et al., 1987) et qui est requis pour la toxicité de la protéine PrP (Chesebro et al., 2005); une hypothèse consiste à dire que l'ancrage à la membrane de PrP^{Sc} via l'ancre GPI permet la transduction de signaux « neurotoxiques » (Harris and True, 2006) alors qu'au contraire, l'ancrage de PrP^C est important pour la transduction de signaux « neuroprotecteurs » (Roucou and LeBlanc, 2005)

- ✚ une extrémité C-terminale (232-253) hydrophobe clivée lors de la maturation de la protéine qui sert de signal à l'addition du GPI sur la sérine 231.

Ainsi, les modifications post-traductionnelles peuvent se résumer en quatre étapes principales :

- ✚ le clivage du peptide signal amino-terminal
- ✚ le clivage des vingt-trois résidus de l'extrémité carboxy-terminale et l'addition d'un groupement glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) sur un résidu sérine permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique
- ✚ la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines 179 et 214
- ✚ l'addition de deux groupements d'oligosaccharides sur les résidus asparagine 181 et 197.

Structures secondaire et tertiaire

La structure tridimensionnelle de la PrP recombinante sans son ancre GPI a été obtenue par résonance magnétique nucléaire (RMN) (figure 5). Trois hélices α et deux feuillets β structurent la partie carboxy-terminale de la PrP (43 % d'hélice α et 3 % de feuillet β). Le domaine carboxy-terminal de la PrP est globulaire tandis que l'extrémité amino-terminale est flexible et libre de mouvement (Donne et al., 1997; Riek et al., 1996). Il est possible que le domaine amino-terminal de la PrP acquière sa structure définitive après liaison du cuivre ou après insertion de la PrP dans la membrane plasmique *via* son ancre GPI. La PrP recombinante a été utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle de la partie C-terminale (121-231) de la protéine PrP^C (James et al., 1997; Riek et al., 1997).

Ainsi, pour la PrP murine et humaine (Riek et al., 1997; Zahn et al., 2000) la structure de la PrP^C consiste en 3 hélices α (144-154, 173-194, 200-228) et deux feuillets β antiparallèles (128-131 et 161-164). Près du petit feuillet β , le pont disulfure fait la connexion entre les hélices α 2 et 3. La région entre le feuillet β et l'hélice 2 (166-171) n'a pas pu être déterminée avec précision en raison d'une relative flexibilité. Cette région a pourtant son importance, puisque des études sur des animaux transgéniques avec des mutations dans cette région semblent indiquer que le phénomène de barrière d'espèce se situe dans cette région. La structure tridimensionnelle dépend également de la présence de groupes glycosylés pouvant se lier à la PrP et la partie N-terminale au niveau des répétitions d'octapeptides pouvant lier des ions cuivre qui pourraient stabiliser la structure en hélices α (Miura et al., 1996).

Il faut bien noter que cette structure tridimensionnelle de la PrP^C par RMN est une structure monomérique. Or, plusieurs études ont montré que la PrP pouvait se dimériser par formation de ponts disulfures intramoléculaires ou intermoléculaires (Jensen et al., 2001; Meyer et al., 2000).

a

	Hélices α (%)	Feuillets β (%)
PrP ^C	43	-
PrP ^{Sc}	20	34
PrP27-30	29	31

b

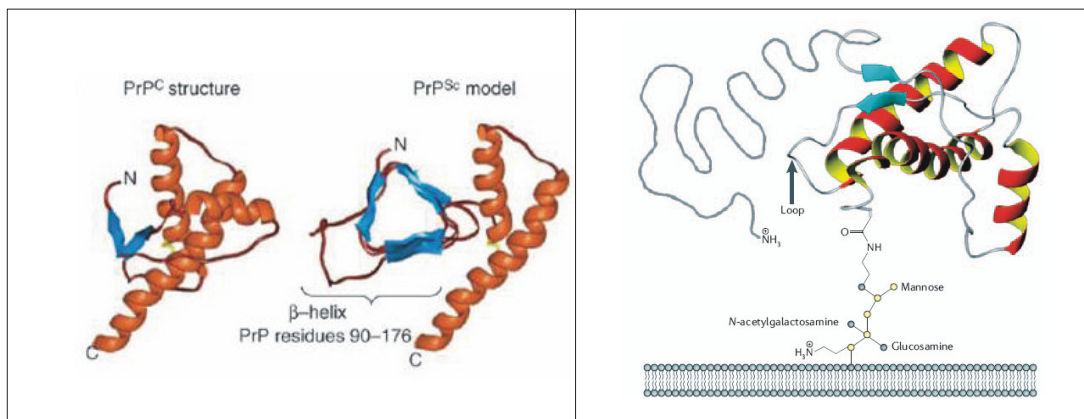


Figure 5 : Pourcentage d'hélices α et de feuillets β au sein de la protéine PrP ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine PrP recombinante.

a. La protéine PrP sous conformation non prion est essentiellement constituée d'hélices α (43%) alors que sous conformation prion, la protéine serait essentiellement constituée de feuillets β (34%).

b. Sur la structure de gauche, la structure tridimensionnelle de la PrP^C est représentée à partir de la PrP recombinante de souris (121-231) et la structure de PrP^{Sc} est un modèle proposé par Govaerts et al. En orange sont représentées les hélices α et en bleu, les feuillets β . La structure de droite représente PrP^C avec son ancre GPI.

❖ Biosynthèse et localisation cellulaire de la PrP

La PrP est localisée à la surface des cellules où elle est ancrée dans la membrane plasmique par son extrémité C-terminale liée à une ancre GPI (glycosyl phosphatidyl inositolphosphate) (Stahl et al., 1987).

Comme toutes les autres protéines membranaires et sécrétées, la PrP^C est dirigée vers le réticulum endoplasmique (RE) par le peptide signal où la protéine subit des modifications post-traductionnelles, telles que l'addition de glycanes, de l'ancre GPI et de la création d'un pont disulfure (Haraguchi et al., 1989; Turk et al., 1988) (figure 6a). La plupart des molécules de PrP^C sont transportées au niveau de la surface des cellules, où la protéine se localise au niveau de microdomaines résistants aux détergents (DRM) riches en sphingolipides appelés « rafts » (Naslavsky et al., 1997), domaines décrits comme lieu de conversion de la PrP^C en PrP^{res} (Kaneko et al., 1997; Taraboulos et al., 1995). Par ailleurs, il existe deux autres formes transmembranaires de la PrP^C, CtmPrP ou NtmPrP (Hegde et al., 1999). CtmPrP, dont le peptide signal n'est pas clivé, semble se localiser dans le RE (Stewart et al., 2001) et a été proposée pour intervenir dans les mécanismes de la pathogenèse (Hegde et al., 1999).

Une fois à la surface cellulaire, toutes les molécules de PrP ne restent pas localisées à ce niveau de la cellule (figure 6b). Plusieurs études ont mis en évidence un recyclage de la PrP (Harris et al., 1993) vers un compartiment d'endocytose, soit *via* les vésicules de clathrine (Harris, 2003), soit par l'intermédiaire de structures moins classiques appelées cavéoles (Peters et al., 2003). En réponse au cuivre, la PrP internalisée est retrouvée au niveau périnucléaire colocalisée avec des marqueurs des endosomes tels que la transferrine, FM4-64 et Rab5 (Lee et al., 2001; Magalhaes et al., 2002). La partie N-terminale de la PrP est une région essentielle pour l'efficacité de l'endocytose par la clathrine. En effet, la PrP délétée pour cette région s'accumule à la membrane plasmique (Sunyach et al., 2003).

Le recrutement des vésicules de clathrine pour l'endocytose de la PrP est étonnant puisque, comme les autres protéines à ancre GPI, la PrP ne possède pas de domaine cytoplasmique pouvant interagir directement avec la clathrine. L'équipe de Harris a donc postulé l'existence d'un récepteur à la PrP^C qui serait une protéine transmembranaire possédant ce signal de localisation dans son domaine cytoplasmique et dont l'extrémité N-terminale interagirait avec la PrP^C. Les candidats pourraient être par exemple le récepteur à la laminine LRP/LR (Gauczynski et al., 2001).

Bien que l'expression de la PrP^C soit ubiquitaire dans le cerveau, les immuno-marquages les plus intenses sont obtenus dans le bulbe olfactif et le cortex cérébral. Majoritairement neuronale, la PrP^C est plus intensément exprimée dans les neurones GABAergiques (Ford et al., 2002). Dans le cervelet, les messagers de la PrP sont fortement exprimés dans les cellules de Purkinje et se retrouvent à des niveaux plus modestes dans les cellules granulaires. Les études d'immuno-localisation ont montré la présence de la PrP^C dans le bouton synaptique des neurones (Fournier et al., 1995). En outre, la PrP^C peut être libérée dans le milieu extra-

cellulaire au cours d'un processus appelé "shedding" (figure 6b) (Parizek et al., 2001; Parkin et al., 2004).

Enfin, les expériences de "pulse chase" ont permis de déterminer, pour PrP^C un temps de demi-vie d'environ 6 heures (Caughey and Raymond, 1991). La PrP^C est internalisée de façon constitutive mais aussi induite.

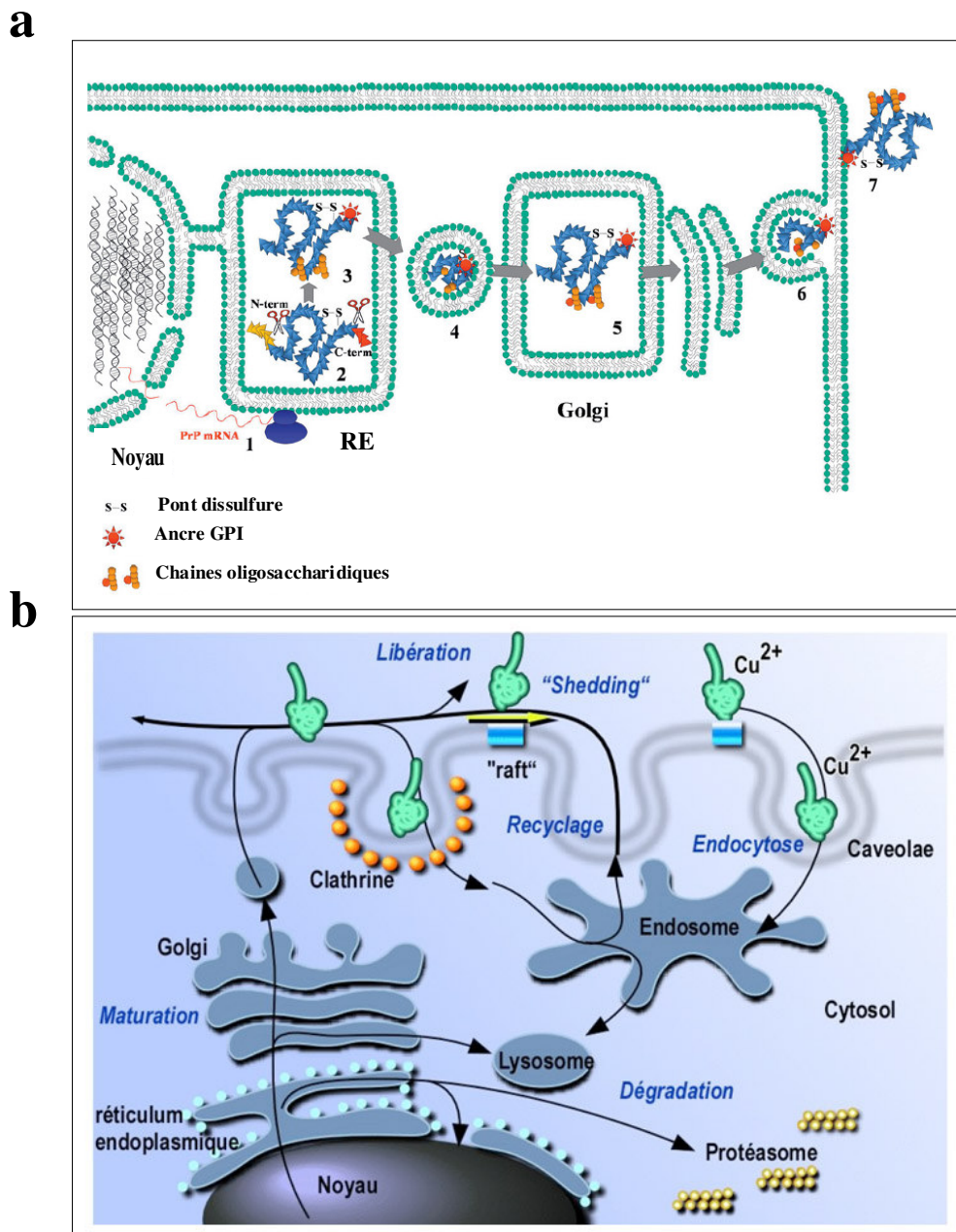


Figure 6 : Biosynthèse de PrPc.

a. La protéine est produite dans le réticulum endoplasmique (RE) où les modifications post-traductionnelles ont lieu, puis transite dans l'appareil de Golgi avant de s'ancrer dans la membrane *via* son ancre GPI.

b. Après ancrage à la membrane, la protéine PrP peut être internalisée de deux façons: par la voie clathrine ou bien par la voie des cavéoles *via* sa liaison avec les ions cuivre. Le processus appelé "shedding" permet de libérer la protéine dans le milieu extracellulaire.

❖ Fonctions de la PrP^C

Bien que des années se soient écoulées depuis la création des lignées de souris *Prnp0/0*, aucune idée claire ne s'est dégagée quant à la fonction physiologique de la PrP^C. Les études phénotypiques des souris *Prnp0/0* n'ont révélé que des anomalies neurophysiologiques mineures en relation avec l'excitabilité neuronale et la régulation du cycle circadien (Raeber et al., 1998; Tobler et al., 1996). Néanmoins, plusieurs hypothèses plus ou moins fondées ont été avancées dont certaines sont énoncées dans le tableau 5.

Une stratégie permettant de cerner le rôle de la PrP^C dans le métabolisme cellulaire normal consiste à rechercher des partenaires protéiques. Une protéine de 66 kDa capable de lier la PrP^C a été identifiée (Martins et al., 1997). Cette protéine, "*Stress-inducible protein 1*" (STI1), interagissant avec la PrP^C induirait un signal de neuroprotection empêchant l'apoptose des neurones (Chiarini et al., 2002).

Plusieurs protéines candidates ont également été isolées par la méthode de "double hybride". Cette méthodologie a révélé l'association possible de la PrP^C avec des protéines impliquées dans l'adhésion et la mobilité cellulaires comme N-CAM, (Schmitt-Ulms et al., 2001) et le récepteur de la laminine ainsi que la protéine de choc thermique Hsp60 (Rieger et al., 1997) et enfin, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Kurschner and Morgan, 1995). La confirmation de ces interactions *in vivo* n'a toujours pas été réalisée.

Par ailleurs, l'expression de formes de la PrP déléchées au niveau amino-terminal (acides aminés 32-121 ou 32-134) induit une dégénérescence importante des cellules granulaires du cervelet se traduisant par une ataxie et une mort prématurée des souris. Le mécanisme de cette toxicité n'est pas connu, mais peut être supprimé si la PrP^C sauvage est exprimée conjointement aux transgènes déléchères (Shmerling et al., 1998). Outre l'importance de l'extrémité amino-terminale de la PrP^C, ce modèle expérimental suggère l'existence d'interactions essentielles entre la PrP^C et des partenaires cellulaires. La PrP^C pourrait jouer un rôle crucial dans la mise en place des différents types cellulaires et le développement harmonieux du cervelet.

Ce sont surtout les études concernant les molécules interagissant avec la PrP qui ont conduit à diverses hypothèses sur les fonctions potentielles de cette protéine :

Tableau 5: Les différents rôles “présumés” de la protéine PrP

Type cellulaire	Processus	Fonction	Mécanismes et ligands
Neurone	Génése des neurites	Adhésion, signalisation	Recrutement des NCAM dans les rafts permettant l'activation de la kinase Fyn, Liaison aux laminines, STII et LRP
	Polarisation	Signalisation	PrP ^C agit comme facteur de croissance
	Survie	Anti-apoptotique Pro-apoptotique	Interaction avec Bax Liaison avec l'anti-apoptotique Bcl-2
	Liaison du cuivre	Endocytose du cuivre	Induit l'agrégation de PrP ^C , sa sortie des rafts et son endocytose clathrine-dépendante
Homéostasie du cuivre		Maintien du niveau de cuivre nécessaire aux membranes présynaptiques et durant les conditions de stress oxydatif	
Activité superoxyde dismutase (SOD)		En se liant au cuivre, PrP ^C aurait une fonction SOD	
Cellules souches neurales	Génése des neurones	Inconnue	Augmentation de la prolifération cellulaire dans les régions neuronales
	Différenciation	Inconnue	Le niveau de PrP ^C influence positivement la différenciation
Cellules souches hématopoïétiques	Renouvellement	Anti-apoptotique?	Transduction d'un signal de survie ou fonction de co-récepteur pour les hormones affectant les cellules hématopoïétiques??
Les cellules T	Activation	Signalisation	Régulation positive de PrP ^C sur des facteurs d'activation
	Développement	Anti-oxidant?	Liaison du cuivre au niveau du thymus
Leucocytes	Différenciation	Inconnue	Expression de PrP ^C par les lignées qui donneront les lymphocytes et monocytes
	Phagocytose	Inconnue	PrP ^C module la phagocytose
	Réponse inflammatoire	Inconnue	PrP ^C altère le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation

Survie cellulaire

La PrP^C peut se lier au facteur anti-apoptotique Bcl2 (Kurschner and Morgan, 1995) et protéger des cultures primaires de neurones humains contre la mort cellulaire induite par Bax à des niveaux équivalents à la fonction neuroprotective de Bcl2 (Bounhar et al., 2001).

Par ailleurs, la perte de l'activité antioxydante médiée par la PrP^C pourrait être en partie impliquée dans les maladies à prions (Wong et al., 2000). La PrP^C liée au cuivre possède une activité superoxyde dismutase (Brown et al., 1999) et des neurones *PrnP0/0* sont plus sensibles au stress oxydatif que des neurones *PrnP+/+* (Brown et al., 1997). Néanmoins, la surexpression de PrP^C sensibilise des cellules à la mort cellulaire induite par la staurosporine

et augmente l'activité de la caspase 3, enzyme impliquée dans la voie apoptotique (Paitel et al., 2002). Enfin, la PrP^C cytosolique qui s'accumule anormalement consécutivement à un dysfonctionnement du protéasome montre une plus forte résistance aux protéases et une toxicité accrue (Ma et al., 2002).

Adhésion

La PrP^C est tout d'abord un récepteur à haute affinité pour la laminine (Graner et al., 2000). En se liant à ce partenaire, la PrP^C affecte à la fois l'adhésion cellulaire neuronale mais aussi la formation de neurites (Graner et al., 2000). D'autre part, l'interaction de la PrP^C avec la tyrosine kinase p59fyn elle-même impliquée dans la croissance neuritique par l'intermédiaire de N-CAM (Mouillet-Richard et al., 2000) et l'interaction directe de la PrP^C avec N-CAM (Schmitt-Ulms et al., 2001) confirment un rôle potentiel de la PrP^C dans l'adhésion cellulaire. Par ailleurs, le LRP (récepteur à la laminine) peut se lier à la PrP^C présente sur d'autres cellules, contribuant ainsi à la communication intercellulaire et à la survie. LRP peut aussi lier la PrP^{res} ce qui lui conférerait un rôle dans la propagation de l'infectiosité. Cette interaction entre ces deux partenaires s'établit par l'intermédiaire des glycoaminoglycanes (GAG) et notamment des héparanes sulfates (Hundt et al., 2001) qui ont été largement décrits pour intervenir dans l'adhésion cellulaire.

Fonction synaptique

L'absence de PrP^C au niveau des synapses conduit à une altération de la formation de celles-ci ainsi que du rythme circadien. Ces analyses ont permis de suggérer que cette protéine pouvait être impliquée dans le système neurotransmetteur et la modification de l'activité neuronale au niveau du système nerveux central (SNC) (Collinge et al., 1994; Sales et al., 1998). La capacité de la PrP à activer la protéine kinase fyn (Mouillet-Richard et al., 2000) retrouvée en grande quantité dans les synaptosomes du cerveau, indiquent que la PrP^C pourrait jouer un rôle dans la fonction synaptique.

Transport du cuivre

La PrP^C peut interagir avec le cuivre avec une faible affinité et de manière pH dépendante. Cette interaction implique l'extrémité N-terminale de PrP, et implique des histidines présentes dans la région octapeptide PHGGGWGQ répétée 5 fois (Viles et al., 1999). Le cuivre stimule fortement l'endocytose de la PrP^C (Pauly and Harris, 1998) retrouvée au niveau des endosomes précoces et une partie du Golgi (Magalhaes et al., 2002), suggérant un rôle de PrP^C dans le transport du cuivre. Des souris dépourvues de PrP^C montrent une concentration 50% plus faible de cuivre dans les fractions synaptosomales et subcellulaires endosomales

comparativement à des souris sauvages pour la PrP^C (Kretzschmar, 2000), une réduction de l'activité superoxyde dismutase liée au cuivre/zinc, ainsi qu'une altération des réponses physiologiques en présence d'un excès de cuivre (Brown and Besinger, 1998).

Protection des cellules souches hématopoïétiques contre l'apoptose

PrP est localisée à la surface des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et est nécessaire pour leur auto-renouvellement. Comme d'autres protéines à ancre GPI, PrP est localisée dans les radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique et pourrait ainsi réguler certaines protéines de signalisation dont l'hormone affectant l'activité des HSCs. PrP pourrait protéger les HSCs de l'apoptose et donc prolonger leur renouvellement à long terme. PrP favorise ainsi les greffes de HSCs durant les transplantations en série (Zhang et al., 2006).

Glycosylation et localisation de la PrP

La PrP^C glycosylée peut-être co-immunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre des protéines telles que grp94, la calnexine, la calreticuline, les chaperons de protéines associées au RE intervenant dans le repliement, alors que la PrP non glycosylée est retrouvée associée uniquement avec grp94, ce qui semble indiquer que les sucres et les chaperonnes doivent avoir un rôle dans le repliement conformationnel de la PrP (Capellari et al., 1999).

De plus, la N-glycosylation influence la topologie de la PrP ; l'inverse est également vrai. En effet, Walmsley a montré que contrairement aux autres formes de PrP, les formes PrP-Nterm ou les formes tronquées au niveau de l'ancre GPI ne sont pas glycosylées, indiquant que l'ancre GPI, l'ancrage C-terminal à la membrane, ou encore certaines régions C-terminales sont nécessaires à la N-glycosylation de la PrP (Walmsley et al., 2001). Pour revue (Mitra et al., 2006).

Par ailleurs, la présence d'une ancre GPI permet l'ancrage de la PrP^C à la membrane au niveau de structures semi-organisées appelées « rafts » riches en sphingolipides et stérols. La PrP est rapidement endocytée par liaison à un récepteur d'endocytose transmembranaire (Shyng et al., 1995), par des puits recouverts de clathrine (Madore et al., 1999) ou aux cavéoles (Vey et al., 1996). Une forme mutante de la PrP^C non glycosylée est résistante à la dégradation dans les endosomes, ce qui suggère un rôle de la glycosylation dans les processus de dégradation de la protéine (Capellari et al., 1999).

Depuis la description par l'équipe de Liu de la nécessité de l'ancre GPI dans le transfert intercellulaire de la PrP^C après activation cellulaire (Liu et al., 2002b), le rôle de la glycosylation dans les processus de propagation de l'agent infectieux est proposé, bien qu'il

reste encore à déterminer si la PrP^{Sc} peut elle aussi être transloquée de cellule à cellule selon un processus similaire.

❖ Glycosylation et conversion PrP^C/PrP^{res}

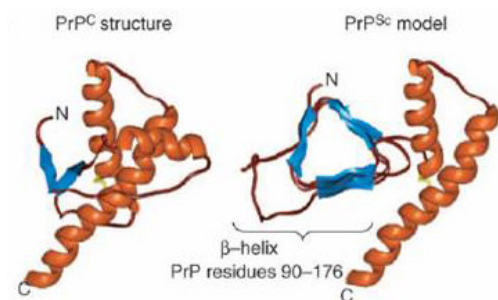
Ex vivo, dans des cellules de mammifères en culture, si la N-glycosylation est inhibée, la PrP^{Sc} est produite plus rapidement (Lehmann and Harris, 1997). Le même effet a été obtenu quand les sites de glycosylation de la PrP ont été délétés (Korth et al., 2000).

Par ailleurs, une mutation du gène entraînant une substitution au codon 183 et inhibant la glycosylation à ce site est liée à une forme familiale de la maladie (Nitrini et al., 1997). Cependant, ces résultats doivent être pris avec précautions puisque l'équipe de Sabina Capellari a montré que l'origine de la maladie serait non pas le manque de glycanes lui-même, mais la conséquence des substitutions des acides aminés (Capellari et al., 2000).

1.2.5.2 PrP^{Sc}

Les deux protéines PrP^C et PrP^{Sc} ne diffèrent que par des modifications post-traductionnelles. En conséquence, elles possèdent la même séquence en acides aminés, mais des structures tridimensionnelles différentes. Comme déjà énoncé dans la figure 5, la forme pathologique serait essentiellement formée de feuillets β qui favorisent l'agrégation.

	Hélices α (%)	Feuillets β (%)
PrP ^C	43	–
PrP ^{Sc}	20	34
PrP ²⁷⁻³⁰	29	31



Rappel de la figure 5

De plus, contrairement à la PrP^C, la PrP^{Sc} est relativement résistante à une digestion par la protéinase K. La résistance à la digestion par la protéinase K varie en fonction de l'espèce hôte et/ou de la souche considérée. Elle ne clive que les 70 premiers acides aminés de la molécule. Sur un gel polyacrylamide, elle aura donc une taille plus petite que la PrP^C, comprise entre 27 et 30 kDa (figure 7).

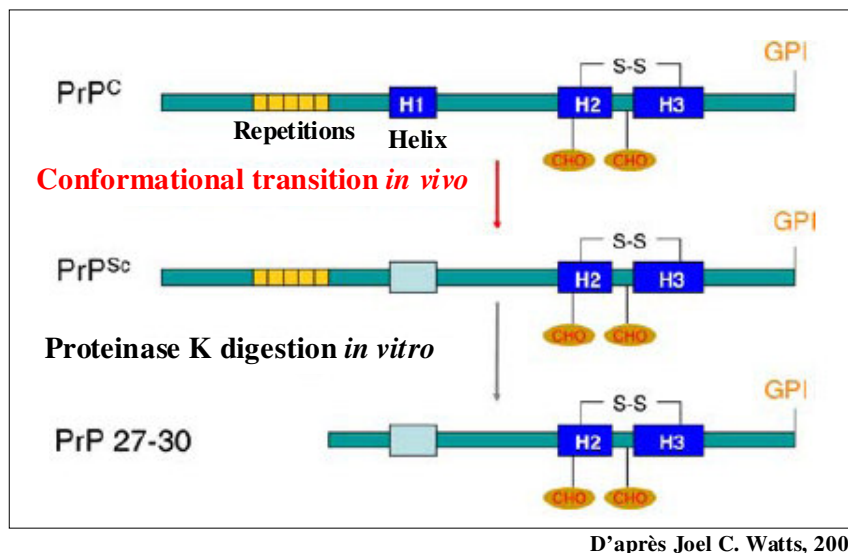


Figure 7: Fragment de PrP résistant à la digestion par la protéinase K (PK). Représentation linéaire de PrP^C et PrP^{Sc} ainsi que du fragment C-terminal résultant de la digestion de PrP^{Sc} par la protéinase K pour créer PrP 27-30. Pour illustrer le changement de conformation de PrP^C en PrP^{Sc}, la molécule PrP^{Sc} est montrée avec une coloration différente de l'hélice α , mais d'autres changements existent en C-terminal (omis pour la clarté de la figure).

Son temps de demi-vie est supérieur à 24 heures dans des cellules chroniquement infectées (Caughey and Raymond, 1991) alors que celui de PrP^C est d'environ 6 heures. Dans le système nerveux central, la PrP^{Sc} ne s'accumule pas systématiquement dans les aires cérébrales les plus riches en PrP^C, suggérant un possible transport axonal de la PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} a aussi été détectée plus récemment dans des échantillons de rate, de muscles squelettiques et d'épithélium olfactif de patients atteints de sCJ (Glatzel et al., 2003; Zanusso et al., 2003). En raison de ses caractéristiques d'agrégation, la purification à homogénéité de PrP^{Sc} n'a jamais pu être réalisée. En conséquence, les expériences de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire sont rendues difficiles. Il est probable que la structure tridimensionnelle de la PrP^{Sc} garde, et pour longtemps encore, ses secrets. Néanmoins, des études de spectroscopie en spectre infrarouge ont montré que les agrégats de PrP^{Sc} forment une structure remarquablement ordonnée, constituée de 34 % de feuillets β et 20 % d'hélices α (Caughey et al., 1991). Des essais ont été réalisés pour développer un modèle de PrP^{Sc} (Pan et al., 1993). Des modèles de PrP^{Sc} utilisant la structure de la PrP^C modifiée indiquent que les hélices α 2 et 3 sont inchangées. Ces modèles sont toutefois incomplets puisqu'ils ont été établis à partir de molécules isolées alors que les PrP^{Sc} sont trouvées sous forme agrégées (Wille et al., 2002). Les structures disponibles déduites des données de dichroïsme circulaire,

de FTIR (*Fourier Transformed InfraRed spectroscopy*) et de microscopie électronique indiquent que la PrP^{Sc} serait constituée de 2 hélices α et de 4 feuillets β (Cohen et al., 1994; Huang et al., 1996). Par ailleurs, plusieurs études indiquent la formation de trimères (Riesner, 2003; Wille et al., 2002) conduisant à la fibrillation, par la présence d'hélices β selon Govaerts et al. (Govaerts et al., 2004) (figure 5).

La structure tridimensionnelle de PrP^{res} n'a pas encore été complètement élucidée mais bien qu'elle ait la même séquence primaire que PrP^C, elle a des propriétés physico-chimiques différentes :

- ✚ majorité de feuillets β (Caughey et al., 1991) formant des hélices β (Wille et al., 2002)
- ✚ insoluble, allant jusqu'à la formation d'agrégats (Cohen et al., 1994)
- ✚ résistante à la protéinase K (d'où son nom PrP^{res})
- ✚ une partie N-terminale complètement déstructurée
- ✚ capable de convertir la forme normale en forme pathologique d'où le terme de « baiser de la mort » employé par Byron Caughey (Caughey, 2001).

Son pouvoir infectieux lui serait donc conféré par sa capacité à convertir les molécules de la forme saine en molécules de la forme pathologique (mécanisme d'autocatalyse). Des souris transgéniques, dont le gène codant la protéine PrP a été délété, ne contractent aucune infection lorsqu'on leur injecte du prion infectieux (Bueller et al., 1993; Sailer et al., 1994). De plus, la réintroduction du transgène *Prnp* dans ces souris restaure la susceptibilité aux prions. La présence de la protéine PrP^C est donc indispensable au processus de production de la protéine PrP^{res} et à l'invasion du système nerveux central, ce qui renforce donc l'hypothèse « protein-only ».

❖ Conversion de la PrP cellulaire en isoforme pathologique

La conversion de la PrP^C en PrP^{res} pourrait se situer au niveau des DRM (microdomaines résistants aux détergents) des membranes cellulaires (Baron et al., 2002; Sanghera and Pinheiro, 2002), du réticulum endoplasmique (Ivanova et al., 2001) ou des voies d'endocytose. Le fait que la déplétion en cholestérol, qui induit la destruction des rafts, inhibe la formation de PrP^{Sc}, suggère que les rafts seraient le site de conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (Taraboulos et al., 1995). La colocalisation de PrP^{Sc} avec des marqueurs des endosomes et des lysosomes a conduit à l'hypothèse de la conversion au niveau des voies d'endocytose (Arnold et al., 1995). Le protéasome et le transport rétrograde de la PrP^C à travers le Golgi ont également été proposés pour jouer un rôle dans la conversion. En effet, des protéines

incorrectement assemblées ou conformées sont retenues au niveau du RE et soumises à la voie de dégradation appelée ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) incluant une translocation à travers la membrane du RE vers le cytosol puis le protéasome (Yoshida, 2007). Lorsqu'on inhibe la fonction du protéasome avec des inhibiteurs spécifiques, la PrP s'accumule dans le cytosol sous forme d'une molécule mal conformée partiellement résistante à la PK, pouvant en plus promouvoir la transconformation de molécules de PrP^C nouvellement synthétisées (Ma and Lindquist, 2001; Yedidia et al., 2001). Ces résultats démontrent que la PrP^C à elle seule a la capacité de promouvoir sa propre transconformation.

Ces mécanismes de conversion de PrP cellulaire en PrP pathologique ne sont pas encore élucidés. Plusieurs hypothèses ont été émises.

Mécanismes moléculaires de la conversion (figure 8).

L'hypothèse de la "protéine seule" postule que l'agent infectieux est une forme mal repliée de PrP qui pourrait se répliquer selon deux mécanismes :

✚ Selon le modèle du « moule assistant » ou encore de " remaniement imposé par la matrice" (*template-directed refolding*) : PrP^{Sc} interagirait avec PrP^C ainsi que d'autres facteurs, permettant de lui imposer sa propre conformation.

✚ Selon le modèle de la nucléation : il existerait un équilibre entre la forme PrP^C et la forme PrP^{Sc} qui apparaîtrait spontanément mais serait extrêmement instable. Cet équilibre serait donc nettement en faveur de la forme PrP^C sauf si des agrégats de PrP^{Sc} existent. En interagissant avec ces agrégats préexistants, la forme PrP^{Sc} serait stabilisée.

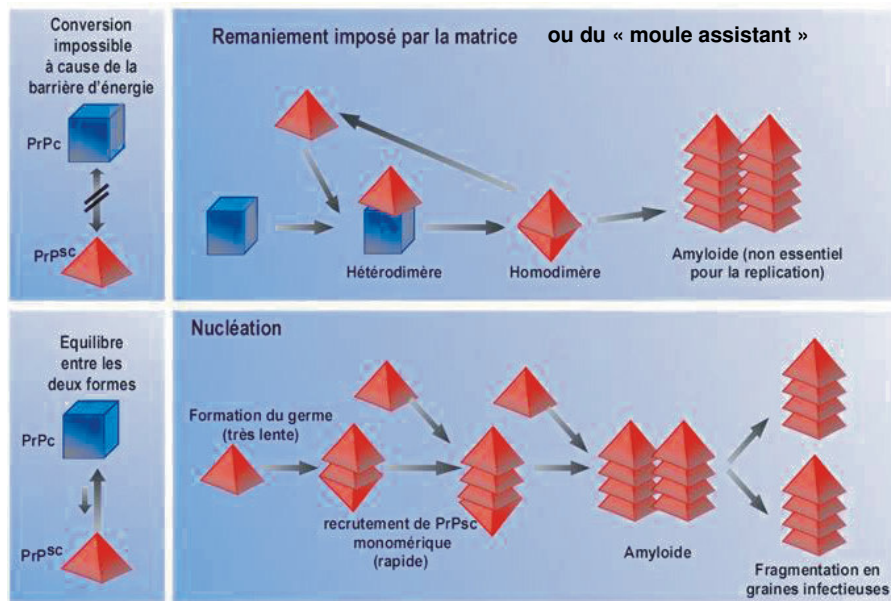
Aucune de ces deux hypothèses n'a été validée expérimentalement. Pour cela, il faudrait reproduire la génération *de novo* de l'agent infectieux dans un système *in vitro* composé de PrP^{Sc}, PrP^C et d'éventuels co-facteurs. Ainsi, Byron Caughey et ses collaborateurs ont mis au point le premier test de conversion acellulaire (Kocisko et al., 1994). La conversion *in vitro* consiste à incuber la PrP^C radiomarquée et purifiée avec une matrice composée d'une préparation purifiée de PrP^{Sc} issue de cerveaux d'animaux infectés. Dans certaines conditions très strictes de température (37-40° C) et de pH (6-6,5), l'incubation de la PrP^C radiomarquée avec la PrP^{Sc} froide entraîne la formation de molécules de PrP radiomarquées et résistantes à la digestion par la protéinase K. La réaction de conversion ne nécessite pas de synthèse de nouvelles molécules de PrP^C, suggérant qu'une interaction directe protéine-protéine est suffisante pour l'induction de la conversion. En d'autres termes, la PrP^{Sc} "impose" à la PrP^C sa conformation et certaines de ses propriétés physico-chimiques (Bessen et al., 1995) dans un processus auto-catalytique. Au cours du temps, le test de conversion *in vitro* a été amélioré et

s'est rapproché de conditions plus physiologiques (concentrations salines, absence de détergent etc...) (Baron et al., 2002; Horiuchi and Caughey, 1999).

Ce test de conversion *in vitro* a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la conversion, d'étudier l'influence de la séquence primaire de PrP^C sur la barrière d'espèce et a même servi à sélectionner des molécules "antiprion". La conversion *in vitro* se produit uniquement dans des conditions où la matrice de PrP^{Sc} de départ est en large excès par rapport à la PrP^C (excès molaire compris entre 10 et 100). De plus, le pourcentage de conversion est limité : seulement 5 à 15 % de la PrP^C radiomarquée initialement incubée *in vitro* et convertie en PrP^{res}. Ni l'allongement du temps d'incubation, ni l'addition de nouvelles molécules de PrP^C n'influent sur le rendement de la conversion.

La limitation du rendement de conversion pourrait s'expliquer par l'absence, dans le milieu réactionnel, de co-facteurs ou de molécules favorisant cette conversion. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'addition de chaperons de protéines augmente très significativement le rendement de la conversion *in vitro* (DeBurman et al., 1997). D'autres familles de molécules pourraient également être des co-facteurs de la conversion : les glycosaminoglycanes (GAG), les héparanes sulfate ainsi que les protéoglycanes qui stimuleraient la formation de PrP^{res} *in vitro* (Wong et al., 2001) mais aussi l'ADN double brin (Cordeiro et al., 2001). En effet, une étude montre que des anticorps dirigés contre l'ADN immunoprécipitent la PrP^{res} dans des homogénats de cerveaux, suggérant que le PrP^{res} pourrait avoir une haute affinité pour les acides nucléiques (Zou et al., 2004). Enfin, signalons que des molécules d'ARN isolées à partir de cerveaux de souris stimulent la formation de PrP^{res} *in vitro* (Deleault et al., 2003). A ce jour, aucune étude n'a confirmé l'interaction directe des molécules d'ARN et de PrP^C *in vivo*. Néanmoins, de nombreuses études ont démontré que des acides nucléiques se lient avec une haute affinité à la PrP recombinante et participent à certains de ses changements conformationnels (Adler et al., 2003; Gabus et al., 2001; Lima et al., 2006; Liu et al., 2006; Moscardini et al., 2002; Nandi et al., 2002). Il est donc permis de penser que les molécules d'ARN de l'hôte pourraient catalyser la formation de PrP^{Sc} *in vivo*. L'identification et la purification des molécules servant de co-facteurs à la formation de PrP^{res} seront des étapes essentielles dans la compréhension du mécanisme moléculaire par lequel la PrP^C subit un changement de conformation entraînant la pathogenèse.

Il deviendra alors possible de reconstituer *in vitro*, uniquement à partir d'éléments purifiés, les réactions de conversion et d'amplification de la PrP^{res} et de démontrer, enfin, son infectiosité.



D'après Aguzzi et Polymenidou, M. Cell (2004)

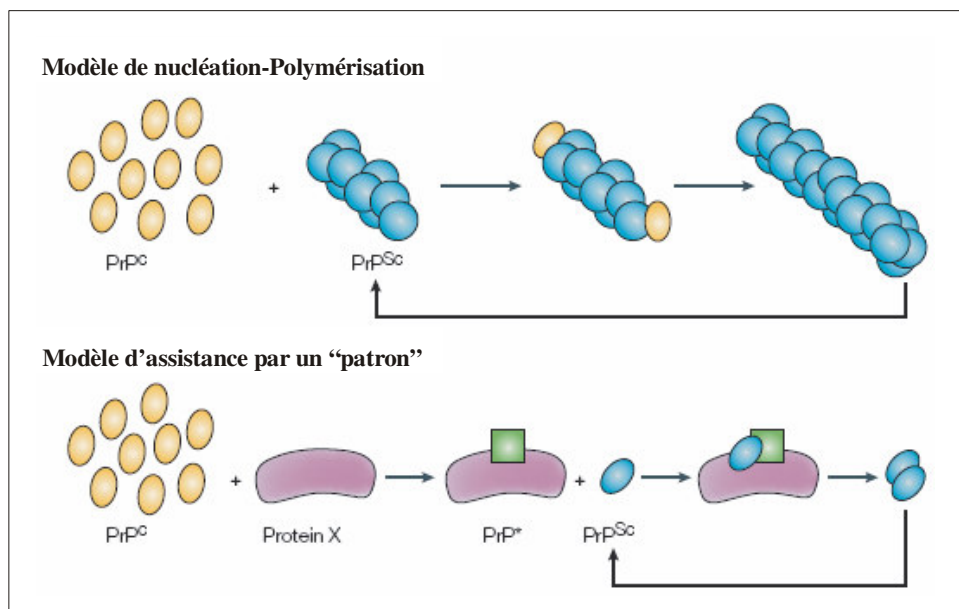


Figure 8 : Mécanismes moléculaires possibles de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}. Dans le modèle « Nucléation-Polymérisation », les particules infectieuses PrP^{Sc} sont de petits oligomères qui agissent comme des amorces pour recruter, convertir et stabiliser le mauvais repliement de la protéine normale PrP^C. Dans le modèle « d'assistance par un patron » ou du « moule assistant », la principale étape est la formation d'un intermédiaire PrP* qui lierait un chaperon moléculaire (protéine X). Cet intermédiaire pourrait interagir avec PrP^{Sc} pour produire les agrégats.

Le test de conversion *in vitro* précédemment mis au point par Byron Caughey a montré que le processus de conversion se divise en deux étapes distinctes. La première est une étape de liaison PrP^C/matrice de PrP^{Sc}. La cinétique de la liaison est rapide ; cette étape ne nécessite pas d'homologie de séquence stricte entre les deux isoformes protéiques.

La seconde étape est la conversion à proprement parler. De cinétique lente, la conversion nécessite une parfaite homologie de séquence entre les deux isoformes de PrP notamment dans le domaine hydrophobe central de la protéine. L'existence de ces deux étapes laisse supposer l'existence de sites spécifiques de liaison.

L'équipe de Byron Caughey a par ailleurs déterminé la taille minimale d'une particule de prion infectieuse : selon leur étude, les particules les plus infectieuses font entre 300 et 600 kDa (soit un oligomère de 14-28 molécules de PrP), et l'infectiosité de la maladie diminue avec la taille des agrégats (Silveira et al., 2005).

L'environnement local aurait un effet sur la structure de la protéine prion.

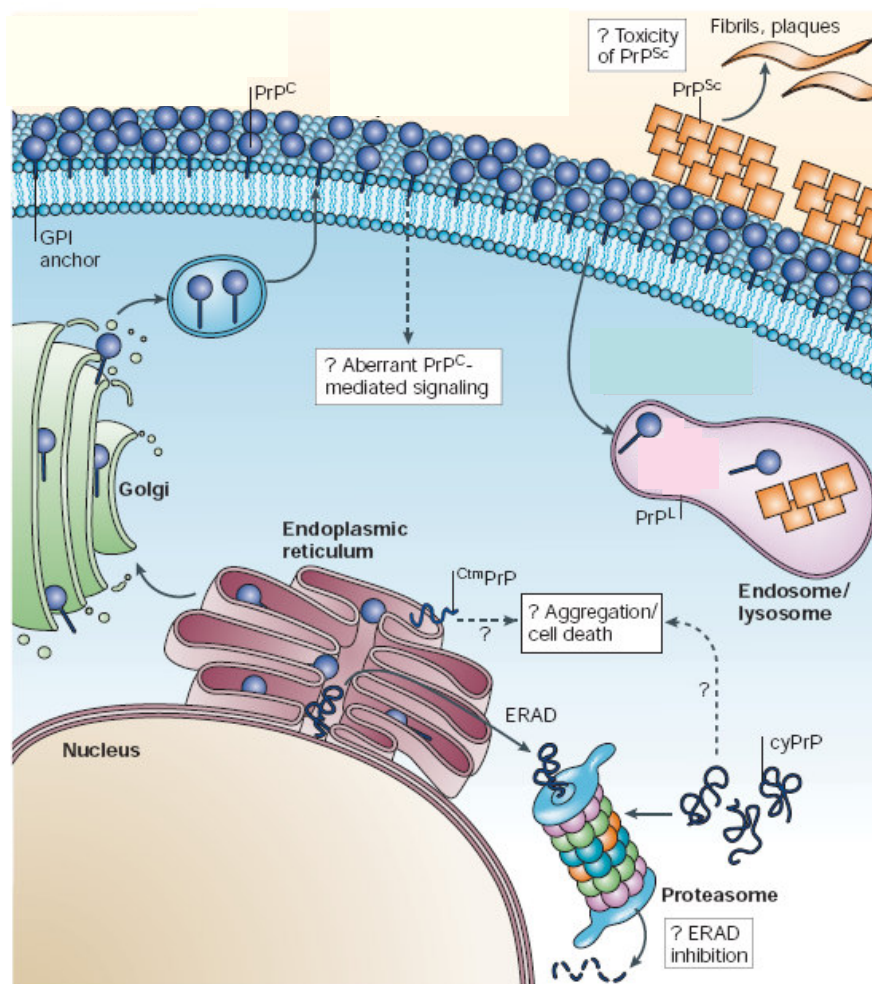
Dans certaines conditions, la protéine PrP^C peut être convertie en PrP^{Sc}, par un changement dans la structure secondaire et quaternaire (agrégation), et par l'acquisition de la résistance aux protéinases. Ce changement pourrait être influencé par différents facteurs :

- ✚ le pH : il a un effet sur la structure de la séquence N-terminale (DeMarco and Daggett, 2005)
- ✚ les sucres et notamment les glycosylation de PrP (DeMarco and Daggett, 2005)
- ✚ la membrane lipidique : le changement de conformation de la PrP^C se fait dans les radeaux lipidiques (DeMarco and Daggett, 2005) ; de plus, le cholestérol est un élément indispensable pour la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (Gilch et al., 2005)
- ✚ le cuivre : il induit localement la structure, par sa liaison aux régions riches en répétitions octapeptidiques. Il peut aussi altérer la structure secondaire et tertiaire hors de ces régions, causant la formation d'une PrP riche en feuillets β et résistante aux protéinases. Le cuivre peut aussi moduler les différences entre les souches et affecter le métabolisme et l'expression de la PrP^C (Choi et al., 2006; DeMarco and Daggett, 2005). Enfin, selon les conditions, le cuivre pourrait avoir deux effets opposés : un premier qui favorise le mauvais repliement de PrP^C menant à la conversion en protéine prion, et un autre qui favorise le routage de PrP^C à travers des voies empêchant l'interaction entre PrP^{Sc} et PrP^C (Varela-Nallar et al., 2006). Le cuivre est donc un élément très important à prendre en compte dans la mise au point de thérapies.

❖ Routage intracellulaire

Au sein de la cellule

PrP^C est dirigé dans le réticulum endoplasmique *via* son peptide signal, où une première glycosylation et l'ajout de l'ancre GPI sont effectués. Puis la protéine transite jusqu'à la membrane cellulaire *via* le Golgi où la deuxième glycosylation est effectuée.



D'après Mallucci et al., 2005

Figure 9 : Routage intracellulaire de la protéine PrP.

La protéine est produite dans le réticulum endoplasmique puis transite dans l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane cellulaire. PrP est ensuite endocytée par la voie des endosomes pour être dégradée, mais il arrive que la dégradation ne fonctionne pas et dans ce cas, PrP^{Sc} s'agrège ce qui mène à la mort de la cellule.

Elle est ensuite endocytée *via* la « voie clathrine » et peut aussi migrer dans les endosomes tardifs ou les lysosomes par la voie non classique (cavéoline) (figure 9). Des perturbations au sein du trafic intracellulaire de la protéine PrP, comme par exemple, l'absence d'élimination par le protéasome peuvent engendrer une accumulation dans le RE et dans le cytoplasme,

aboutissant à la toxicité et à la formation d'agrégats de PrP^{res} avec l'aide d'éventuels chaperons de protéines.

Au sein de l'organisme

Après ingestion, leur résistance relative aux protéases et leur capacité à se servir des cellules M intestinales permettent aux agrégats de PrP^{res} de résister au passage dans le tractus digestif.

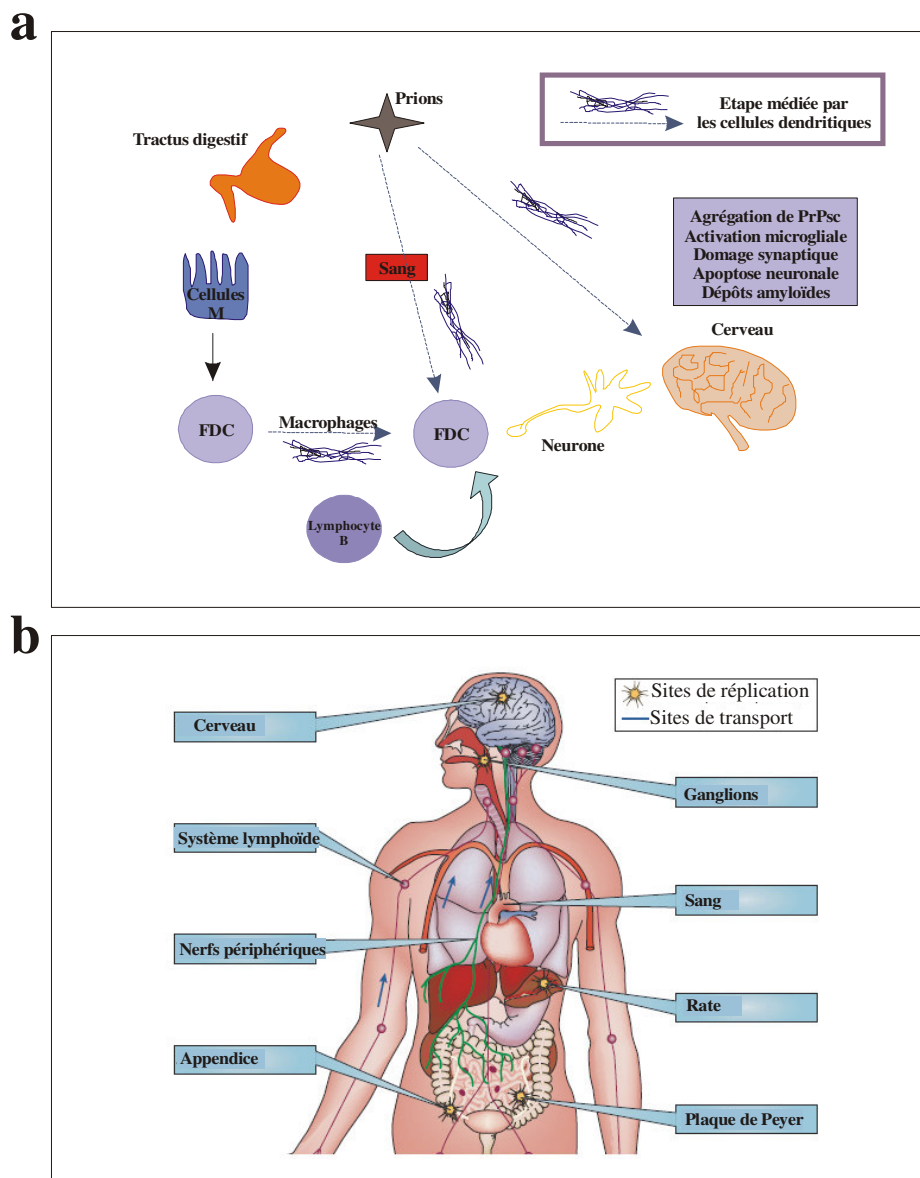


Figure 10 : Routage de la protéine PrP au sein de l'organisme.

a. Après ingestion, PrP traverse la barrière intestinale *via* les cellules M pour atteindre les cellules folliculaires dendritiques (FDC) qui l'achemineront vers le cerveau *via* le sang et les cellules neuronales.

b. Les sites de réplication du prion sont le cerveau, les ganglions, la rate, la plaque de Peyer et l'appendice. Les sites de transport du prion sont le système lymphoïde, le sang et les nerfs périphériques.

PrP^{res} s'accumule ensuite dans les organes lymphoïdes (Mabbott and Macpherson, 2006) tels que la rate, les follicules, les amygdales, l'appendice ... sans déclencher de réponse immunitaire. Au contraire, les organes lymphoïdes permettraient à PrP^{Sc} de se multiplier (Prinz et al., 2002) avant de gagner le système nerveux, permettant ainsi la neuro-invasion. Dans les organes lymphoïdes, l'accumulation précoce de PrP^{Sc} se fait dans les centres germinatifs et les cellules folliculaires dendritiques (FDC) ainsi que dans les macrophages. Les cellules dendritiques les achemineraient ensuite jusqu'au cerveau (Aucouturier et al., 2001; Huang et al., 2002) (figure 10) (pour revue, (Beekes and McBride, 2007)).

❖ Mort neuronale

Causes de la mort neuronale

La formation de vacuoles intracellulaires et la mort neuronale due à l'induction de l'apoptose sont caractéristiques des EST.

L'accumulation de la PrP^{Sc} et les signes de la neuropathologie sont co-localisés dans les mêmes aires cérébrales. Mais, le plus souvent, la neuropathologie précède dans le temps l'agrégation des formes fibrillaires. Ainsi, la question de savoir si l'agrégation de la PrP^{Sc} est la cause principale de la pathogenèse reste entière. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place au cours de l'infection et responsables de la mort neuronale ne sont pas élucidés ; pas plus que ceux responsables de la vacuolisation des neurones survivants, de la multiplication astrocytaire et de l'activation microgliale.

Plusieurs hypothèses non exclusives ont été émises (Chiesa and Harris, 2001) :

- 🚧 la perte de la fonction physiologique de la PrP^C, une topologie ou une localisation sub-cellulaire aberrante de la PrP^C
- 🚧 la toxicité intrinsèque des agrégats de PrP^{Sc} et/ou de fragments peptidiques de la PrP formés *de novo*
- 🚧 une "cytotoxicité indirecte" causée par divers facteurs cellulaires sécrétés en réponse à l'infection.

➤ La PrP^C

L'absence d'expression de la PrP^C au cours du développement embryonnaire et post-natal ne semble entraîner aucun dommage cérébral (Bueler et al., 1992; Mallucci et al., 2002). En revanche, plusieurs études semblent conclure que l'expression de la PrP^C dans un

compartiment sub-cellulaire inhabituel ou l'expression de formes de PrP^C aberrantes pourraient entraîner des dommages cellulaires importants. L'expression de la PrP^C dans le cytosol et l'inhibition du fonctionnement du protéasome entraîne la mort cellulaire. La PrP cytosolique n'est pas soumise à une maturation normale puisque le peptide signal amino-terminal n'est pas clivé et que l'ancrage GPI est absent, suggérant que la PrP néo-synthétisée ne transite pas par le réticulum endoplasmique (Driscaldi et al., 2003). Ainsi, des molécules de PrP^C mal repliées pourraient être dirigées vers le cytoplasme et s'y accumuler, induisant la mort cellulaire.

➤ **La PrP^{Sc}**

L'accumulation de dépôts amyloïdes de PrP^{Sc} est-elle suffisante pour expliquer les dommages cellulaires ?

1- Les expériences de greffes neuronales ont montré que les dépôts de PrP^{Sc} n'endommagent que les neurones du greffon exprimant la PrP^C. Les cerveaux de souris *Prnp0/0* ne présentent aucun changement pathologique (Brandner et al., 1996). La présence de la PrP^C est donc requise pour le déclenchement des phénomènes de mort cellulaire.

2- L'accumulation d'amyloïdes de PrP n'est pas forcément associée à la maladie ; il y a donc une dissociation entre l'infectiosité et la présence d'amyloïdes. Il a été suggéré que cette formation d'amyloïdes de PrP pourrait être une protection en séquestrant les particules infectieuses au sein de l'agrégat inerte ((Piccardo et al., 2007).

Tous ces arguments sont en faveur d'une certaine innocuité des agrégats de PrP^{Sc}.

Le changement de conformation de la PrP au cours de la pathologie pourrait conduire à un gain de fonction délétère, conséquence de la mise en place d'interactions spécifiques entre la PrP^{Sc} et d'autres partenaires. Alternativement, le processus même de conversion PrP^C/PrP^{Sc} pourrait être un événement délétère en soi. *Via* un partenaire non identifié, la PrP^{Sc} induirait la transduction d'un signal intracellulaire responsable de l'activation de la cascade des caspases et de la mort neuronale (Ferreiro et al., 2006; Hetz et al., 2003).

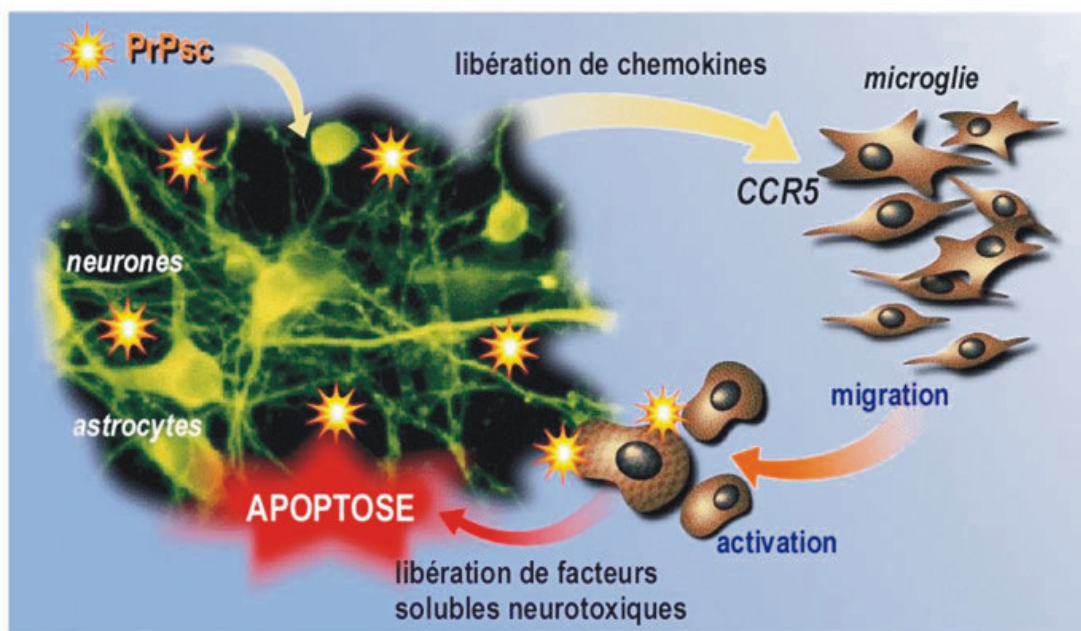
➤ **Rôle des cellules microgliales dans le processus de mort neuronale.**

De nombreuses études suggèrent un rôle actif des cellules microgliales dans l'établissement des dommages cérébraux. La présence de cellules microgliales activées au voisinage immédiat des dépôts de PrP^{Sc} est un fait que l'on retrouve dans tous les cerveaux d'individus

atteints d'EST. Les cellules microgliales expriment fortement la PrP^C et constituent un site cellulaire potentiel de réplication de l'agent infectieux. *In vitro*, la présence de cellules microgliales est indispensable à la neurotoxicité induite par le peptide amyloïde contenant les acides aminés 106 à 126 (partie de la protéine prion PrP nécessaire et suffisante à la toxicité) sur des cultures primaires de neurones (Brown et al., 1997). Finalement, la question de savoir, quelles fonctions réelles, les cellules microgliales assument-elles dans le processus de mort neuronale, reste ouverte?

Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- ✚ la microglie participe à l'élimination des agrégats protéiques par phagocytose
- ✚ la microglie devient le site de réplication de l'agent infectieux et participe à sa dissémination dans l'ensemble du cerveau voire de l'organisme, même si un article récent semble montrer qu'elle n'avait pas de rôle dans le transport et la réplication *in vivo* (Priller et al., 2006)
- ✚ entrant en état d'activation, la microglie synthétise des facteurs cytotoxiques solubles qui participent à la mort neuronale.



D'après Marella, 2004

Figure 11 : Rôle des cellules microgliales dans le processus de mort neuronale.

A la surface des neurones, PrP^{Sc} provoquerait une réponse immunitaire qui stimulerait la production de la cytokine IL-6. Cette dernière induirait la prolifération des cellules gliales qui elle-même produisent de l'IL-6. Au final, une mort neuronale serait due à la mort par apoptose de la microglie.

PrP^{Sc} bloquerait la signalisation neuronale et tuerait les cellules nerveuses.

La production de la cytokine IL-6 est connue pour induire la prolifération des cellules gliales qui à leur tour produisent de l'IL-6. Cette boucle d'auto-activation aboutirait à la mort neuronale due à l'induction de l'apoptose par la microglie (Marella and Chabry, 2004) (figure 11).

I.2.6 Notion de souche, de barrière d'espèce et modèles animaux expérimentaux

I.2.6.1 Notion de souche

En 1961, un pas important fut franchi dans la compréhension des mécanismes moléculaires de ces EST lorsque Richard Chandler parvint à transmettre la scrapie du mouton à des souris (Chandler, 1961). Après plusieurs passages successifs dans la même espèce, des souches différentes de scrapie murines ont été caractérisées, bien que toutes furent initialement établies à partir d'inoculats de cerveaux de moutons infectés.

Une souche de scrapie murine est définie par :

- ✚ les signes cliniques (comportement de l'animal)
- ✚ la durée de la maladie (court ou long temps d'incubation)
- ✚ le profil lésionnel dans certaines aires cérébrales (nombre, taille et distribution des vacuoles dans le cerveau)
- ✚ la présence ou l'absence de plaques amyloïdes
- ✚ la localisation cérébrale de dépôts de la PrP^{Sc}.

Les caractéristiques de souches sont extrêmement stables chez une souris de fond génétique donné. Certains auteurs ont tenté de classifier les souches en fonction du profil de migration électrophorétique de la PrP^{Sc} après digestion à la protéinase K. En effet, les différentes conformations stériques de la PrP exposent différents sites de coupure à l'action des enzymes protéolytiques, ce qui a pour conséquence la formation de fragments de masses moléculaires différentes. Combinée à la différence de ratio existant entre les formes de PrP non-, mono-, et di-glycosylées, cette approche a permis de définir quatre types de conformation (type I, II III et IV, figure 12). Même si cette classification ne rend pas compte de la complexité des

souches de scrapie, elle a été un argument important pour établir la filiation entre vCJ et ESB (Collinge et al., 1996; Hill et al., 1997).

1.2.6.2 Glycosylation et typage de souche

Les souches se distinguent sur un gel de polyacrylamide par les différences dans les fragments de PrP^{Sc} produits après clivage par la PK, qui reflètent eux-mêmes une diversité dans la conformation et le ratio des glycoformes (Collinge et al., 1996; Rubenstein et al., 1998). Ce sont les différences de N-glycosylation qui permettent de classer les souches de CJ selon 4 types identifiés dans CJ et l'ESB (d'après (Ermonval et al., 2003)). Cependant, le profil des glycoformes à l'intérieur d'un type donné, révélé par électrophorèse à une dimension (1D), ne permet pas d'observer des structures plus complexes. Ainsi, l'analyse sur gel à deux dimensions a montré que la PrP^{Sc} extraite de cerveau de patient IFF (Insomnie Fatale Familiale) et sCJ (forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob), qui sont indistinguables sur gel 1D (toutes deux du type 2), correspondait à deux types de N-glycosylation (Pan et al., 2001), ce qui a permis de montrer que des différences qualitatives dans les N-glycanes étaient à l'origine de souche de prion différentes.

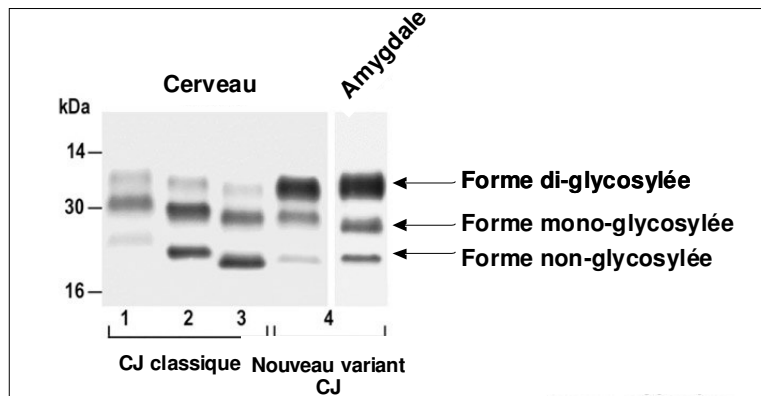


Figure 12 : Classification des différentes souches de prion en fonction des différents sites de coupure par les protéases et les différentes formes de glycosylation.

Dans le cas de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJ), 3 souches ont été répertoriées selon leur différence de site de coupure à la protéinase K. Le nouveau variant de CJ (vCJ) a encore un profil différent. Ainsi, à ce jour, quatre souches différentes ont été observées.

C'est aussi ce qui a permis récemment de mettre en évidence une nouvelle souche d'ESB (Casalone et al., 2004). La très bonne conservation chez chaque espèce des profils de lésion que l'on établit pour chaque souche, semble supporter l'hypothèse qu'une glycosylation

associée pour chaque souche doit diriger la PrP^{Sc} vers des sous-populations neuronales portant une PrP^C possédant un profil de glycosylation très proche (Collinge et al., 1996).

1.2.6.3 Notion de barrière d'espèce

La transmission d'une EST à une espèce différente de celle de départ est toujours caractérisée par un allongement de la période d'incubation au cours du premier passage. Dans certains cas, tous les animaux inoculés ne développent pas la maladie. Si la maladie apparaît, le temps d'incubation très long lors du premier passage à un nouvel hôte, se raccourcit par la suite pour se stabiliser au temps d'incubation caractéristique de la souche (figure 13).

La PrP^{Sc} qui s'accumule *de novo* correspond toujours à la séquence de la PrP de l'hôte et pas à celle de l'inoculum (Bockman et al., 1987). La barrière d'espèce dépend de l'espèce "donneuse" et de l'espèce "receveuse". Le franchissement de la barrière d'espèce est d'autant plus aisé que les espèces sont génétiquement proches (homme et primates).

En dépit de plus de deux siècles de cohabitation, la transmission naturelle de la tremblante du mouton à l'homme n'a jamais été démontrée. Expérimentalement, la transmission orale de l'ESB est possible vers le mouton, la souris, le chat, la chèvre, le vison.

Tous les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la barrière d'espèce ne sont pas connus ; néanmoins, trois facteurs semblent être déterminants :

- 1-** la dose infectante,
- 2-** la voie d'infection et
- 3-** les similitudes entre l'espèce « receveuse » et l'espèce « donneuse ».

Par ailleurs, il semble que la conformation de la protéine PrP plus que sa séquence primaire soit impliquée dans le phénomène de barrière d'espèce (Collinge, 2005). La barrière d'espèce la plus communément étudiée en laboratoire est celle qui existe entre le hamster syrien et la souris.

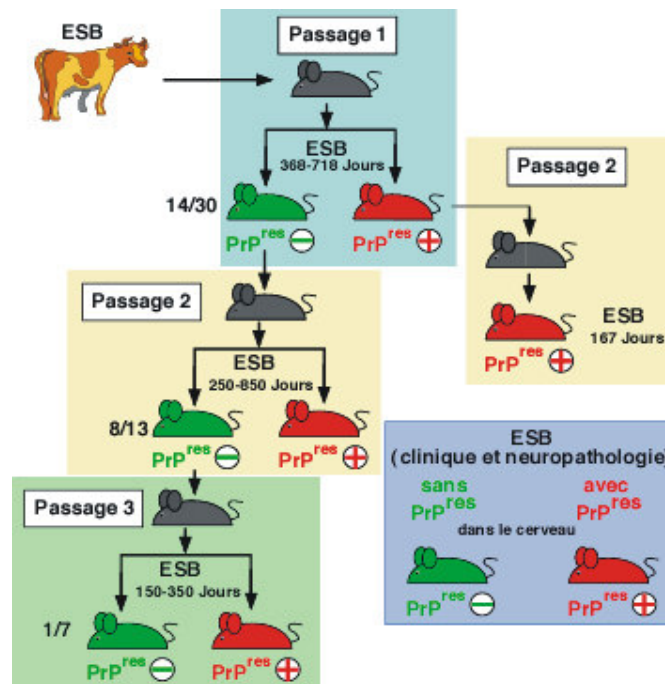


Figure 13: Notion de barrière d'espèce.

Selon Lasmezas, en 1997, la virulence de l'agent augmente avec le nombre de passage. Si on inocule l'agent de l'ESB à des souris, toutes ne développeront pas la maladie. Après un second passage, le nombre de souris infectées sera plus grand ainsi que la rapidité de développement de la maladie, et encore plus après un troisième passage.

1.2.6.4 Modèles animaux expérimentaux

Les souris dont le gène *Prnp* (*Prnp0/0*) a été délété constitue un modèle animal exceptionnel pour l'étude du phénomène de barrière d'espèce (Bueler et al., 1992). En dehors d'anomalies physiologiques mineures (Collinge et al., 1994; Tobler et al., 1996), ces souris naissent, se développent et se reproduisent normalement. Des souris transgéniques dont le gène *Prnp* endogène a été remplacé par le gène *Prnp* de hamster sont susceptibles aux souches de scrapie de hamster et insensibles aux souches murines (Scott et al., 1989). En résumé, la période d'incubation et la susceptibilité sont au moins en partie déterminées par la séquence et le taux d'expression de la PrP^C de l'hôte.

Par ailleurs, les souris hétérozygotes pour le gène *Prnp* (*Prnp0/+*), ont un temps d'incubation de la maladie allongé. Le temps d'incubation de la maladie est inversement proportionnel au taux d'expression de la PrP (Bueler et al., 1994).

L'obtention de ces souris *Prnp0/0* a également permis la mise au point d'anticorps, inexistants à l'époque. En effet, l'expression de la PrP est quasi ubiquitaire. Elle est, entre autres, exprimée dans les lymphocytes et les organes lymphoïdes (Cashman et al., 1990). La

production d'anticorps chez la souris sauvage est rendue difficile par le fait que l'animal présente une très grande tolérance immunologique pour la PrP. L'immunisation de souris *Prnp0/0* a ainsi permis l'obtention d'anticorps monoclonaux anti-PrP de haute affinité, outils indispensables aux recherches fondamentales et au développement de tests diagnostiques.

II. Les Prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

II.1 La levure : Organisme modèle pour l'étude des prions

II.1.1 Modèle de simplicité

L'atout principal de la levure est l'existence d'un haut degré de conservation avec les cellules de mammifères en terme de séquences géniques, protéiques et « voies de signalisation ».

Ainsi, les deux systèmes majeurs de défense dans la cellule lors de l'accumulation de protéines anormalement repliées sont conservés de la levure à l'homme. Ces deux mécanismes sont :

- ✚ les chaperons moléculaires (Hsp40p, Hsp70p, Hsp90p ou Hsp27p) qui lient les polypeptides mal repliés et facilitent leur repliement ou bien les ciblent vers une dégradation rapide (Frydman, 2001)
- ✚ le système ubiquitine-protéasome qui catalyse leur dégradation (Hershko and Ciechanover, 1998; Schwartz and Ciechanover, 1999).

Ces deux systèmes sont extrêmement bien conservés au cours de l'évolution : il y a 96% d'identité entre le système ubiquitine de mammifère et de levure et 70-80% d'identité entre les Hsp70p de mammifère et de levure.

Le haut degré de conservation des processus et des acteurs moléculaires et cellulaires entre l'homme et la levure, fait de cette dernière un modèle précieux pour de nombreuses études de mécanismes fondamentaux et la mise au point de cribles d'isolement de composés potentiellement actifs pour le traitement de différentes maladies, telles que des cancers, des maladies infectieuses et neurodégénératives.

De plus, la levure est un organisme expérimental possédant un certains nombres d'avantages pratiques dont certains sont mentionnés ci-dessous :

- ✚ 90 minutes de temps de doublement (en milieux riches)
- ✚ milieux très simples et bon marché

- ✚ croissance en milieu liquide ou solide
- ✚ expression facile de gènes étrangers
- ✚ mutations faciles à réaliser (mutagenèse dirigée au nucléotide près sur tous les génomes, tant nucléaires que mitochondriaux).
- ✚ premier organisme eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé
- ✚ de nombreux outils à dispositions.

II.1.2 Existences de prions

Finally, the essential point is the existence in yeast of proteins behaving like prions and presenting the enormous advantage of not being toxic either for the yeast or for the human (Couzin, 2002); this allows to work on a conventional « non-secured » type L1. Today, several yeast prions have been identified in particular [*PSI⁺*] and [*URE3*], which are the most studied.

II.2 Les prions de levure

In yeast, prions are « epigenetic » determinants, transmitted in a non-Mendelian way to daughter cells (Uptain and Lindquist, 2002; Wickner et al., 2002).

The discovery of yeast prions shows that the prionization mechanism could be a very general mechanism of epigenetic regulation like DNA methylation. In this case, proteins when overexpressed could thus self-inactivate (in a reversible way). These modifications could be beneficial for cells, notably in terms of adaptability to the environment: inactivation of a protein could thus be done without any modification (mutation) of the gene. The cell would thus have the possibility to explore new biochemical and metabolic pathways while keeping the possibility to go back and recover the expression of proteins in their wild form (True and Lindquist, 2000). The toxicity of the mammalian prion could thus be only anecdotal. This toxicity, because it has attracted the attention of researchers, has allowed to lift « a corner » of the veil on this new mechanism of regulation. The discovery of a protein of the aplasia, the protein CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation element Binding Domain*), involved in the long-term storage of memory (Si et al., 2003a), could behave like a prion (at least in yeast) (Si et al., 2003b) in the sense of this hypothesis.

[URE3] et [PSI⁺] : 2 phénotypes à transmissions non « conventionnelles »

Vingt ans avant que Stanley Prusiner n'émette la théorie « Protéine seule », deux déterminants épigénétiques ont été découverts durant des criblages de mutants dans la levure : [PSI⁺], découvert en 1965 par Brian Cox (Cox, 1971; Serio and Lindquist, 1999) et [URE3], découvert en 1971 par François Lacroute et Michel Aigle (Aigle and Lacroute, 1975; Lacroute, 1971).

II.2.1 [URE3] : le prion précurseur

Un mutant auxotrophe *ura2* est incapable de croître sur un milieu dépourvu d'uracile mais il devrait pouvoir se développer sur un milieu minimum (sans uracile) supplémenté avec de l'USA (uréidosuccinate) car ce métabolite est le produit de l'enzyme codée par le gène *URA2* (impliquée dans la voie de biosynthèse de l'uracile). Cependant, une mutation additionnelle dans le gène *URE2* est requise pour permettre l'incorporation de l'USA et ainsi la croissance des levures. Ceci est dû au fait qu'en présence d'une bonne source d'azote, *Ure2p* réprime l'expression de la perméase qui permet l'import de l'USA dans la cellule. Quand François Lacroute sélectionne des mutants capables d'incorporer l'USA, il identifie également une seconde classe de mutant appelé [URE3] (Lacroute, 1971). [URE3] présente une dérégulation du métabolisme azoté aboutissant en particulier à l'import constitutif de l'uréidosuccinate (d'où l'appellation URE). Le phénotype est dû à la perte de fonction d'un régulateur du métabolisme azoté : *Ure2p*. Les cribles génétiques utilisés pour obtenir des mutants touchés dans l'import de ce métabolite ont également permis d'obtenir des souches [*ure2-*] présentant le même phénotype. Ces autres mutants obéissent aux lois de la génétique mendélienne permettant de conclure à l'existence d'une mutation génique. Le gène *URE2* ainsi caractérisé code donc pour la protéine *Ure2p*. L'originalité de [URE3] résulte ainsi plus de ses propriétés génétiques que nous allons détailler plus loin que du phénotype.

II.2.2 [PSI⁺], le prion « superstar »

[PSI⁺] présente un phénotype différent de [URE3] car il amplifie l'action des supresseurs d'ocres (UAA) comme *SUQ5*. [PSI⁺] est la forme prion de la protéine *Sup35p*. Cette protéine est l'homologue du facteur de terminaison de la traduction eRF3 conservé chez tous les eucaryotes. On peut noter que contrairement à *URE2*, *SUP35* est un gène essentiel. Les souches contenant le prion [PSI⁺] étant viables, une fraction de la protéine *Sup35p* garde son activité dans les cellules [PSI⁺]. [PSI⁺] est détecté par le niveau de suppression du codon non-sens. Pour être détecté, le phénotype [PSI⁺] nécessite donc d'utiliser un gène rapporteur

inactivé par la présence du codon stop ocre. Classiquement, ce gène est *ADE2*. Une mutation dans ce gène conduit à une auxotrophie pour l'adénine (souche de génotype *ade2-1*). En présence d'adénine, la souche mutée pourra croître, mais elle accumulera un pigment coloré rouge. En effet le gène *ADE2* code pour une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'adénine. L'inactivation d'Ade2p provoque l'accumulation des substrats en amont de cette enzyme. AIR est l'un de ces substrats. Après oxydation, AIR forme un pigment rouge. Une souche de levure *SUQ5 ade2-1* en contexte [*psi*⁻] forme donc des colonies rouges, alors qu'elle forme des colonies blanches en contexte [*PSI*⁺]. Ainsi, quoiqu'ayant un génotype *ade2-1*, une souche [*PSI*⁺] présente un phénotype autotrophe pour l'adénine. La protéine Sup35p qui est un facteur de terminaison de traduction ne présente aucune analogie tant structurale que fonctionnelle avec Ure2p. [*PSI*⁺] est actuellement le prion vedette chez les champignons : une grande fraction des chercheurs travaillent sur les prions de levure et ses propriétés sont les mieux caractérisées. De nombreuses expériences « clés » dans le domaine des prions de champignons ont été réalisées avec les souches [*PSI*⁺].

L'hérédité non mendélienne de [*URE3*] et de [*PSI*⁺], est restée une énigme pendant longtemps. Il a fallu attendre 1994 pour que Reed Wickner (Wickner, 1994) propose que le déterminant [*URE3*] corresponde à la forme prion de Ure2p, une protéine non essentielle pour la croissance et intervenant dans le catabolisme de l'azote et que le déterminant [*PSI*⁺] corresponde à la forme prion de la protéine Sup35p, facteur de terminaison de la traduction (équivalent d'ERF3 chez les mammifères) essentiel à la croissance. Dans les deux cas, les cellules contenant la forme prion, possèdent la protéine sous forme inactive et peuvent facilement être distinguées des cellules contenant la forme « normale », non prion, par simple différence phénotypique.

A partir de ce moment, le dogme central de la biologie moléculaire basé sur la transmission des caractères uniquement *via* les acides nucléiques était bousculé.

II.2.3 Caractéristiques génétiques des prions de levures

Pour une revue récente et complète sur le sujet, on se référera à l'article de synthèse de Reed B. Wickner (Wickner et al., 2006). Six caractéristiques génétiques sont bien connues :

Phénotype dominant

Si un haploïde de phénotype [*PRION*⁺] est croisé avec un haploïde de phénotype [*prion*⁻], le diploïde résultant présentera un phénotype [*PRION*⁺].

Hérédité cytoplasmique

Si le cytoplasme d'une cellule donneuse de phénotype [*PRION*⁺] est mis en contact avec celui d'une cellule receveuse de phénotype [*prion*-], la cellule receveuse verra son phénotype transformé en [*PRION*⁺].

Ségrégation non-mendélienne

La sporulation de diploïdes de phénotype [*PRION*⁺] donnera le plus souvent des tétrades dont toutes les spores sont de phénotype [*PRION*⁺]. On obtient donc une ségrégation de type 4 : 0 au lieu de la ségrégation 2 : 2 prévue par les lois de Mendel.

Cure réversible

Une souche contenant un prion peut être curée avec une dose de 1-5 mM de Chlorure de Guanidium (GuHCl). Le phénotype [*PRION*⁺] peut réapparaître spontanément avec une fréquence de 10⁻⁵/10⁻⁶.

Gènes sauvages : indispensable pour la propagation


La présence du gène sauvage est indispensable pour le maintien du phénotype [*PRION*⁺] : par exemple, une cellule délétée pour le gène *URE2* ne peut maintenir le phénotype [*URE3*].

Surexpression du gène sauvage augmente la fréquence d'apparition des prions

La surproduction de la protéine augmente la fréquence d'apparition du phénotype [*PRION*⁺] d'un facteur 10 à 1000.

II.2.4 Caractéristiques physico-chimiques des prions de levures

Cinq caractéristiques physiques et chimiques principales sont maintenant bien répertoriées :

-  Une région N-terminale riche en glutamine/asparagine : la région N-terminale riche en glutamine/asparagine a été déterminée comme étant le domaine prion (Masison and

Wickner, 1995; Sondheimer and Lindquist, 2000). Ce domaine prion est flexible facilitant ainsi les modifications de conformation.

- ✚ Des répétitions d'un octapeptide dans le domaine prion : PQGGYQQ_YN, uniquement pour la protéine Sup35p (PHGGGWGQ pour PrP).
- ✚ Une formation d'agrégats.
- ✚ Une formation de fibres amyloïdes (Patino et al., 1996).
- ✚ Une résistance aux protéases (Patino et al., 1996).

II.3 Les formes « normales » des prions [URE3] et [PSI⁺]

II.3.1 Ure2p : forme « normale » de la protéine prion [URE3]

Ure2p est un régulateur du métabolisme azoté codé par le gène *URE2*. Cette protéine bloque la production de la perméase Dal5p, codée par le gène *DAL5* qui est nécessaire à l'entrée dans les levures de l'allantoate mais aussi de l'ureïdosuccinate (USA) du fait de la forte ressemblance de structure de cette dernière molécule avec l'allantoate. Ces deux composés, l'allantoate et l'USA interviennent dans la chaîne de biosynthèse de l'uracile. Ainsi, des souches délétées pour le gène *ura2* ne pourront pas croître sur des milieux dépourvus d'uracile sauf si dans le milieu il y a de l'allantoate ou de l'USA et si en plus le gène *URE2* est délété pour permettre l'entrée de l'allantoate ou de l'USA dans la cellule.

- ✚ Sur un milieu contenant une source **riche en azote** (ammonium, glutamine), Ure2p bloque le facteur de transcription Gln3p dans le cytoplasme en se fixant directement à celui-ci. Ceci inhibe toute transcription de gènes possédant la boîte GATA dans leur promoteur, dont le gène *DAL5* ; la perméase Dal5p n'est donc pas produite.
- ✚ Inversement, sur un milieu **pauvre en azote** (proline, urée, GABA, arginine, allantoate), Ure2p ne séquestre plus Gln3p, celui-ci pénètre dans le noyau et induit la transcription du gène *DAL5*. La perméase permet l'entrée de l'USA dans la cellule. L'uracile est ainsi synthétisé et les cellules délétées pour le gène *ura2* peuvent se développer.

En 1994, Reed Wickner (Bate et al., 2002; Wickner, 1994) a émis l'hypothèse que le phénotype [URE3] pourrait être dû à une forme modifiée inactive de la protéine Ure2p codée

par le gène *URE2*. Cette forme modifiée, [URE3], ne pourrait pas réprimer la production de la perméase Dal5p responsable de l'entrée de l'ureïdosuccinate. Qui plus est, [URE3] aurait la propriété d'interagir avec Ure2p, ce qui provoquerait la transition de Ure2p vers [URE3] par un mécanisme du même ordre que celui évoqué dans la propagation du prion de mammifère.

II.3.1.1 Structure

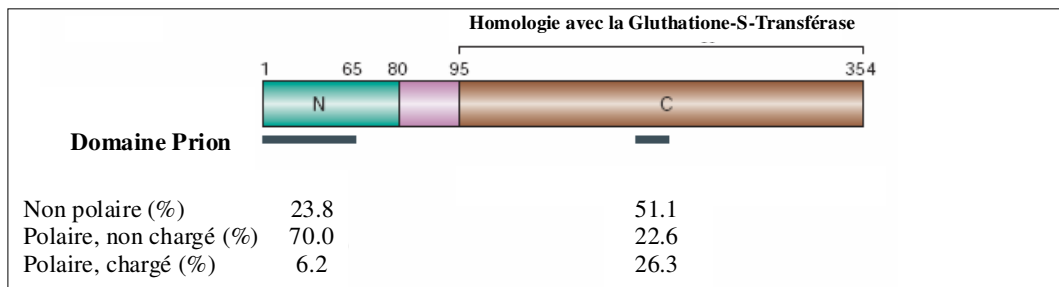
La protéine Ure2p est une protéine de 354 acides aminés.

La partie N-terminale de la protéine Ure2p (acides aminés 1-93) est non structurée et contient un taux particulièrement élevé en résidus asparagine, elle est composée de 44% de résidus asparagine et glutamine alors que leur fréquence est inférieure à 10% dans le reste du protéome.

Le domaine N-terminal correspond au domaine prion appelé PFD pour « *Prion Forming Domain* ». Ce domaine est nécessaire et suffisant pour induire le phénotype prion [URE3].

En revanche, le domaine C-terminal (acides aminés 94-354) est très structuré (Thual et al., 1999) et riche en hélices α .

Le domaine C-terminal est suffisant pour compléter une délétion du gène *URE2*. Il est responsable de l'activité de la protéine mais n'est pas nécessaire à la formation de la forme prion de la protéine. Le domaine C-terminal est homologue aux Glutathion S-Transférase (GST) bactérienne (Bousset et al., 2001; Umland et al., 2001) (figure 14). Comme les GST, Ure2p se dimérise et possède la capacité de fixer le glutathion (Bousset et al., 2001; Thual et al., 1999). En revanche il ne présente pas l'activité enzymatique des GST (Choi et al., 1998). Par ailleurs, deux études ont montré que les cellules délétées pour le gène *URE2* sont sensibles à des métaux lourds ou à des agents oxydants suggérant une activité de détoxification pour la protéine Ure2p (Basu et al., 2004; Rai et al., 2003). Ces analyses ont été confirmées par une étude récente montrant qu'*in vitro* Ure2p est pourvue d'une activité glutathion peroxidase (Bai et al., 2004).



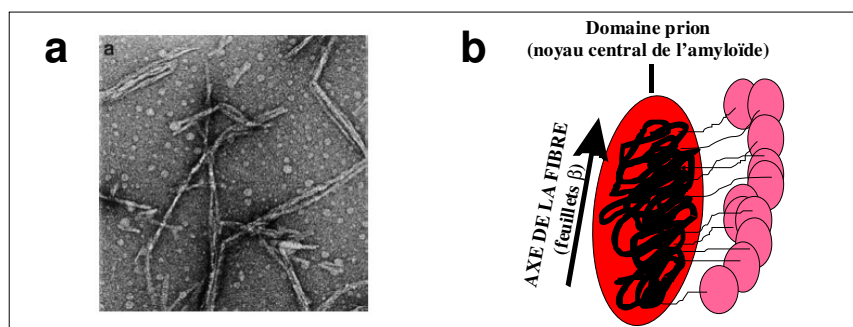
D'après Tuite, 2003

Figure 14 : Structure de la protéine Ure2p.

La protéine Ure2p est formée de deux domaines: un domaine N dans la partie N-terminale et un domaine C dans la partie C-terminale. Le domaine prion se situe en N-terminal. Il est riche en acides aminés polaire et non chargés.

II.3.1.2 Formation de fibres amyloïdes

Le domaine prion à lui seul peut générer des fibres amyloïdes résistantes aux protéases et observables au microscope comme de fins filaments d'environ 4 nm de diamètre (Taylor et al., 1999) (figure 15).



D'après Bousset et al., 2002

Figure 15 : Structure des fibres amyloïdes d'Ure2p.

a. Observation microscopique d'une fibre amyloïde formée *in vitro*; **b.** Comme pour Sup35p, Ure2p à l'état prion forme des fibres amyloïdes, avec un noyau central constitué des domaines N-terminaux et une partie périphérique constituée de l'ensemble des domaines globulaires.

II.3.1.3 Systèmes rapporteurs pour la détection de [URE3]

❖ Système utilisant l'USA

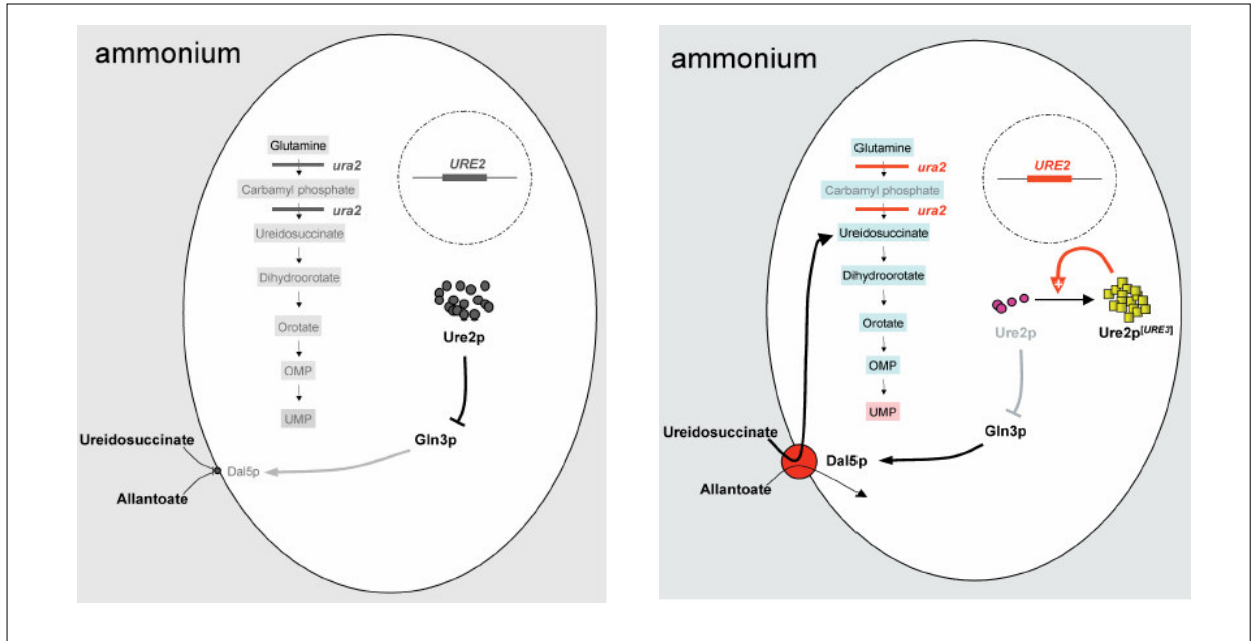
La sélection des cellules [URE3] (portant la mutation *ura2*) est basée sur leur faculté à incorporer l'USA et à croître sur un milieu minimum (sans uracile) contenant une source riche d'azote et d'USA, contrairement aux cellules de même génotype mais de phénotype [*ure3-0*] qui ne contiennent pas la forme prion de la protéine Ure2p (figure 16).

❖ Système utilisant la construction *pDAL5-ADE2*

On peut aussi déterminer la présence du prion [URE3] par un système de coloration blanc-rouge (Schlumpberger et al., 2001) : Le gène *ADE2*, intervenant dans la voie de biosynthèse de l'adénine, est mis sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*. Ainsi dans des cellules [URE3], Gln3p n'est pas séquestrée et la protéine Ade2p est traduite grâce à l'activation de la transcription du gène *ADE2* à partir du promoteur du gène *DAL5* ; les levures formeront alors des colonies blanches sur un milieu riche et se développeront aussi sur un milieu dépourvu d'adénine. Au contraire, dans des cellules [*ure3-0*], la protéine Ade2p n'est pas synthétisée ce qui se traduit par un arrêt dans la voie de biosynthèse de l'adénine et l'accumulation d'un pigment rouge ; les levures formeront alors des colonies rouges sur un milieu riche (figure 16) et ne se développeront pas sur un milieu dépourvu d'adénine. En utilisant ce système rapporteur, les cellules [*ure3-0*] et [URE3] sont différenciées par le phénotype [Ade] et la couleur.

Récemment, de nouvelles alternatives ont été développées en plaçant d'autres gènes rapporteurs sous contrôle du promoteur *DAL5* (*URA3*, *kanMX* ou *CAN1*) (Brachmann et al., 2006).

a



D'après Fernandez-Bellot, 2001

b

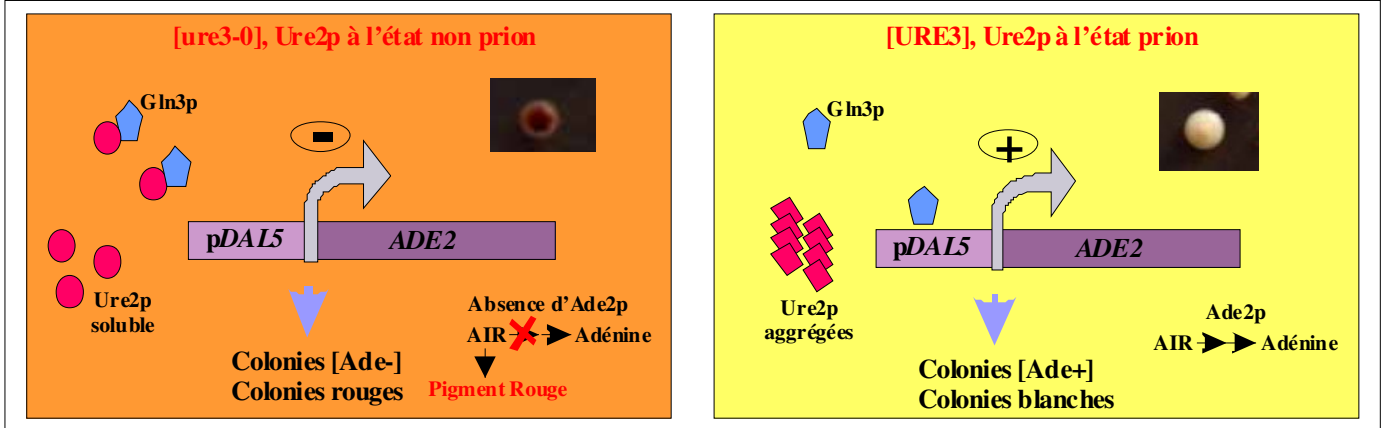


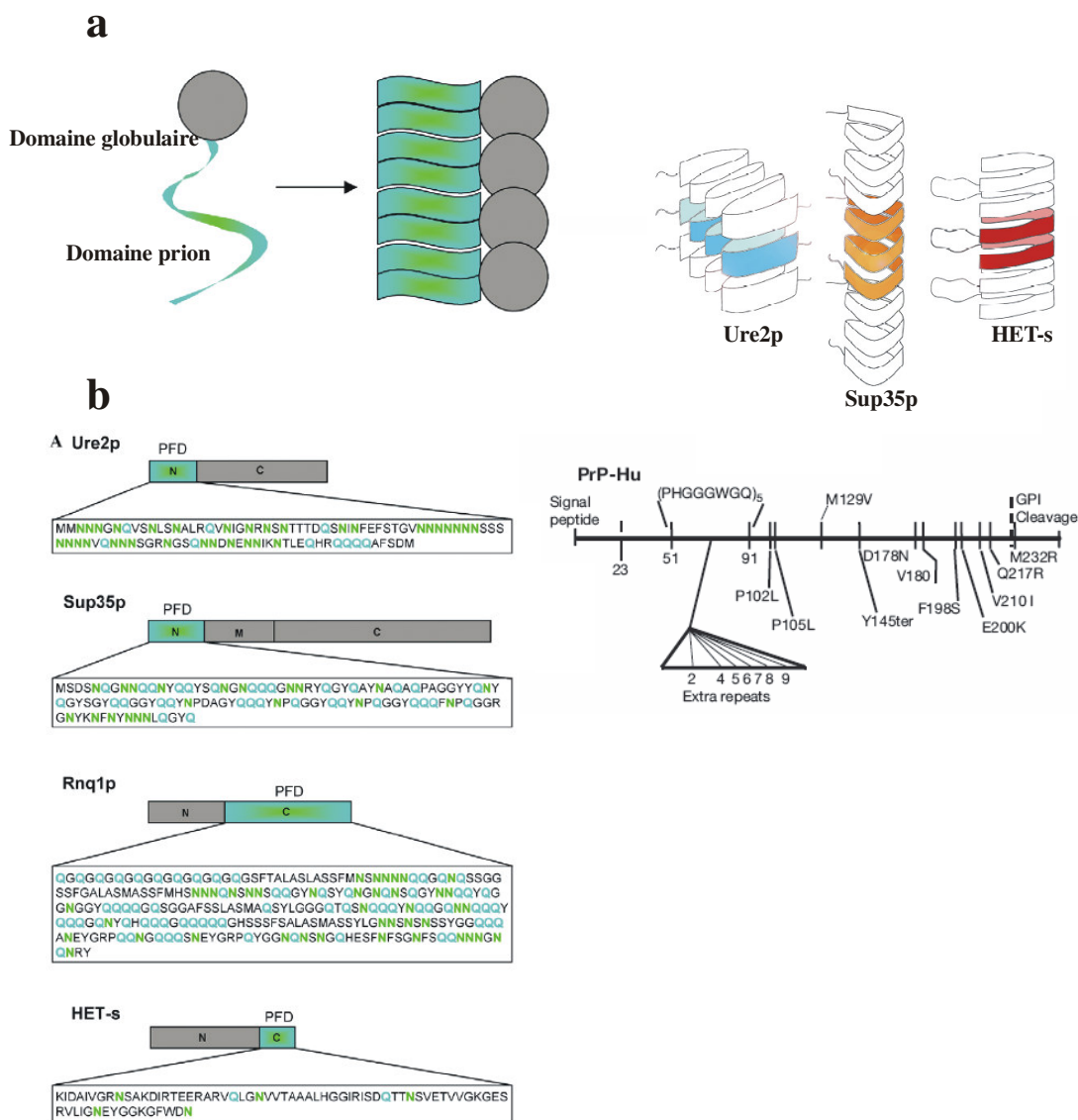
Figure 16 : Systèmes rapporteurs de [URE3].

A. Dans un milieu riche en azote, Ure2p à l'état non prion (non agrégée), inhibe la fixation du facteur de transcription Gln3p sur ses gènes cibles; en l'occurrence, le gène *DAL5* qui code pour une perméase laissant passer, entre autre, l'USA dans la levure (a). Au contraire, lorsque Ure2p est à l'état prion (agrégée), Gln3p pourra aller activer la transcription de *DAL5* et l'USA pourra alors entrer dans la cellule. Une cellule [URE3] pourra croître sur un milieu USA, contrairement à [ure-0] (b).

B. Dans les cellules dont le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur *DAL5*, et que Ure2p est sous conformation normale (non agrégée), la protéine se lie à la protéine Gln3p qui ne peut donc activer la transcription du gène *ADE2*. Comme dans le cas des cellules [*psi*-], la souche [ure-0] formera alors des colonies rouges et ne pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine. Au contraire, lorsque Ure2p est sous conformation prion, la protéine Ure2p ne pourra se lier à Gln3p, qui pourra ainsi aller activer la transcription de *ADE2*. La souche [URE3] formera des colonies blanches et pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine.

II.3.1.4 Conversion conformationnelle d'Ure2p

Le processus de conversion est le même que pour Sup35p décrit ci-après hormis le fait que l'unité oligomérique est plus petite puisqu'elle ne contient que 4 à 6 molécules (Serio et al., 2000; Xu et al., 2001). Un modèle de fibre amyloïde proposé est celui en β serpentine où chaque unité d'Ure2p en zig-zag se situe dans un plan perpendiculaire à l'axe de la fibre (Kajava et al., 2004) (figure 17).



D'après Benkemoun, 2006

Figure 17 : Schématisation des conformations des prions de champignons.

a. Schéma d'une protéine prion avec son domaine prion non structuré et son domaine globulaire ainsi que sur le panneau de droite, le modèle en β serpentine de Ure2p (Kajava et al, 2004) puis le modèle en hélice β de Sup35p (Kishimoto et al, 2004) et enfin le modèle de HET-s (Ritter et al, 2005). **b.** Les différentes protéines prion avec leurs domaines prion respectifs : les domaines prion d'Ure2p et de Sup35p sont riches en asparagine et glutamine, le domaine prion de Rnq1p est riche en asparagine et glutamate. Le domaine prion de HET-s est situé en C-terminal et seuls Sup35p et PrP possèdent des répétitions d'un octapeptide.

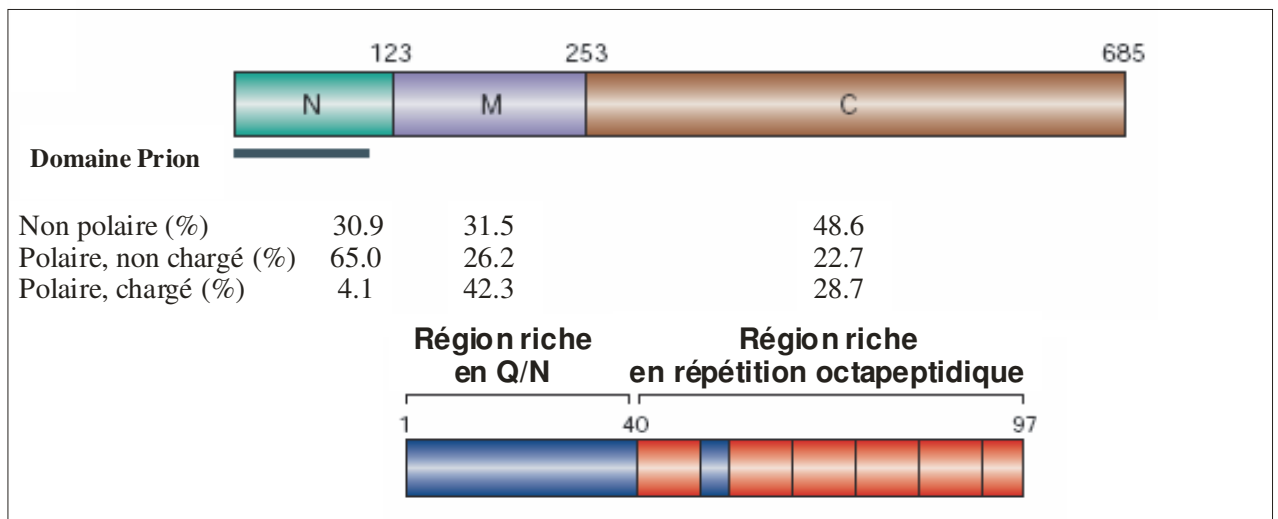
II.3.2 Sup35p : forme non pathologique de la protéine prion [*PSI*⁺]

Sup35p est l'homologue chez la levure d'ERF3 chez les mammifères : il forme avec Sup45p (homologue chez la levure d'ERF1), un facteur de terminaison de la traduction, reconnaissant le codon stop au niveau de l'ARNm.

SUP35 est un gène essentiel, le phénotype [*PSI*⁺] ne correspond donc qu'à une inactivation partielle des protéines Sup35p.

II.3.2.1 Structure

Sup35p est une protéine de 685 acides aminés, essentielle pour la cellule. Elle est composée de 3 domaines (figure 18).



D'après Tuite, 2003

Figure 18 : Structure de la protéine Sup35p.

La protéine Sup35p est composée de trois parties : un domaine N-terminal (résidus 1 à 123), la partie M (résidus 124 à 253) et la partie C-terminale (résidus 254 à 685). La région C-terminale est nécessaire et suffisante pour la fonction cellulaire de terminateur de traduction de Sup35p. La distribution des acides aminés non polaires, non chargés et polaires chargés est très différente d'une partie à l'autre. La partie N-terminale constitue le domaine prion. Elle est essentiellement constituée d'acides aminés polaires et non chargés. Le domaine prion « minimal » s'étend des résidus 1 à 97. Ce domaine peut être divisé en deux : une région riche en asparagine et glutamine et une région riche en répétition de l'octapeptide (6 répétitions).

1. Un domaine N-terminal, le domaine N, (acides aminés 1-123). Ce domaine peut être divisé en deux. Un premier domaine (acides aminés 1-42) riche en résidus asparagine et glutamine nécessaire et suffisant pour induire le phénotype [*PSI*⁺] (Derkatch et al., 1996) ; et un autre domaine contenant 6 répétitions d'un octapeptide PQGGYQQ_YN riche en résidus asparagine et glutamine (acides aminés 43-123) nécessaire pour la propagation du phénotype prion (DePace et al., 1998; Derkatch et al., 1999; Hara et al., 2003; Kochneva-Pervukhova et al., 1998; Liu and Lindquist, 1999; Osherovich et al., 2004).

2. Un domaine central nommé M (acides aminés 124-253). Ce domaine est particulièrement chargé par rapport au reste de la protéine car il est riche en résidus acide aspartique, acide glutamique et lysine (40% du domaine). Ce domaine n'est essentiel ni pour la fonction de la protéine ni pour la fonction prion. Il pourrait cependant jouer un rôle dans la stabilité du prion lors de la mitose et de la méiose grâce à une activité potentiellement « solubilisatrice » qui pourrait contribuer peut-être à la réplication des amorces infectieuses (Liu et al., 2002a).
3. Un domaine C-terminal nommé C (acides aminés 254-685). Ce domaine est essentiel puisque sa délétion est létale pour la cellule (Ter-Avanesyan et al., 1993). Il est homologue au facteur EF-1 α et est suffisant pour la fonction de terminaison de la traduction (Kushnirov and Ter-Avanesyan, 1998).

Le domaine prion est modulaire : la fusion du domaine N avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*) produit une forme agrégée pouvant servir d'amorce pour la formation d'agrégats [*PSI*⁺] (Patino et al., 1996). Ainsi, le domaine prion est nécessaire et suffisant pour la propagation des prions. Des résultats similaires ont été obtenus avec le domaine prion d'Ure2p (Baxa et al., 2002).

II.3.2.2 Système rapporteur pour la détection de [*PSI*⁺]

La détermination de sa présence se fera également par un système de coloration blanc-rouge.

Les cellules contenant les protéines sous forme prion sont ainsi différenciées par le phénotype [Ade] et la couleur des colonies qu'elles forment (figure 19).

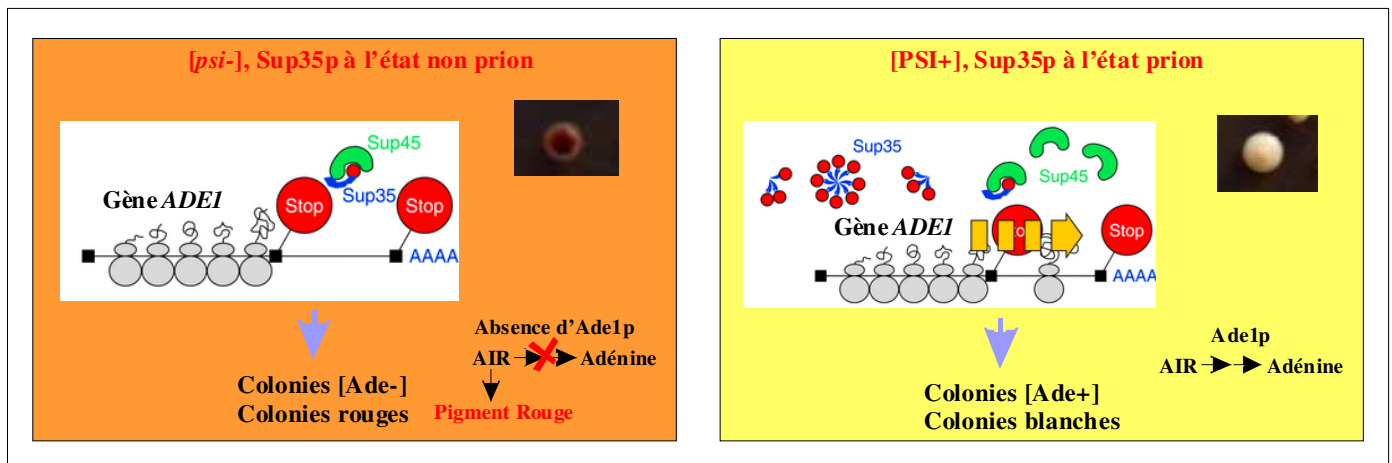


Figure 19 : Système rapporteur de [PSI+].

Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction. Lorsque dans une cellule ayant un codon stop dans son gène *ADE1*, Sup35p est sous conformation normale, non agrégée, la protéine liera le codon stop et la protéine Ade1p ne sera pas produite. Cette protéine étant nécessaire dans la chaîne de synthèse de l'adénine, son absence provoquera un arrêt dans la chaîne et l'accumulation d'un pigment rouge. La souche [*psi*-] formera donc des colonies rouges et ne pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine. Au contraire, lorsque Sup35p est sous conformation prion, c'est-à-dire agrégée, la protéine ne peut accomplir correctement sa fonction et il pourra y avoir translecture. L'ARN messager du gène *ADE1* pourra être traduit. La souche [*PSI*+] formera ainsi des colonies blanches et pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine.

II.3.2.3 Conversion conformationnelle de Sup35p

Les deux grandes étapes de la conversion de Sup35p en protéine prion sont les suivantes :

1. formation d'une unité oligomérique pouvant contenir 20 à 80 molécules (Serio et al., 2000; Xu et al., 2001).
2. polymérisation de ces unités menant à une croissance bidirectionnelle des fibres amyloïdes.

Les régions riches en asparagine/glutamine des domaines prion favoriseraient les interactions inter et intra-moléculaires et initieraient ainsi la formation de feuillets β et des agrégats. Les séquences répétées d'octapeptides intensifieraient le processus d'agrégation.

Des travaux récents du groupe de Suzette Priola montrent qu'en système mammifère, une augmentation du nombre de répétitions d'octapeptides est corrélée avec une formation spontanée beaucoup plus rapide d'amyloïdes PrP^{res}. Ceci est dû à une plus grande capacité de liaison de cette dernière avec d'autres molécules PrP (Moore et al., 2006). On retrouve d'ailleurs une augmentation du nombre de répétitions d'octapeptides dans des formes génétiques familiales de CJ ; ces données confortent les résultats des expériences réalisées en levure où le nombre de répétitions octapeptidiques dans le domaine prion en N-terminal influence le taux de protéines sous forme prion (Jiang et al., 2004; Liu and Lindquist, 1999). En outre, le domaine prion présente un fort degré de flexibilité favorisant les changements de conversion (Scheibel and Lindquist, 2001).

De nombreux modèles récents montrent que la forme amyloïde aurait une structure en hélices β avec des feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre et un arrangement parallèle de feuillets β (figure 17) (King and Diaz-Avalos, 2004; Kishimoto et al., 2004; Serio et al., 2000).

Il a été montré en double hybride, que la protéine Sup35p liait la protéine Sla1p par son domaine riche en asparagine/glutamine. La protéine Sla1p est impliquée dans la régulation de l'assemblage des filaments d'actine (Bailleul et al., 1999). La délétion du gène *SLA1* diminue l'induction de $[PSI^+]$ (Ganusova et al., 2006). Le cytosquelette d'actine jouerait un rôle universel pour favoriser l'agrégation et la « prionisation » de diverses protéines mal repliées ou ayant tendance à mal se replier puisque ces éléments du cytosquelette ont également été montrés, en système levure, nécessaires pour la formation des agrégats poly-Q, impliqués dans la maladie de Huntington (Muchowski et al., 2002).

Un récapitulatif des phénotypes des prions de levures est mentionné en figure 20.

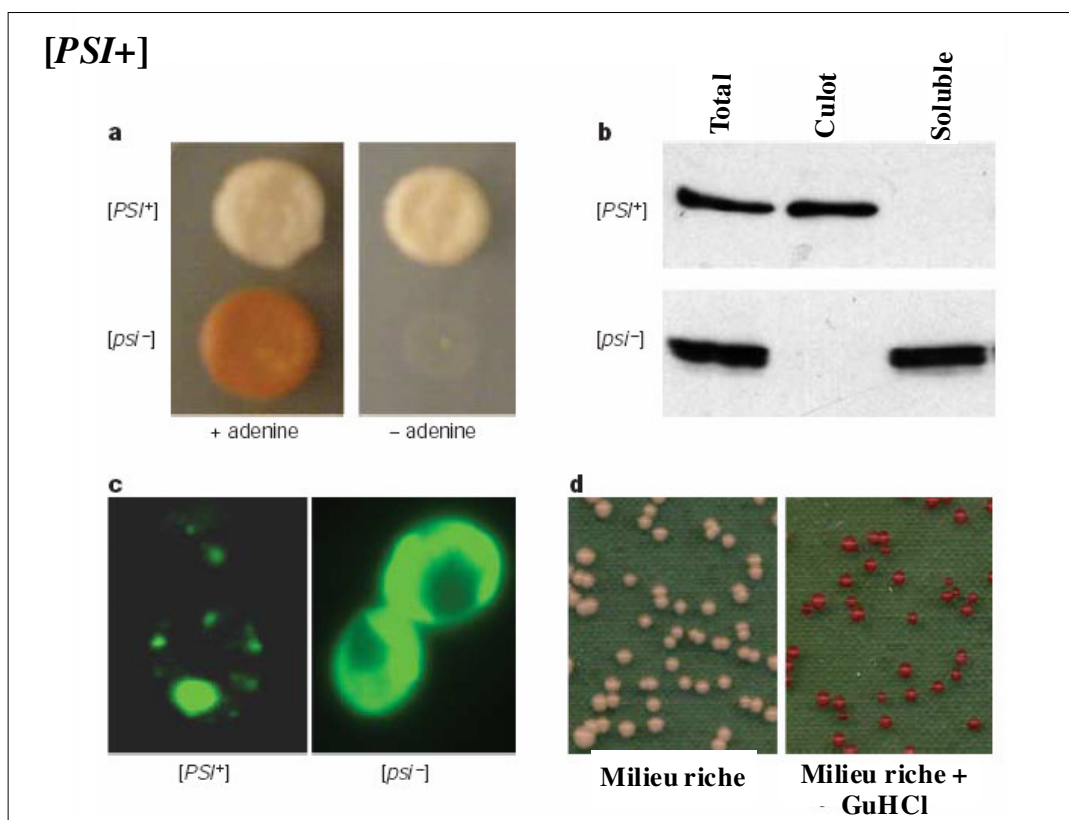


Figure 20 : résumé des différents phénotypes liés au prion de levure [PSI+]. Les levures contenant la protéine sous forme prion peuvent croître sur un milieu dépourvu d'adénine (a) forment des colonies blanches (d), la protéine Sup35p y forme des agrégats (c), et est culottée après centrifugation (b).

II.4 Les autres prions de champignons

Le premier critère de choix pour identifier d'autres protéines prion est la richesse en asparagine et glutamine commune à Sup35p et Ure2p. Pour cela, des analyses bioinformatiques ont été réalisées par Melissa D. Michelitsch et Jonathan S. Weissman, afin d'identifier les protéines de *S.cerevisiae* contenant au moins 30 glutamines et asparagines sur 80 acides aminés successifs, soit 37,5% (Michelitsch and Weissman, 2000). 107 polypeptides, soit 1,7% du protéome, possèdent cette caractéristique. Une autre étude menée par Neal Sondheimer et collaborateurs consistait à effectuer des alignements de séquences (BLAST) entre les bases de données du NCBI et les domaines prion de Sup35p et Ure2p.

Certains critères mentionnés dans le tableau 6 sont caractéristiques d'un prion :

- hérédité cytoplasmique,
- transmission non-mendélienne,
- état prion métastable et

- curable.

Cependant, certains prions ne possèdent que certaines de ces caractéristiques.

II.4.1 [PIN⁺], la « maman » des prions

Son phénotype prion est nommé [PIN⁺] pour [PSI⁺] *Inducibility* car dans les souches [PIN⁺], la surexpression de Sup35p induit [PSI⁺] alors que dans les souches [pin⁻] ce n'est pas le cas (ce qui lui a valu son surnom de « maman ») (Derkatch et al., 1997). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que [PIN⁺] titre des facteurs cellulaires inhibiteurs de la formation de [PSI⁺] ou encore que les amorces de [PIN⁺] servent d'amorces pour la formation des agrégats [PSI⁺].

Cette protéine a ensuite été identifiée par les deux études bioinformatiques citées ci-dessus et a été nommée Rnq1 pour *Rich in asparagine and glutamine*. Elle est constituée de 405 acides aminés et contient un domaine riche en asparagine et glutamine situé entre les acides aminés 153 et 405. Des protéines chimères contenant le domaine catalytique C de Sup35p et le domaine riche en glutamine/asparagine de Rnq1 ont été construites afin d'étudier leurs capacités à basculer dans l'état inactif [PSI⁺]. Ces expériences ont montré que la protéine Rnq1p était de fait un nouveau prion de la levure. Des expériences semblables à celles décrites précédemment montrent que le domaine riche en Asn et Gln possède les mêmes caractéristiques que les domaines NM des gènes orthologues de SUP35. De plus, sa surexpression entraîne l'agrégation de Rnq1p, agrégation qui se transmet de façon dominante (Patino et al., 1996). Irina L. Derkatch et collaborateurs ont également décrit que Ure2p et New1p peuvent être à l'origine du phénotype [PIN⁺]. La présence d'[URE3] ou de [NU⁺] (prion de New1p) induit l'apparition de [PSI⁺] (Derkatch et al., 2001; Osherovich et al., 2004). La fonction de Rnq1p est encore inconnue. Récemment il a été montré que des mutants de Rnq1p ont un défaut dans la sporogénèse (Orlowska-Matuszewska and Wawrzycka, 2006).

II.4.2 [NU⁺]

[NU⁺] est la forme prion de la protéine New1p. Cette dernière est constituée de 1197 acides aminés. Le domaine riche en asparagine/glutamine, et comme Sup35p, les répétitions d'un oligopeptide se situent entre les acides aminés 1 et 153 de New1p. Des protéines chimères contenant le domaine catalytique C de Sup35p et les domaines riches en glutamine/asparagine de New1p induisent un phénotype prion nommé [NU⁺] semblable au phénotype [PSI⁺], c'est-à-dire de suppresseur de codon stop. [NU⁺] peut être transféré par cytoduction et curé par un traitement au Chlorure de Guanidium (GuHCl) (Osherovich et al., 2004). [NU⁺] constitue ainsi un quatrième prion de levure.

II.4.3 Autres prions de *S.cerevisiae*

[ISP⁺], impliqué dans la régulation de la terminaison de la traduction, comme [PSI⁺] (Volkov et al., 2002).

[GR], impliqué dans la résistance aux glucosamines, analogues structuraux du glucose qui inhibent la croissance sur un milieu avec des sources de carbones non-fermentables (Uptain and Lindquist, 2002).

[β], protéase B vacuolaire codée par le gène *PRB1* (Roberts and Wickner, 2003). Les cellules manquant de [β] ne peuvent faire des méioses ou former des spores et sont sensibles à la privation nutritive contrairement à ceux qui possèdent [β].

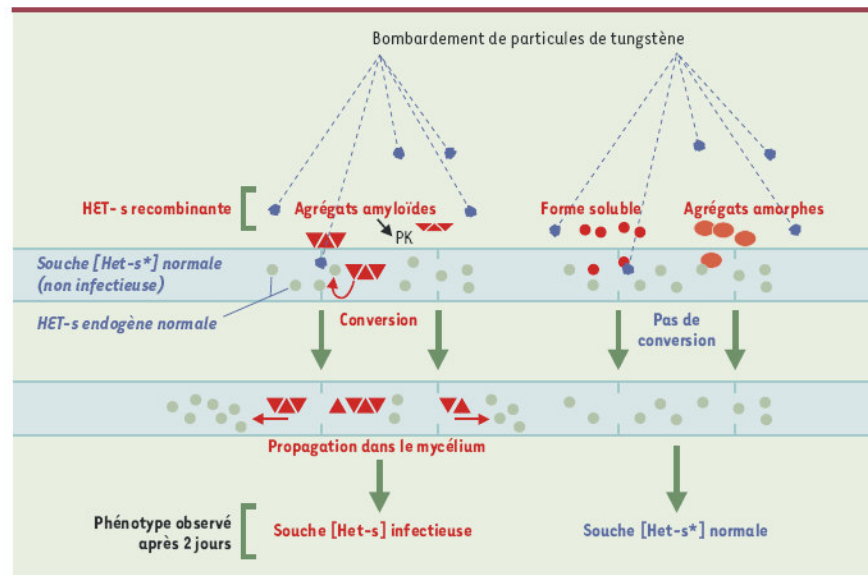
II.4.4 Autres prions de champignons : chez *Podospora anserina*

[HET-s], « le prion qui reconnaît le non-soi »

Dans les années 1950, des analyses génétiques de l'incompatibilité végétative chez le champignon filamenteux de *P.anserina* ont permis de mettre en évidence un élément génétique non-mendélien : [Het-s] (Rizet and Esser, 1953). Ces mycéliums de *P.anserina* subissent des évènements de fusions cellulaires végétatives et spontanées. Ces fusions cellulaires, appelées anastomoses mènent à un mélange cytoplasmique et à la formation d'hétérocaryons « végétatifs » (cellules contenant différents types nucléaires). La viabilité de ces hétérocaryons est génétiquement contrôlée par plusieurs *loci* : les *loci* HET (pour *hétérocaryon incompatibility*). Parmi eux, le *locus het-s* qui existe sous deux formes alléliques distinctes *het-s* et *het-S* dont les protéines résultantes diffèrent de 13 acides aminés sur les 289 composants la protéine (Turcq et al., 1991). Elles sont impliquées dans une réaction de mort cellulaire par incompatibilité végétative. Lorsque les deux protéines sont co-exprimées dans la même cellule, il y a mort de la cellule (Saupe, 2000) évitant ainsi des croisements entre cellules de fonds génétiques différents et la transmission d'éventuels virus. Encore une fois, un prion n'est pas forcément mauvais et peut être au contraire bénéfique pour la cellule. D'ailleurs, on peut noter que [Het-s], [PIN⁺] et [β] diffèrent de [URE3] et [PSI⁺] dans le sens où ils ne sont pas détectés comme ayant une perte de fonction de la protéine correspondante.

Selon la définition de Reed Wickner (Wickner, 1994), les analyses ont montré que cet élément était bien un prion (Coustou et al., 1997). Cependant le domaine prion n'est pas riche en résidus asparagine/glutamine et ce dernier est situé dans la partie C-terminale entre les résidus 218 et 289.

La preuve ultime du caractère infectieux d'une protéine peut être obtenue si l'introduction de la protéine recombinante purifiée dans un organisme est suffisante pour propager le caractère infectieux. Marie-Lise Maddelein et collaborateurs ont purifié la protéine recombinante HET-s et testés différentes méthodes pour l'introduire dans *Podospora* (Benkemoun et al., 2006).



D'après Maddelein, 2002

Figure 21 : Technique de biolistique.

Des bombardements de particules de tungstène (bleu) introduisent la protéine recombinante (rouge) dans le champignon. La souche de départ, de phénotype neutre [Het-s*], exprime la protéine HET-s sous forme soluble dans le cytoplasme (vert). Après bombardement, des particules de tungstène peuvent être visualisées dans le mycélium et l'introduction de la protéine HET-s recombinante contrôlée par marquage à la fluorescéine. Conversion : modification de la protéine cellulaire normale en forme prion. La forme prion [Het-s] se propage ensuite à toute la souche grâce à la communication cytoplasmique entre articles le long des hyphes.

L'avantage de la technique de la biolistique, décrite dans la figure 21, est de permettre l'introduction de molécules dans des mycéliums entiers. En effet, le mycélium des champignons filamenteux présente une continuité cytoplasmique favorisant la propagation d'éléments infectieux. Ainsi, même si l'introduction de la protéine recombinante est un événement rare, l'apparition de la forme infectieuse [Het-s] dans un article (cellule non cloisonnée du mycélium) peut se transmettre à la protéine HET-s endogène et envahir rapidement tout le champignon. Grâce à cette continuité cytoplasmique, l'essai biolistique s'est montré très efficace : l'introduction de la protéine recombinante HET-s a permis d'induire le caractère infectieux [Het-s] dans presque 100 % des souches neutres [Het-s*]. Le caractère infectieux de la protéine recombinante HET-s de *Podospora* a ainsi été démontré

clairement et, par là même, confirmé l'existence de protéines infectieuses ou prions capables de former des agrégats dans une souche [Het-s] (Coustou-Linares et al., 2001) et des fibres amyloïdes *in vitro* (Dos Reis et al., 2002).

En 2005, l'équipe de Christiane Ritter a montré que la forme prion formait aussi, tout comme Sup35p, des fibres amyloïdes riches en feuillets β (Ritter et al., 2005).

[C⁺]

[C⁺] (pour *Crippled growth*) est impliqué dans la croissance du mycélium. Il induit une morphologie anormale des hyphes, une accumulation de pigment, une longévité courte et réduit la fertilité femelle (Silar et al., 1999).

Les caractéristiques de différents prions de champignons sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6 : caractéristiques des différents prions de champignons

Caractéristiques des prions	[PSI+]	[URE3]	[Het-s]	[RNQ+] [PIN+]
Métastable	+	+	+	+
induit par la surexpression de la protéine normale	+	+	+	+
protéine ayant 2 états conformationnels	+	+	+	+
mime la perte de fonction de la protéine	+	+	-	ND
dominant	+	+	+	+
hérédité non-mendélienne	+	+	+	+
hérédité cytoplasmique	+	+	+	+
domaine prion (PD)	+	+	+	+
PD riche en glutamine et asparagine	+	+	-	+
répétitions octapeptidique dans le PD	+	-	-	-
variants de souches	+	+	ND	ND
curable	+	+	+	+
curé par une délétion d'Hsp104	+	+	ND	+
curé par une surexpression d'Hsp104	+	-	ND	-
curé par GuHCl	+	+	-	+

ND: Non Déterminé

II.4.5 Prions Divers

CPEB

Chez l'aplysie, la protéine CPEB, possède un domaine N-terminal riche en glutamine/asparagine. Cette protéine est impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm dormants, impliqués dans le stockage de la mémoire à long terme (Si et al., 2003a). Si et collaborateurs ont montré par ailleurs que chez *S.cerevisiae* cette protéine peut se comporter comme un prion (Si et al., 2003b). Par exemple, si le domaine N-terminal est fusionné avec la GFP, des agrégats de GFP sont observés par microscopie. Il reste maintenant à démontrer que CPEB se comporte bien comme un prion chez l'aplysie. Si tel est le cas, il s'agirait encore d'un prion bénéfique pour la cellule.

TIA1

Cette protéine est une protéine humaine impliquée dans l'assemblage de granules de stress (SGs) lors de l'initiation de la traduction. En culture, elle adopterait une conformation prion qui régulerait la traduction en réponse à un stress (Gilks et al., 2004).

II.4.6 Conclusion

Un prion est une protéine pouvant exister sous deux états différents. L'un d'entre eux, l'état prion, est riche en feuillets β et a tendance à former des agrégats et des fibres amyloïdes, le rendant par conséquent insoluble et résistant aux protéases. D'un point de vue séquence, il possède un domaine prion nécessaire et suffisant pour former des fibres amyloïdes. Les prions de levures peuvent être schématisés assez grossièrement par un domaine globulaire bien replié lié à une queue responsable de la formation des prions : le domaine prion (figures 16A). Ce dernier peut être situé en partie N-terminale comme dans le cas de Sup35p et Ure2p, mais aussi dans la partie C-terminale comme dans le cas de Het-s. Des modèles de structures différents ont été proposés pour chacun des trois prions : le modèle β -serpentine pour les fibres d'Ure2p (Kajava et al., 2004), un repliement en hélices β pour Sup35p (Kishimoto et al., 2004; Perutz et al., 2002), et une structure en feuillets β pour HET-s (Ritter et al., 2005) (figure 17). On peut noter que le modèle proposé pour PrP^{Sc} est un repliement en hélices β comme pour Sup35p, (Wille et al., 2002).

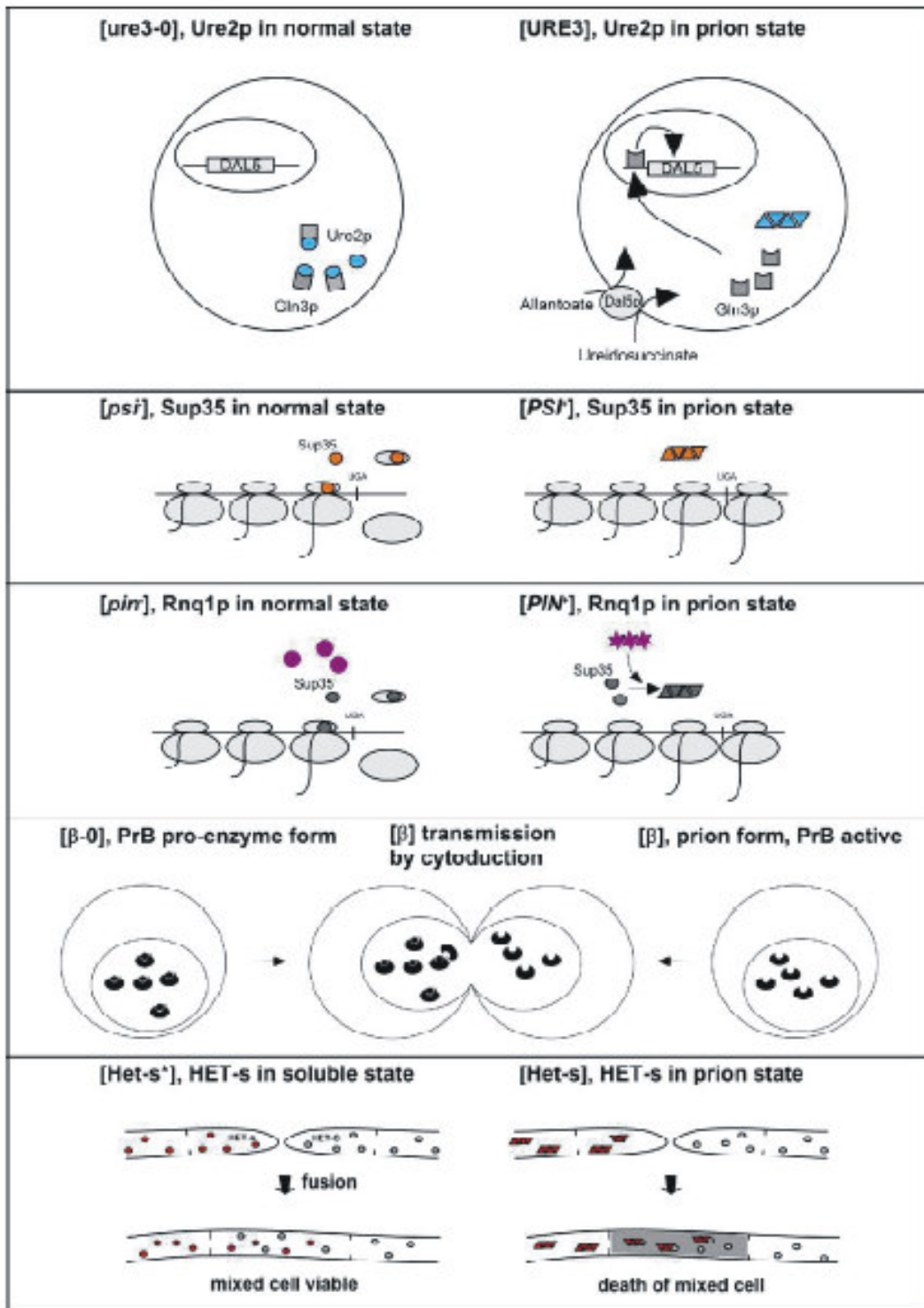
Il apparaît qu'un plus grand nombre de protéines pourraient être considérées comme des prions si on prend comme critère l'existence d'un domaine fonctionnellement équivalent au domaine NM de Sup35p. Les comparaisons de séquences augurent dans ce cas de l'existence de plusieurs dizaines de prions potentiels chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sondheimer and

Lindquist, 2000), mais aussi dans d'autres organismes tels que le nématode *C.elegans* ou la drosophile (Michelitsch and Weissman, 2000). L'ensemble de ces données apporte des éléments majeurs à la compréhension des mécanismes moléculaires d'apparition et de maintien des prions de levures. Ces données sont cependant difficilement généralisables aux prions de mammifères. Force est de constater que les critères de définition d'un prion de levure ne s'appliquent pas à la protéine PrP (ou [het-s]), qui est à la base du paradigme prion. En effet, ni PrP, ni Het-s ne sont particulièrement riches en glutamine/asparagine. Tout ceci suggère qu'il existe certainement de nombreuses protéines prion à découvrir. Ces dernières n'ont pas forcément un rôle négatif pour la cellule comme nous avons pu le voir avec CPEB, [HET-s] ou [β] (tableau 7). De plus, l'état prion d'une protéine n'est pas forcément associé à une perte de fonction (figure 22), comme nous pouvons le voir dans les cas de [URE3] et [PSI⁺]. Il est aussi important de noter qu'il existe de nombreuses protéines qui forment des agrégats amyloïdes qui sont totalement inoffensifs pour l'hôte. Prenons un exemple parmi tant d'autres : la protéine Curli chez *Escherichia coli*. Curli forme des fibrilles qui se déposent à la surface cellulaire et favorisent ainsi l'adhésion cellulaire au substrat pour la colonisation de surfaces inertes permettant ainsi la formation des biofilms (pour revue, (Barnhart and Chapman, 2006)). Ceci n'est pas restreint au monde microbiologique, en effet il existe également de multiples exemples chez les organismes supérieurs tels que les insectes ou les mammifères par exemple (Stefani, 2004).

Tableau 7 : Protéines prions ainsi que les phénotypes qui leurs sont associés

Espèces	Protéine impliquée	Etat non prion	Etat prion	PD riche en Gln/Asn	répétition octapeptide	fonction cellulaire	phénotype prion
Mammifère	PrP 209 aa	PrPc	PrPsc	Non	Oui aa. 51-91	inconnue	Sévère neurodégénérescence
<i>S.cerevisiae</i>	Sup35p 685 aa	[psi-]	[PSI+]	Oui aa. 1-124	Oui aa. 41-97	terminateur de traduction	suppression non sens
<i>S.cerevisiae</i>	Ure2p 354 aa	[ure-0]	[URE3]	Oui aa. 1-80	Non	repressur de transcription	croissance sur milieu minimum
<i>S.cerevisiae</i>	Rnq1p 405 aa	[rnq-]	[PIN+]	Oui aa. 153-406	Plusieurs séq. Dégénérées	inconnue	induction de [PSI+]
<i>P.anserina</i>	HET-s 289 aa	[Het-s*]	[Het-s]	Non	Non	incompatibilité des hétérocaryons	induction de la mort cellulaire en présence de HET-S
<i>A.californica</i>	ApCPEB1 687 aa	-	-	Oui aa. 1-150	Oui aa. 84-138	régulation de la traduction d'ARNm spécifiques	mémoire à long-terme

aa:acides aminés; PD: Domaine Prion; Gln: Glutamine; Asn: Asparagine



D'après Benkemoun, 2006

Figure 22 : différents prions de champignons et les phénotypes résultants.

Dans les cellules [URE3], Ure2p est inactivée et le facteur de transcription Gln3p est alors libre d'activer l'expression de la perméase Dal5p, ce qui permet la croissance sur un milieu supplémenté en uréidosuccinate (USA). Dans les cellules [PSI⁺], Sup35p est inactivée, ce qui conduit à une suppression de mutation non sens. Dans les cellules [PIN⁺], l'induction *de novo* de [PSI⁺] est possible. Dans les cellules [β], PrB est dans sa forme active. Quand des cellules [Het-s] fusionnent avec des cellules het-S, on observe une mort cellulaire. (D'après Benkemoun et al, 2006).

II.5 Notion de souches et barrière d'espèce

II.5.1 Souches

Un des aspects les plus discutés des prions de mammifères est l'existence de souches différentes, qui diffèrent tant dans la période de latence de la maladie, les lésions cérébrales, les manifestations neuropathologiques que de la distribution de PrP^{Sc} dans le cerveau (Bruce, 1993). En effet, certains ont longtemps considéré que l'existence de ces différentes souches était incompatible avec l'hypothèse « protéine seule » et préconisait plutôt la piste virale.

Ce phénomène de souche a aussi été étudié pour [*PSI*⁺], [URE3] et [PIN⁺] pour lequel il existe aussi différentes formes, appelés variants (Cox, 1971; Derkatch et al., 1996). Aucun variant de [Het-s] n'a encore été décrit. Les variants de [*PSI*⁺] ont été découverts en premier, et sont les mieux caractérisés. La plupart des variants de [*PSI*⁺] sont distinguables par leur phénotype de suppresseur de la traduction et sont appelés « strong », « moderate » ou « weak » suivant la sévérité de la suppression (Derkatch et al., 1996). [ETA⁺] est considéré comme un variant « weak » de [*PSI*⁺]. Les variants « weak » sont moins stables et plus facilement curés par le chlorure de guanidium (Derkatch et al., 1996). Le variant « strong » est dominant sur le variant « weak » dans un croisement génétique (Derkatch et al., 1999). Ils peuvent aussi se distinguer par la différence de solubilité de Sup35p *in vivo* et par l'efficacité avec laquelle ils médient la conversion à l'état prion *in vitro* (Uptain et al., 2001). Le variant « strong » possède beaucoup moins de Sup35p soluble, et donc beaucoup plus de protéines agrégées formant des *foci* et pourra convertir Sup35p à l'état prion de façon beaucoup plus efficace allant jusqu'à un facteur 20 par rapport au variant « weak » (Uptain et al., 2001). Une explication consiste à dire que la protéine Sup35p adopte des conformations intrinsèques différentes ayant la capacité de convertir la forme normale en forme prion de façon plus ou moins efficace (Uptain et al., 2001).

Une publication récente montre que la région minimale du domaine prion de Sup35p capable de maintenir [*PSI*⁺] est la région 1-64 et que la variabilité des souches [*PSI*⁺] dépend de la différence de repliement de la région contenant les répétitions octapeptidiques (Shkundina et al., 2005).

Les variants [*PSI*⁺] apparaissent soit spontanément, soit lorsque le prion est induit *de novo* par la surproduction de Sup35p ou de fragments N-terminaux spécifiques (Derkatch et al., 1996). Une fois établis, les variants sont stables, c'est-à-dire qu'ils ne passent plus spontanément d'une forme « weak » à « strong » et *vice et versa*.

Les variants [URE3] n'ont été décrits que très récemment (Schlumpberger et al., 2001). Parce qu'il est difficile de se rendre compte d'une différence de croissance sur un milieu supplémenté en USA, les différents variants ne sont distinguables que dans les souches contenant le système rapporteur *pDAL5-ADE2* où les levures contenant le prion forment des colonies blanches alors que celles qui sont curées forment des colonies rouges. Ainsi, les différents variants sont identifiables par des nuances de coloration : rouge pour l'état non prion, rosée pour un prion « faible » et blanche pour le prion « fort », plus difficile à curer que les autres. Ceci est valable également pour identifier les prions [*PSI*⁺] puisqu'il existe un système rapporteur du même type, basé sur les différences de coloration. Ainsi, une colonie contenant un prion fort présentera une couleur blanche et formera de nombreux foyers de fluorescence si la protéine prion est fusionnée à la GFP, traduisant la formation d'agrégats de protéines insolubles.

Par ailleurs, des études de microscopie électronique de populations de fibres de Ure2p et de NM (domaine prion de Sup35p) ont montré une diversité de fibres s'auto-perpétuant avec des morphologies distinctes (Baxa et al., 2002; DePace and Weissman, 2002; Glover et al., 1997; Taylor et al., 1999). De telles différences pourraient également expliquer l'existence de souches et de variants.

De même, lorsqu'on introduit des fibres ayant poussé à 4°C dans des cellules [*psi*⁻], cela donne une souche « strong » alors que des fibres ayant poussées à 37°C donnent des souches « weak » (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004). Ceci montre que les phénomènes de souches peuvent, au moins, en partie, être dûs à des variations dans la formation des fibres amyloïdes. Ces expériences sont très importantes puisqu'elles démontrent clairement le modèle « protéine seule » chez *S. Cerevisiae* et ces expériences démontrent aussi clairement le phénomène de souche : suivant la conformation de la protéine infectieuse de départ, on obtient différentes souches.

II.5.2 Barrière d'espèces

Ce phénomène a d'abord été décrit pour les prions de mammifères. Il correspond à l'impossibilité pour un prion d'une espèce animale à infecter une autre espèce. Comprendre ce mécanisme est très important puisque cela permettrait éventuellement d'éviter la transmission d'un prion animal à l'homme.

Deux explications ont d'abord été proposées :

1. les différences des séquences protéiques de la protéine PrP entre deux espèces A et B, empêcherait l'interconversion de PrP entre espèces.
2. Des facteurs cellulaires spécifiques de l'espèce interviendraient dans la conversion de la protéine cellulaire en protéine prion.

Des études sur la protéine Sup35p de différentes espèces de levure révèlent aussi une barrière d'espèce pour les prions de levure. Alex Santoso et collaborateurs ont travaillé sur 8 espèces différentes de levures dont *S.cerevisiae*. Ils se sont d'abord aperçus que, malgré les distances évolutives, les domaines N et M étaient conservés. Ils ont ensuite montré que les domaines prions des différentes levures s'agrégeaient mais ne permettait pas la formation d'agrégats [*PSI*⁺] dans *S.cerevisiae*. Leurs résultats montrent que la barrière d'espèce résulte d'une remarquable spécificité d'interaction médiée par un épitope bien défini de 18 acides aminés situé dans le domaine prion (Santoso et al., 2000).

II.6 Propagation des prions

Modèle actuel de conversion *de novo* et de propagation des prions

D'après la suggestion de J.S. Griffith (1967) proposant qu'une protéine infectieuse anormale peut se lier à la forme normale et la convertir en forme anormale, deux modèles ont été largement discuté pour expliquer la propagation des prions : le modèle de propagation assisté par une amorce (Griffith, 1967; Prusiner, 1991) et le modèle de conversion *de novo* (Jarrett and Lansbury, 1993) (figure 23).

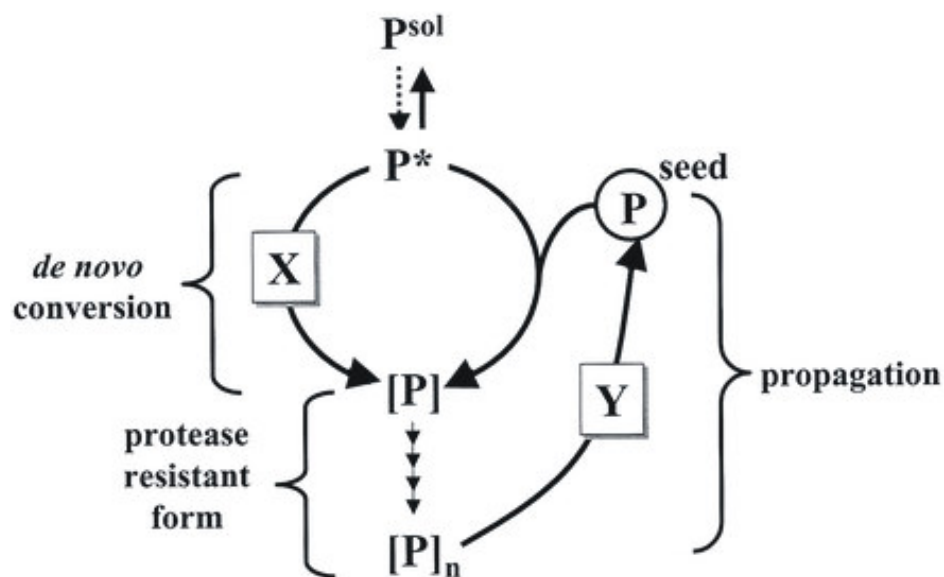
La forme normale de la protéine prion : P^{sol} existe en équilibre avec une forme structurellement distincte mais instable : P*. Cette dernière pourrait être convertie en forme prion stable : [P] par une des deux voies :

1. **Propagation** : Après une interaction avec une « amorce » prionique (P^{seed}), la forme instable P* peut être stabilisée et devenir stable [P] ; un processus qui ne nécessite pas de formation d'agrégats ou fibre amyloïde : [P]_n. De nouvelles « amorces » prioniques sont générées par « dissolution » de la forme amyloïde *via* un ou plusieurs facteurs cellulaires (Y).
2. **Conversion *de novo*** : Après une interaction avec un facteur cellulaire (X), la forme P* devient [P]...puis la suite est identique au cas précédent.

Parce que les prions sont infectieux et « transmissibles », ils sont capables de se répliquer afin de se propager. Durant la dernière décennie, la majorité des scientifiques a accepté l'hypothèse de Stanley Prusiner selon laquelle la forme infectieuse de la protéine PrP se propage par un procédé auto-catalytique sans recours à des acides nucléiques spécifiques (Prusiner, 1982).

Depuis, plusieurs écrits ont conforté et même démontré le modèle de la protéine infectieuse :

- ✚ La transformation « biolistique » d'agrégats amyloïdes [HET-s] dans des cellules [HET-s*] ([prion-]) résulte en une conversion de presque 100% en mycéliums contenant le prion [HET-s] (Maddelein et al., 2002).
- ✚ La transformation de sphéroplastes de levures [*psi*-] par des liposomes contenant le prion [*PSI*⁺] conduit à des cellules [*PSI*⁺] (Sparrer et al., 2000).
- ✚ Des fibres amyloïdes de Sup35p (produites *in vitro*) sont directement introduites dans des sphéroplastes de levures. La propagation et la conversion de [*PSI*⁺] est également observée (Santoso et al., 2000; Tanaka et al., 2004).



D'après Tuite, 2004

Figure 23 : Modèles de propagation des prions de levure.

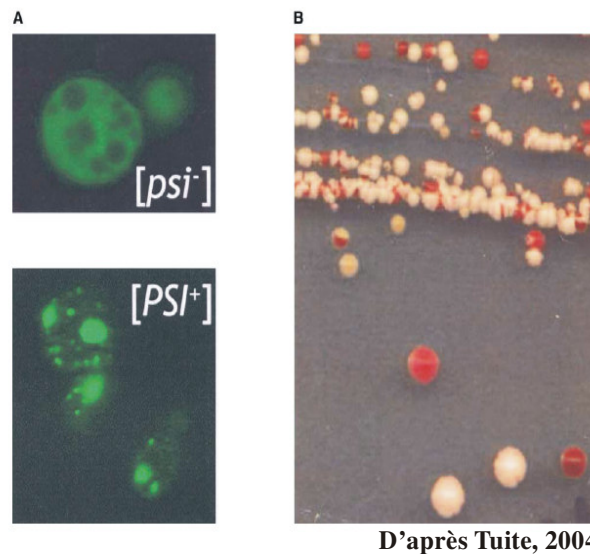
Deux modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer la propagation des levures :

Propagation : une forme instable P* peut être stabilisée et devenir stable [P] après une interaction avec une « amorce » prionique (Pseed). Ce modèle de « propagation » ne nécessite pas de formation d'agrégats ou fibre amyloïde : [P]n. ensuite, des nouvelles « amorces » prioniques sont générées par fragmentation de la forme amyloïde via un ou plusieurs facteurs cellulaires (Y) (ex : Hsp104p).

Conversion de novo : la forme P* peut être stabilisée et devenir stable [P] après une interaction avec un facteur cellulaire (X), Puis la suite est identique au cas précédent.

La propagation des prions de levures est assez facile à estimer par deux méthodes :

1. l'expression de la protéine de fusion Sup35p-GFP dans une cellule [*psi*⁻] donnera au microscope une coloration fluorescente diffuse dans la cellule alors que dans une cellule [*PSI*⁺], la protéine de fusion Sup35p-GFP donnera des *foci* très brillants correspondant très certainement à des agrégats de la protéine dans la cellule (figure 24).
2. Les cellules [*psi*⁻] portant l'allèle *ade1-14* (contenant un codon prématuré non sens UGA), donnent des colonies rouges sur un milieu riche tandis que dans ce même fond génétique, des cellules [*PSI*⁺] apparaîtront rosées ou blanches. Une faible efficacité de propagation du prion [*PSI*⁺] se traduira par l'apparition de colonies blanches avec des secteurs rouges [*psi*⁻] (Tuite and Koloteva-Levin, 2004) (figure 24).



D'après Tuite, 2004

Figure 24 : méthodes d'estimation de la propagation du prion de levure [*PSI*⁺].

A. L'expression de la protéine de fusion Sup35-GFP dans une cellule [*psi*⁻] donnera au microscope une coloration fluorescente diffuse alors que dans une cellule [*PSI*⁺], des agrégats sont visualisables.

B. Des cellules [*psi*⁻] portant l'allèle *ade1-14* donnent des colonies rouges sur un milieu riche alors que des cellules [*PSI*⁺] ayant le même fond génétique donnent des colonies blanches. Une faible efficacité de propagation du prion se traduit par l'apparition de colonies blanches avec des secteurs rouges.

En levure, la détermination du mode de transmission d'un caractère, nucléaire (hérédité mendélienne classique) ou cytoplasmique (phénotype prion par exemple) est facile à

déterminer en utilisant la méthode de transfert cytoplasmique appelée cytoduction (Wickner, 1994). La cytoduction permet à des levures d'échanger du cytoplasme. Pour ceci, il faut utiliser une souche portant une mutation nucléaire dite *kar* qui empêche la caryogamie après la conjugaison. La levure dicaryotique obtenue redevient alors très rapidement monocaryotique. Ainsi, si une souche de levure [*psi*-] est mise en contact avec une souche [*PSI*+] et portant la mutation *kar*, les deux souches résultantes seront [*PSI*+] sans qu'il y ait eu d'échange nucléaire.

Les domaines prion des protéines prion de levure sont indispensables pour la conversion à l'état prion. En mélangeant des extraits de cellules [*psi*] avec des extraits de cellules [*PSI*⁺] exprimant le fragment de Sup35p correspondant au domaine NM, la protéine entière Sup35p devient progressivement insoluble. De plus, cette capacité de conversion en protéine prion est propagée car si la protéine nouvellement convertie est ajoutée à un nouvel extrait de cellules [*psi*], les protéines solubles qu'il contient deviendront à leurs tours insolubles.

II.7 Facteurs cellulaires et propagation des prions de levure

II.7.1 Chaperons de protéines

Pour la survie des cellules, en particulier dans des conditions difficiles ou en réponse à des situations de stress, des mécanismes de protection ont été créés et maintenus lors de l'évolution. Il s'agit des protéines de choc thermique, ou protéines de stress ou encore HSP pour « heat shock proteins ».

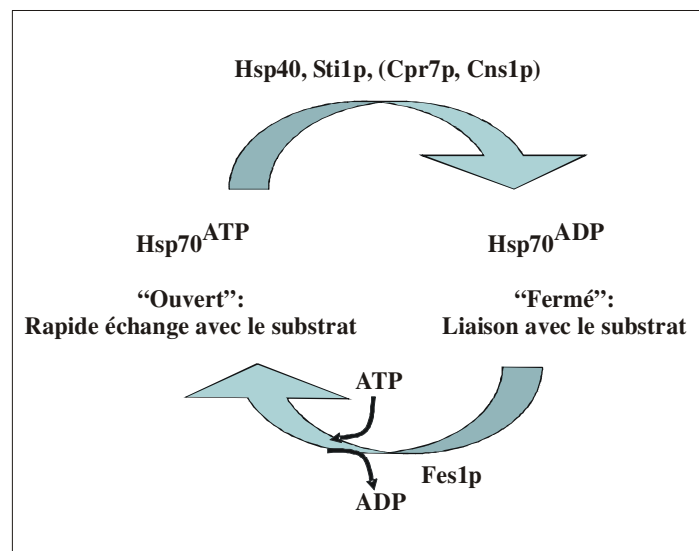
Trois grandes familles de protéines de choc thermique ont été décrites selon leurs tailles : 27 kDa, 70 kDa et 90 kDa.

L'induction de protéines de choc thermique a été décrite pour la première fois en 1962 chez la drosophile après chauffage des glandes salivaires de 25°C à 37°C (Ritossa, 1962). Ces protéines sont exprimées à la suite de toute situation qui compromet la survie cellulaire. Parmi ces situations se trouvent l'augmentation de la température, l'exposition à des métaux lourds ou à d'autres agents chimiques engendrant des mauvais repliements des protéines. Ces protéines sont synthétisées en réponse non seulement aux différents stress, mais aussi à des *stimuli* physiologiques ou physiopathologiques.

Le rôle des Hsps consiste alors à protéger l'ensemble vital des protéines cellulaires en assistant leur renaturation ou bien en les dirigeant vers la voie de la dégradation pour

empêcher leur agrégation qui nuirait à la viabilité de la cellule. Ainsi, la réponse des protéines de choc thermique peut être considérée comme un mécanisme universel de défense contre toute forme d'agression.

Les Hsps ont un domaine N-terminal ATPasique qui régule la fonction du domaine adjacent de liaison du substrat (SBD). Quand l'ATP est liée, le SBD est « ouvert » pour rapidement lier le substrat et le libérer (cycles rapides liaison/largage). L'hydrolyse de l'ATP en ADP convertit le SBD en une conformation « fermée » (cycles lents liaison/largage). L'échange de nucléotide restaure une liaison à l'ATP et ainsi une conformation ouverte permettant une libération du substrat et la recapture d'un nouveau substrat (figure 25). L'activité ATPase est stimulée par la liaison du substrat (Mayer et al., 2000), indiquant une communication entre ces deux domaines, influencée par l'interaction avec des co-chaperons. Les Hsp40p, une famille conservée de co-chaperons des Hsp70p, stimulent l'activité ATPase des Hsp70p. Les Hsp70p sont aussi régulées par des co-chaperons contenant des motifs répétés « tétratricopeptide » (TPR). Hop1 chez les mammifères (Sti1p chez la levure) possède deux TPR qui permettent la liaison simultanée de Hsp70p et Hsp90p formant ainsi un lien physique entre ces deux Hsps.



D'après Jones, 2004

Figure 25 : régulation des chaperons de protéines Hsp70.

La fonction des Hsp70 est finement régulée par l'hydrolyse de l'ATP et les échanges de nucléotides, qui régulent la liaison du substrat. Hsp40 stimule l'hydrolyse de l'ATP, favorisant ainsi la liaison au substrat tandis que Fes1p (facteur d'échange de nucléotides) accélère l'échange entre l'ADP et l'ATP, favorisant ainsi la libération du substrat.

L'apparition spontanée des prions pourrait intervenir lors d'un événement de mauvais repliement ou mépliage (*misfolding*) tandis que le phénomène inverse, c'est-à-dire la disparition du prion pourrait résulter d'un échec dans la propagation de la forme mal repliée ou d'une mauvaise ségrégation de ce caractère durant la division des cellules. Des mécanismes assurant la réplication (génération) de nouveaux prions ainsi que leur transmission aux cellules filles (ségrégation) doivent exister. Des facteurs cellulaires pourraient ainsi moduler ces deux étapes: taux d'agrégation et de dissolution des agrégats de façon à conduire à un équilibre optimal pour la propagation.

II.7.2 Hsp104p : essentiel à la propagation des prions

Le chaperon de protéine Hsp104p est un facteur cellulaire indispensable pour la propagation de $[PSI^+]$ probablement en désagrégeant partiellement les agrégats (aucun homologue n'a pu encore être décrit chez les mammifères). Ceci permet leur fragmentation ainsi que leur propagation dans les cellules filles issues de la division (Chernoff et al., 1995).

Dans le cas d'une surexpression d'Hsp104p, les agrégats seraient complètement dissous ce qui se traduirait par une cure.

Dans le cas d'un déficit d'Hsp104p, les agrégats ne seraient plus dupliqués par dissolution partielle et ils seraient donc perdus au cours des divisions cellulaires par dilution (Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996) (figure 26). Ainsi, trois à cinq mM de Chlorure de Guanidium (GuHCl) suffisent à curer les cellules très probablement en inhibant l'activité ATPase d'Hsp104p (Chernoff et al., 1995).

Le chlorure de guanidium est utilisé pour dénaturer les protéines *in vitro* mais cette propriété n'est certainement pas responsable de l'effet antiprion du chlorure de guanidium car les concentrations utilisées pour dénaturer les protéines *in vitro* sont de l'ordre du molaire.

Tous les prions de levures ont besoin d'Hsp104p pour leur réplication (Tuite and Cox, 2003). Le GuHCl agirait en inhibant la réplication des prions. Les prions seraient alors dilués au cours des divisions et disparaîtraient après plusieurs générations. Une étude récente suggère aussi que l'inhibition de Hsp104p par le GuHCl mènerait à une dépolymérisation des agrégats de Sup35p indépendamment des divisions cellulaires mais ces résultats n'ont pas pu être reproduits (Wu et al., 2005).

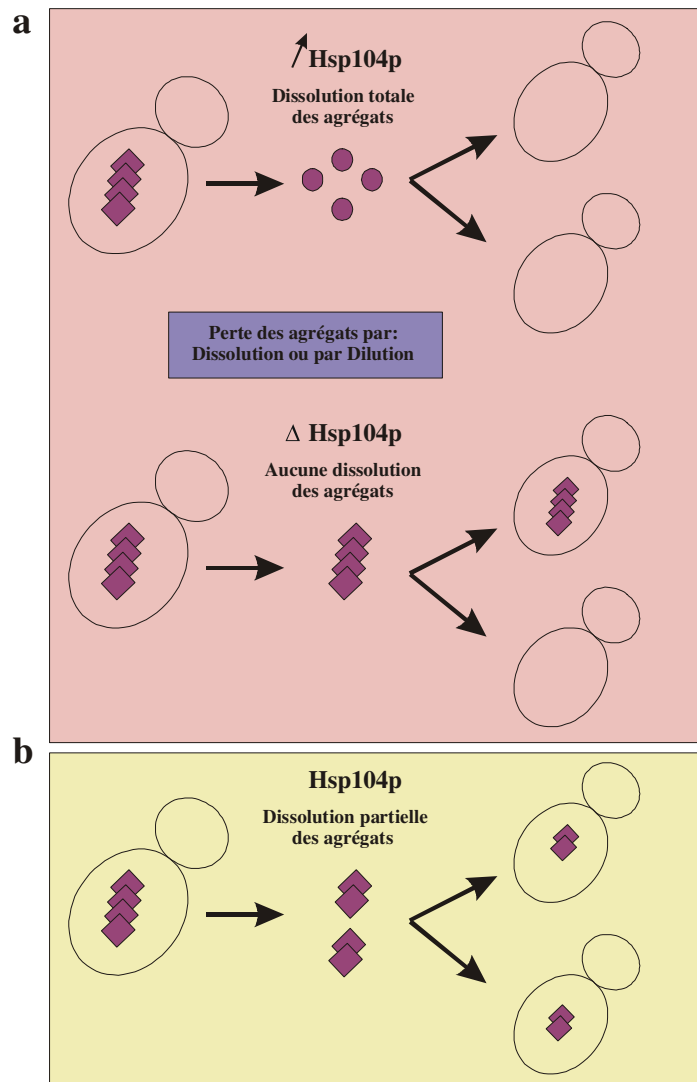


Figure 26 : Hsp104p et propagation des prions de levure.

a. La surexpression ou la délétion de Hsp104p mènent au même phénotype de cure. En effet, sa surexpression provoque la dissolution totale des agrégats [PSI+] et leur perte par dissolution alors que la délétion de Hsp104p empêche la dissolution des agrégats menant dans les deux cas à l'absence de propagation des prions.

b. Une expression normale de Hsp104p permet la dissolution partielle des agrégats et donc leur propagation.

Hsp104p est une protéine induite par différents stress dont le stress thermique. Elle est impliquée dans la désagrégation des protéines mal repliées permettant soit leur ressolubilisation, soit leur dégradation (Parsell et al., 1994). Deux grandes hypothèses ont été proposées pour expliquer la nécessité d'Hsp104p dans la propagation des prions.

Hsp104p dissout-elle les agrégats de prion ?

Un modèle plausible stipule qu'en désagrégeant les prions, Hsp104p permettrait la formation de petites unités formant ainsi les amorces ou propagons servant à favoriser la conversion de protéines prions nouvellement synthétisées (Chernoff et al., 1995; Kushnirov and Ter-Avanesyan, 1998). Si une telle fragmentation ne se produisait pas, les agrégats de prion augmenteraient en taille et réduiraient en nombre. La transmission aux cellules filles ne se ferait donc plus de façon efficace (Wegrzyn et al., 2001).

Si ce mécanisme était commun à tous les prions de levure, on pourrait espérer éliminer tous les prions par surexpression d'Hsp104p. Or ce n'est pas le cas. La surproduction d'Hsp104p dissout totalement les agrégats de Sup35p mais pas ceux de [URE3] et de [PIN⁺] (Derkatch et al., 1997; Moriyama et al., 2000). Nous pouvons suggérer que les agrégats de ces derniers sont plus gros ou plus difficiles à dissoudre et que le mécanisme d'élimination de [PSI⁺] par un taux élevé d'Hsp104p est Sup35-spécifique.

Hsp104p est-elle nécessaire pour la stabilisation des intermédiaires nécessaires à la formation des prions ?

Cette hypothèse a été proposée par Yury Chernoff en 1995 (Chernoff et al., 1995) et se trouve supportée par des données *in vitro* montrant que Hsp104p catalyse la formation d'intermédiaire oligomérique (Shorter and Lindquist, 2004).

Cependant, il est à noter que la protéine Sup35p peut être incorporée dans des agrégats même quand l'activité de Hsp104p est inhibée (Ness et al., 2002).

Hsp104p n'agit pas seule : il y aurait une alliance avec les chaperons de protéines Hsp70p et Hsp40p mais le mécanisme par lequel ces derniers affectent la propagation des prions est également peut clair.

II.7.3 Les Hsp70p

Les Hsp70p sont d'autres chaperons de protéines impliqués dans les phénomènes d'agrégation de protéines.

Les Hsp70p sont essentielles et exprimées à toutes les températures, contrairement à Hsp104p qui est seulement exprimée après un choc thermique (Craig and Jacobsen, 1984).

Ces deux types d'Hsp jouent un rôle dans la dissolution des agrégats de protéines mais elles agissent à des niveaux différents de la formation des agrégats. Tandis que Hsp104p solubilise les protéines déjà agrégées chez la levure (rôle curatif), Hsp70p agit en empêchant la

formation des agrégats (rôle préventif). Hsp70p est codée par le gène *HSP70* qui correspond à une famille multigénique : les gènes *SSA* et *SSB*.

La protéine Ssa1p (Hsp70p) semble agir de concert avec Hsp104p pour garder les protéines sous forme agrégée après un stress thermique (Glover and Lindquist, 1998). La surexpression de Ssa1p antagoniserait l'effet curatif de la surexpression de Hsp104p sur les prions (Newnam et al., 1999) (figure 27). Alors que les protéines Ssbp (Hsp70p) semblent « empêcher » le phénomène d'agrégation (Chacinska et al., 2001; Chernoff et al., 1999) en favorisant la surproduction d'Hsp104p. Cependant on verra que les nombreux gènes formant la famille des *HSP70* ont des effets complexes et parfois contradictoires.

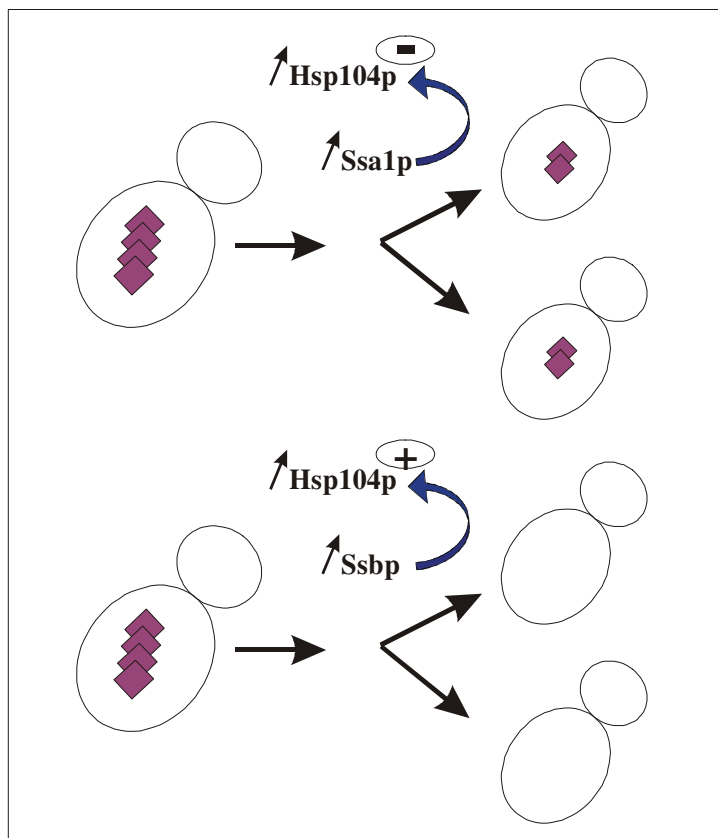


Figure 27 : Effet des différents chaperons de protéines dans la propagation des prions de levure.

Hsp104p est nécessaire à la propagation des prions mais d'autres chaperons de protéines ont des rôles importants dans les phénomènes de propagation des prions. En effet, sur le panneau du haut, nous pouvons observer que le chaperon de protéine Ssa1p de la famille des Hsp70 empêche l'effet de cure provoqué par la surexpression d'Hsp104p : Ssa1p a un effet « pro-prion » alors que le chaperon de protéine Ssbp de la famille des Hsp70 favorise la surexpression d'Hsp104p et donc la cure des prions : Ssbp est un facteur « anti-prion » (panneau du bas).

La sous-famille SSA

Dans la levure, la famille génique SSA est formée de quatre gènes homologues. Ces gènes sont très similaires mais ont des niveaux d'expressions différents (Stone and Craig, 1990; Werner-Washburne and Craig, 1989; Werner-Washburne et al., 1987). Tandis que Ssa2p est exprimée constitutivement, Ssa1p, Ssa3p et Ssa4p, comme Hsp104p, ne sont exprimées qu'en réponse à un choc thermique. En phase exponentielle, Ssa2p représente 80% des Hsp70p cytosoliques alors que Ssa3p et Ssa4p ne sont pas exprimées. L'expression de Ssa1p, répresseur de sa propre synthèse et de celle de Ssa4p (Stone and Craig, 1990), augmente lors d'une élévation de température. Ssa3p et Ssa4p sont exprimées dans des conditions de choc thermique, lors de la méiose ou en phase stationnaire. La délétion simultanée de ces 4 gènes est létale, mais l'expression de seulement un gène est suffisante pour la viabilité.

Des expériences montrent une conservation des Hsp70p des levures à l'homme puisqu'une expression d'une Hsp70p de primate dans une souche de levure délétée pour les quatre gènes SSA restaure la croissance de la souche (Tutar et al., 2005).

Le groupe de Daniel C. Masison a montré que la forme de Ssa1p liée à l'ADP favorisait la perte du prion [*PSI*⁺]. Au contraire, la forme liée à l'ATP qui permet une liaison rapide du substrat puis sa libération ne déstabilise pas le prion [*PSI*⁺] (Jones et al., 2004; Jones and Masison, 2003). De même, un mutant *SSA1-21* ayant une mutation l'empêchant de se lier au substrat présente un défaut dans la propagation du prion (Jones and Masison, 2003). Par ailleurs, il a aussi été montré que le domaine de liaison à l'ATP qui est très important pour la fixation de facteurs d'échange de nucléotides (Fes1p par exemple) est indispensable pour la propagation du prion (Loovers et al., 2006).

La sous-famille SSB

La sous-famille Ssbp des Hsp70p est composée de deux protéines identiques : Ssb1p et Ssb2p (Nelson et al., 1992). Contrairement aux protéines Ssap, les protéines Ssbp ne sont pas indispensables pour la viabilité des cellules et leur expression n'est pas induite par un choc thermique. Elles participent au repliement des polypeptides « naissants » grâce à leur association aux ribosomes (Nelson et al., 1992).

D'autres chaperons de protéines semblent être impliqués, comme les protéines Hsp40p ou les protéines comme Fes1p qui sont impliquées dans l'équilibre Hsp70-ADP/Hsp70-ATP. Leur surexpression ou des mutations affectent la stabilité des prions [*PSI*⁺] (Wickner et al., 2004).

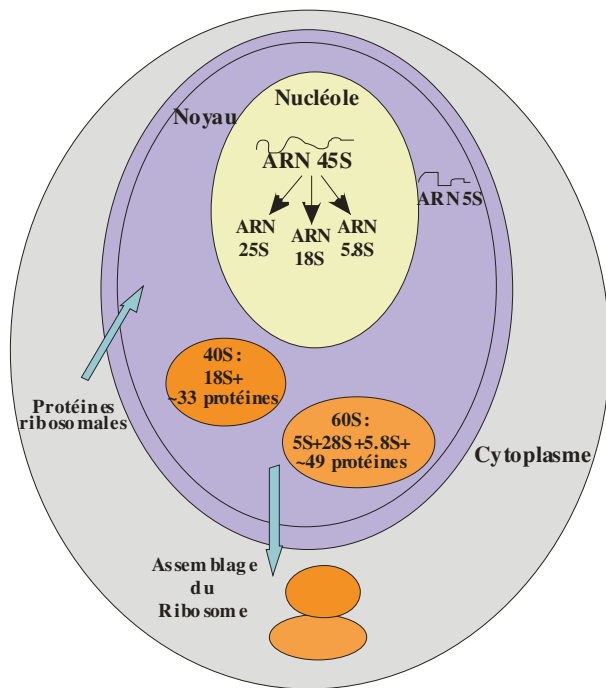
Les protéines Hsp40p jouent un rôle dans la propagation d'autres prions et pourraient préserver une certaine spécificité. Par exemple, le prion [RNQ⁺] est modulé par une protéine de la famille des Hsp40, Sis1p (Lopez et al., 2003; Sondheimer et al., 2001), tandis que [URE3] est curé par une surexpression d'une autre Hsp40, Ydj1p (Moriyama et al., 2000). Les effets des Hsp70p, Hsp40p et autres co-chaperones ont été synthétisés récemment (Jones and Tuite, 2005). Il a aussi été démontré que la surexpression de Ydj1 curait le prion [URE3] en interagissant directement avec la région C-terminale de Ure2p, à un moment très précoce de la formation des fibres, rallongeant ainsi le processus de nucléation (Lian et al., 2007).

II.7.4 Les ARN ribosomaux

II.7.4.1 Les ribosomes : structure et fonction dans la synthèse protéique

Les cellules eucaryotes, comme les cellules procaryotes, contiennent des ribosomes. Ces particules cellulaires, composées d'ARN et de protéines, sont impliquées dans la synthèse protéique. Dans les cellules eucaryotes, les ribosomes sont environ un tiers plus gros que dans les cellules procaryotes, et ils peuvent évoluer librement dans la matrice cytoplasmique ou bien adhérer aux membranes du réticulum endoplasmique. Dans les cellules spécialisées dans la synthèse et dans la sécrétion des protéines, plus de 90% des ribosomes sont associés aux membranes du réticulum endoplasmique rugueux. Les ribosomes sont de petits corps sphéroïdaux qui, dans les cellules eucaryotes, ont un diamètre de 23 nm et un coefficient de sédimentation de 80S (la notation S ou Svedberg, indique le coefficient de sédimentation. C'est une unité de mesure du poids moléculaire des grandes molécules organiques déterminé par ultracentrifugation). Ils sont formés de deux sous-unités : une grande sous-unité de 60S, et une petite sous-unité de 40S. Chaque sous-unité ribosomale est à son tour formée de protéines et de différents ARN, dits ARN ribosomaux. La grande sous-unité contient l'ARNr 28S (25S pour les levures), l'ARNr 5,8S et l'ARNr 5S ; la petite sous-unité ne contient que l'ARNr 18S. Chez les Eucaryotes, les ribosomes sont assemblés à l'intérieur du noyau. Les ARN 18S, 5,8S et 28S sont synthétisés dans le nucléole sous la forme d'un précurseur moléculaire de taille bien supérieure : l'ARN 45S. L'ARN 5S est lui synthétisé en dehors du nucléole, dans le nucléoplasme tandis que les protéines ribosomales sont importées du cytoplasme vers le noyau. Une fois prêts, tous les composants migrent dans le noyau où ils sont associés pour former les sous-unités du ribosome. Celles-ci sont ensuite exportées séparément du noyau au cytoplasme (figure 28).

Les procaryotes possèdent des ribosomes ayant un coefficient de sédimentation de 70S. Ils proviennent de l'association d'une sous-unité 50S avec une sous-unité 30S, composées également de molécules d'ARNr mais plus petites et de moins de protéines (figure 28).



	Procaryote	Levure	Eucaryote	
ARNr	16S	18S	18S	Petite sous-unité
	5S	5S	5S	
ARNr	23S	25S	28S	Grande sous-unité
		5,8S	5,8S	

Figure 28 : biogenèse du ribosome chez la levure et tableau de correspondance entre les différents ARNr des procaryotes, des eucaryotes et de la levure.

l'ARN précurseur 45S est synthétisé dans le nucléole alors que l'ARN 5S a une synthèse extra-nucléolaire. L'ARN 45S donnera les trois ARN 28S, 18S et 5.8S. Les protéines ribosomales sont ensuite importées du cytoplasme vers le noyau où a lieu l'assemblage des sous-unités du ribosome. La grande sous-unité du ribosome est formée d'environ 50 protéines et des ARN 5S, 28S et 5.8S alors que la petite sous-unité est formée d'environ 33 protéines et de l'ARN 5S.

Une fois parvenues dans le cytoplasme, les sous-unités s'associent pour former les ribosomes et commencent leur activité de synthèse en traduisant les messages qui arrivent du noyau sous forme d'ARN messenger (ARNm) (figure 29).

Pendant la synthèse protéique, il arrive souvent que de nombreux ribosomes s'attachent à une molécule d'ARN messenger, formant de la sorte des agrégats connus sous le nom de polyribosomes ou polysomes. Dans chaque ribosome, la sous-unité la plus grande dispose d'une surface concave qui reçoit la sous-unité plus petite et présente trois protubérances qui forment une région en forme de couronne. L'ARN messenger se loge dans l'espace séparant les deux sous-unités (où a lieu la traduction) et le ribosome s'en sert comme d'un rail pour

progresser et assurer son déchiffrement. Le fragment d'ARN est alors protégé contre les enzymes de dégradation tels que les ribonucléases (nucléases).

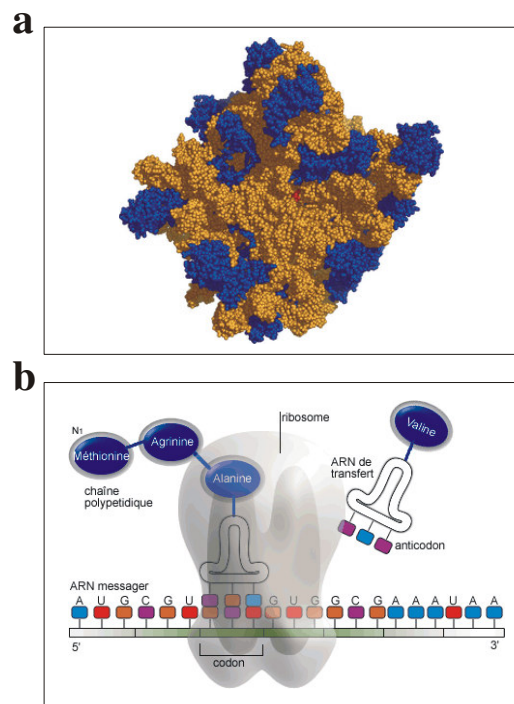


Figure 29 : structure d'un ribosome et sa fonction de traduction.

a. Le ribosome est une structure essentiellement formée d'ARN (jaune) et de protéines (bleu).

b. La traduction est l'interprétation des codons de l'ARNm en acides aminés. Le code génétique est le système de correspondances (code) permettant à l'ARN d'être traduit en protéine par une cellule. La traduction s'effectue dans le cytoplasme. Elle correspond à la polymérisation d'acides aminés selon l'ordre donné par les codons de l'ARNm. La traduction a besoin d'énergie, des ribosomes, des ARN de transfert (ARNt), de l'activité enzymatique et d'un plan apporté par l'ARNm.

II.7.4.2 Les ribosomes : fonction de chaperon de protéines

Très peu de publications documentent cette notion tout à fait novatrice. La première publication date de 1992 (Das et al., 1992) et identifiait l'activité de chaperon de protéines dans le ribosome en général. Par la suite, d'autres travaux utilisant le modèle procaryote ont montré que cette activité de chaperon de protéines était localisée dans la grande sous-unité du ribosome (Bera et al., 1994; Chattopadhyay et al., 1994; Das et al., 1996; Kudlicki et al., 1997) puis finalement dans le domaine V du grand ARN ribosomal 23S, *in vitro* et *in vivo* (Chattopadhyay et al., 1996; Chattopadhyay et al., 1999). Cette fonction de chaperon des protéines assisté par l'ARN ribosomal 23S du ribosome est beaucoup plus efficace et plus

rapide que le repliement spontané (ou « self-folding ») de celles-ci (Sanyal et al., 2002). En d'autres termes, si une protéine est dénaturée par un procédé thermique ou chimique, elle subira naturellement une renaturation mais qui ne sera que très lente et très partielle, alors que si le ribosome entier, ou seulement la grande sous-unité ou bien même seulement l'ARN ribosomal 23S sont ajoutés, la renaturation observée sera nettement plus rapide.

Comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, nos résultats montrent que deux drogues antiprion différentes inhibent spécifiquement cette fonction d'assistance au repliement des protéines de l'ARN 23/25S/28S. De nombreuses évidences laissent penser que le ribosome jouerait un rôle prépondérant dans le repliement des protéines et donc dans les maladies du mauvais repliement de protéines.

Un modèle peut être proposé : en cours de traduction, aidée par les ribosomes, la protéine subie déjà un premier repliement partiel lui permettant par la suite d'atteindre un état final, où elle sera correctement repliée et active, alors que si ce dernier ne se fait pas elle sera dirigée vers le système ubiquitine/protéasome de contrôle qualité et dégradée. Ces deux voies sont aujourd'hui bien connues ; ce qui l'est beaucoup moins est l'existence d'un troisième état nommé « état intermédiaire » permettant à une protéine sortant du ribosome, partiellement repliée et ayant des propriétés intrinsèques à l'agrégation de former des fibres amyloïdes. Nous proposons que l'ARNr 23S catalyse, favorise, la formation de cet état intermédiaire compétent pour former les fibres amyloïdes. Cette fonction de l'ARNr 23S/25S/28S serait une fonction « ancestrale », maintenue depuis les origines des protéines (dans un monde où les ARN seraient apparus les premiers et dont on pense qu'initialement les protéines existaient probablement sous formes agrégées (Dworkin et al., 2003)). Cette fonction serait à rapprocher de la fonction de traduction, de catalyse de la liaison peptidique, qui est une fonction elle aussi portée, au sein du ribosome, par l'ARNr 23S (qui est ainsi un « ribozyme »).

II.7.4.3 Les deux activités du ribosome : existence d'inhibiteurs ?

Aujourd'hui, il existe de nombreux inhibiteurs de la fonction de traduction du ribosome qui agissent à différents niveaux (Bottger, 2006; Hermann, 2005; Tenson and Mankin, 2006; Yonath, 2005) (figure 30). Certains inhibent uniquement la fonction de traduction du ribosome comme la Streptomycine par exemple alors que d'autres inhibent en plus de la traduction, la fonction chaperon de protéine du ribosome comme par exemple le Chloramphénicol. En revanche, aucun inhibiteur spécifique de l'activité chaperon de

protéines n'a été répertorié. De telles molécules permettraient de disséquer le rôle *in vivo* de cette activité.

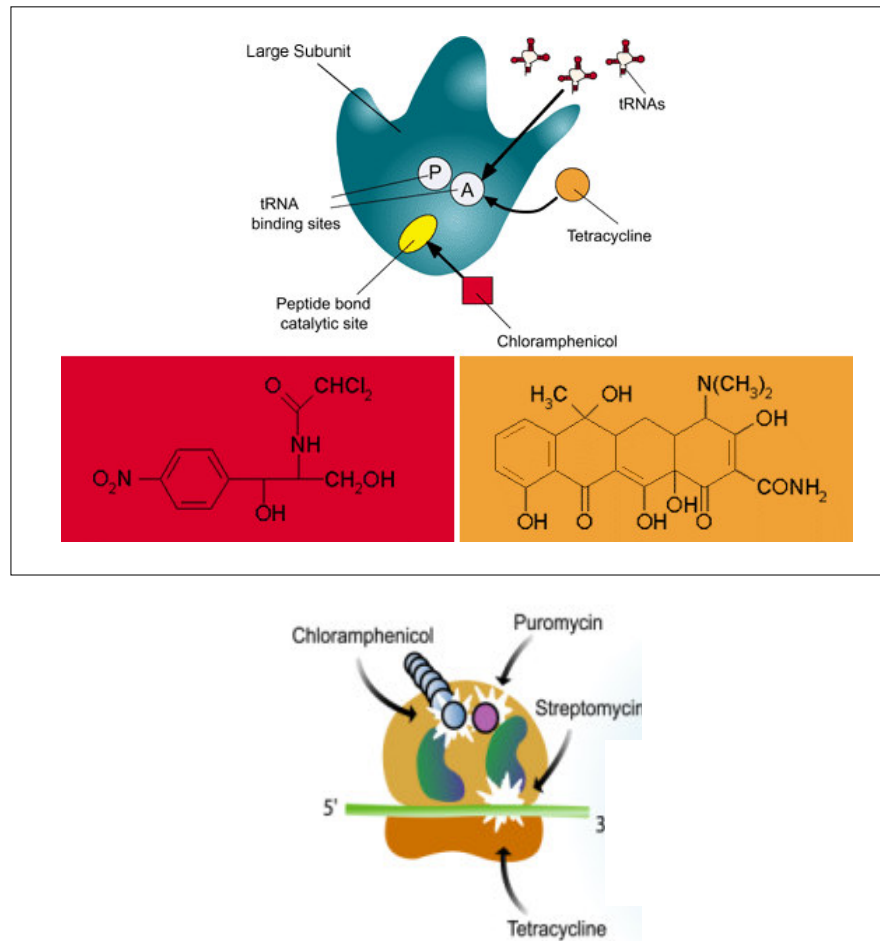


Figure 30 : les différents inhibiteurs connus de la synthèse protéique par le ribosome.

Le chloramphenicol et la puromycine lient la sous-unité 50S et inhibe la liaison des peptides aux ribosomes. La tetracycline et la streptomycine empêchent la liaison de l'ARNt au site accepteur du ribosome.

II.8 Effets bénéfiques des prions

Les protéines capables de former des prions chez la levure régulent divers processus cellulaires. Les protéines prions de levure représentent un nouveau mécanisme épigénétique qui a pu être d'une importance bien plus importante que celle soupçonnée dans les mécanismes de régulation physiologiques. Les prions peuvent se manifester par un phénotype de perte de fonction, de gain de fonction ou bien les deux. La protéine prion [HET-s] résulte en un gain de fonction et est impliqué dans l'incompatibilité entre souches différentes

(Coustou et al., 1997). [URE3] résulte en une inactivation de la protéine et se manifeste en une altération de la préférence de l'assimilation des sources riches en azote (Wickner, 1994). Le prion [*PSI*⁺] réduit la fidélité de la terminaison de la traduction ; ceci peut se voir tant comme une perte de fonction mais également comme un gain de fonction (Eaglestone et al., 1999; Shorter and Lindquist, 2005; True and Lindquist, 2000). Le fait que le domaine prion soit extrêmement conservé au cours de l'évolution peut poser la question de l'effet bénéfique des prions ! Mick Tuite et collaborateurs ont montré que suivant l'exposition aux hautes températures ou à l'éthanol, des souches [*PSI*⁺] survivaient mieux que des souches isogéniques [*psi*⁻] (Eaglestone et al., 1999). De même une étude menée par Susan Lindquist va dans le même sens : elle a comparé les souches [*PSI*⁺] et [*psi*⁻] sur des milieux contenant des sources de carbones, d'azote, de métaux, d'inhibiteurs de différents processus cellulaires et à différentes températures. Il en ressort que les souches [*PSI*⁺] semble s'adapter beaucoup plus facilement que les souches [*psi*⁻] (True and Lindquist, 2000). De plus, parce que le domaine prion est modulaire (Patino et al., 1996; Ter-Avanesyan et al., 1993), sa fusion avec d'autres protéines devrait potentiellement permettre la régulation d'un large spectre de protéines.

III. Maladies à fibres amyloïdes

Les amyloïdes sont généralement associés à des maladies humaines (tableau 8), bien que dans certains organismes les amyloïdes ont une fonction pour la cellule : certains œufs de poissons sont couverts d'une couche extérieure d'amyloïdes pour les protéger de la dessiccation (Podrabsky et al., 2001). De même, les amyloïdes présents à la surface d'*E.coli* sont impliqués dans l'adhésion aux supports (Chapman et al., 2002). Bien que de nombreuses protéines formant des amyloïdes n'ont pas de séquences primaires communes, elles contiennent toutes des structures en feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre. De plus, elles sont toutes résistantes aux protéases et présentent une biréfringence suite à un marquage par le rouge Congo (Dobson, 2003). Leur insolubilité empêche la détermination de leur structure par les techniques de cristallographie par rayons X ou par cristallographie en solution. Le fait qu'ils aient une structure similaire avec des séquences en acides aminés différentes laisse penser que des molécules actives contre un amyloïde donné peuvent être aussi actives contre d'autres amyloïdes. Un exemple récent est le criblage de molécules efficaces contre les prions de levures qui se sont révélées également actives contre les prions de mammifères (Bach et al., 2003; Bach et al., 2006; Tribouillard et al., 2006).

Au moins cinq types de protéines prion forment des amyloïdes : PrP^{Sc}, [PSI⁺], [URE3], [PIN⁺] et [HET-s]. Ces prions sont la résultante d'une auto-propagation sous forme d'amyloïdes des protéines PrP, Sup35p, Ure2p, Rnq1p et HET-s, respectivement. Deux autres protéines dont le comportement est proche des prions sont [β] et [C]. Ce sont respectivement une enzyme dont la forme prion est la forme active et une protéine kinase qui ne forment pas de fibres amyloïdes. Ainsi, un prion peut être un amyloïde ou non et la forme prion peut être soit la forme inactive soit la forme active de la protéine (figure 31). Récemment, une méthode a été mise au point afin de purifier et analyser des protéines formant des agrégats amyloïdes, par la dissolution des complexes non amyloïdes *via* des détergents, la purification des amyloïdes par centrifugation puis l'analyse de ces amyloïdes sur gels agarose contenant du SDS (Kushnirov et al., 2006).

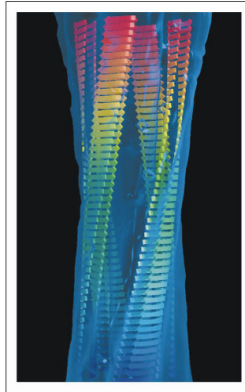
Un point important à noter pour la formation des prions et des fibres amyloïdes est que la composition en acides aminée est plus importante que la séquence en acides aminés. En effet, si dans le domaine prion des 5 protéines listées précédemment, on mélange l'ordre des acides aminés tout en conservant leur composition, on conserve la capacité pour les protéines à former des prions *in vitro* et des fibres amyloïdes *in vitro* (Ross et al., 2004).

Les maladies à prions, font parties des maladies neurodégénératives à dépôts amyloïdes (maladies en général, liées à l'âge pour les formes non génétiques). L'incidence de ces maladies de part le vieillissement des populations est en constante augmentation dans les pays riches. Nombreux pensent qu'il devient urgent de trouver des traitements contre toutes ces maladies pour lesquelles des mêmes mécanismes communs sont impliqués dans leur apparition. La protéine prion PrP et le peptide amyloïde β responsable de la maladie d'Alzheimer ont, par exemple, quelques similarités de séquences à des endroits bien particuliers permettant la liaison avec des métaux tels que le cuivre ou le zinc et ont aussi quelques similarités physico-chimiques (Barnham et al., 2006). Un article récent d'Elisabete Ferreira montre que le traitement de neurones corticaux par le peptide amyloïde PrP 106-126 neurotoxique ou par le peptide amyloïde β induit la libération de calcium par l'intermédiaire des canaux RyR et IP3R du réticulum endoplasmique. Ceci provoque une augmentation du calcium cytosolique mais aussi d'espèces réactives de l'oxygène conduisant par la suite à une mort apoptotique impliquant la libération du cytochrome c par la mitochondrie et enfin, l'activation de caspases menant à la perte neuronale (Ferreira et al., 2006). Les principales ressemblances entre la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions sont l'implication des ROS, l'implication des ions « métalliques » ou encore la capacité des protéines à former des agrégats ; ainsi, nous pouvons imaginer des thérapies communes utilisant soit des anti-

oxidants (vitamine E, vitamine C, NADH, coenzyme Q10...), soit des agents chélateurs de métaux (desferrioxamine, clioquinol, D-(-)-penicillamine...) ou encore des inhibiteurs de l'agrégation de protéine (colorants, acridines, anthracyclines, phtalocyanines, phénoliques...) (pour revue, (Zhang, 2006)).

Tableau 8 : maladies à fibre amyloïde et exemple d'une fibre amyloïde

Protéine	Maladie
Peptide A β	Alzheimer
Transthyretine	Amyloïdose systémique sénile
Serum Amyloïde A	Amyloïdose systémique secondaire
Amyline (IAPP)	Diabète de type II
α -synucléine	Parkinson
Superoxyde dismutase	Amyloïdose amyotrophique
Huntingtine	Huntington
PrP	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
Chaîne légère des immunoglobulines	Amyloïdose systémique primaire



(Jiminez et al, 1999)

Les brins β sont parallèles pour former un feuillet β . Les feuillets β s'organisent deux à deux pour former un protofilament.

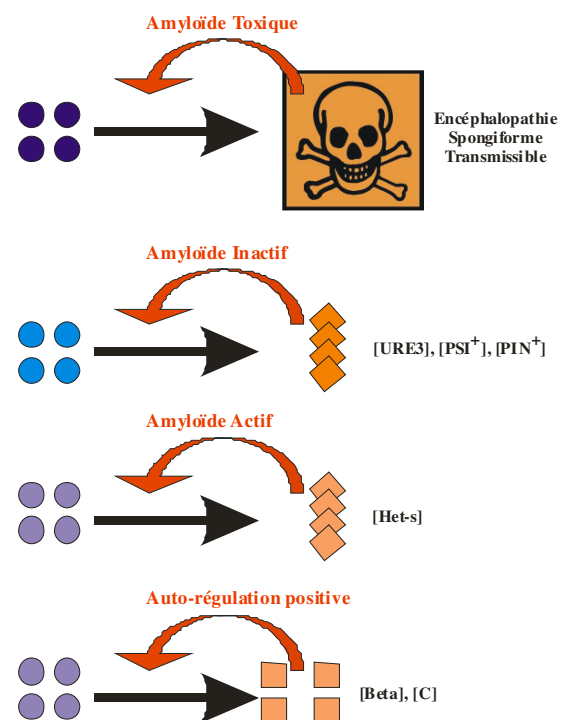


Figure 31 : toxicité ou non toxicité et inactivation versus activation des prions.

Toutes les protéines sous conformation prion ne sont pas forcément toxiques ou inactives. En effet, la forme prion peut être toxique comme pour PrP ou non toxique comme pour [URE3], [PSI⁺] et [PIN⁺]. De même, la forme prion peut être inactive ([URE3], [PSI⁺] et [PIN⁺]) ou au contraire la forme active de la protéine ([HET-s]). Enfin, la prionisation ne passe pas nécessairement par la formation de fibres amyloïdes (β).

III.1 Maladies neurodégénératives

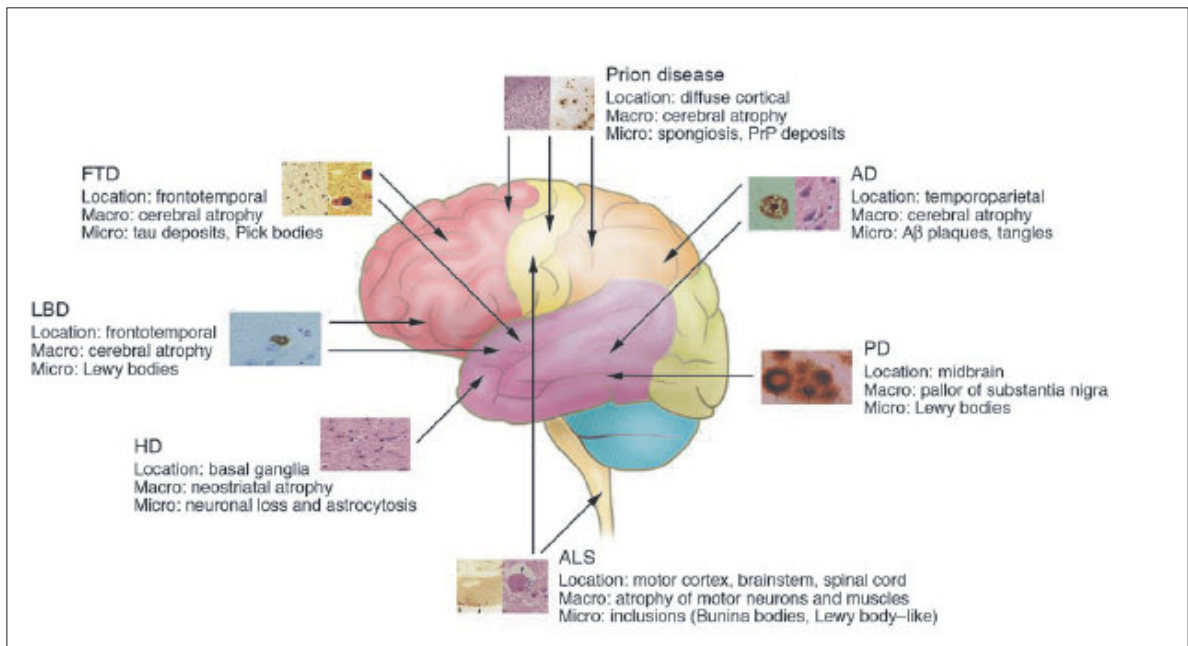
Les maladies neurodégénératives sont des maladies qui affectent le fonctionnement du cerveau de façon progressive au cours de son évolution. En fonction des régions du système nerveux atteintes par la maladie, les troubles pourront affecter la motricité, le langage, la mémoire, la perception, la cognition... (figure 32) Dans de nombreux cas, les causes exactes du déclenchement de la maladie restent inconnues.

Outre les maladies à prions, les maladies neurodégénératives les plus connues et les plus répandues sont :

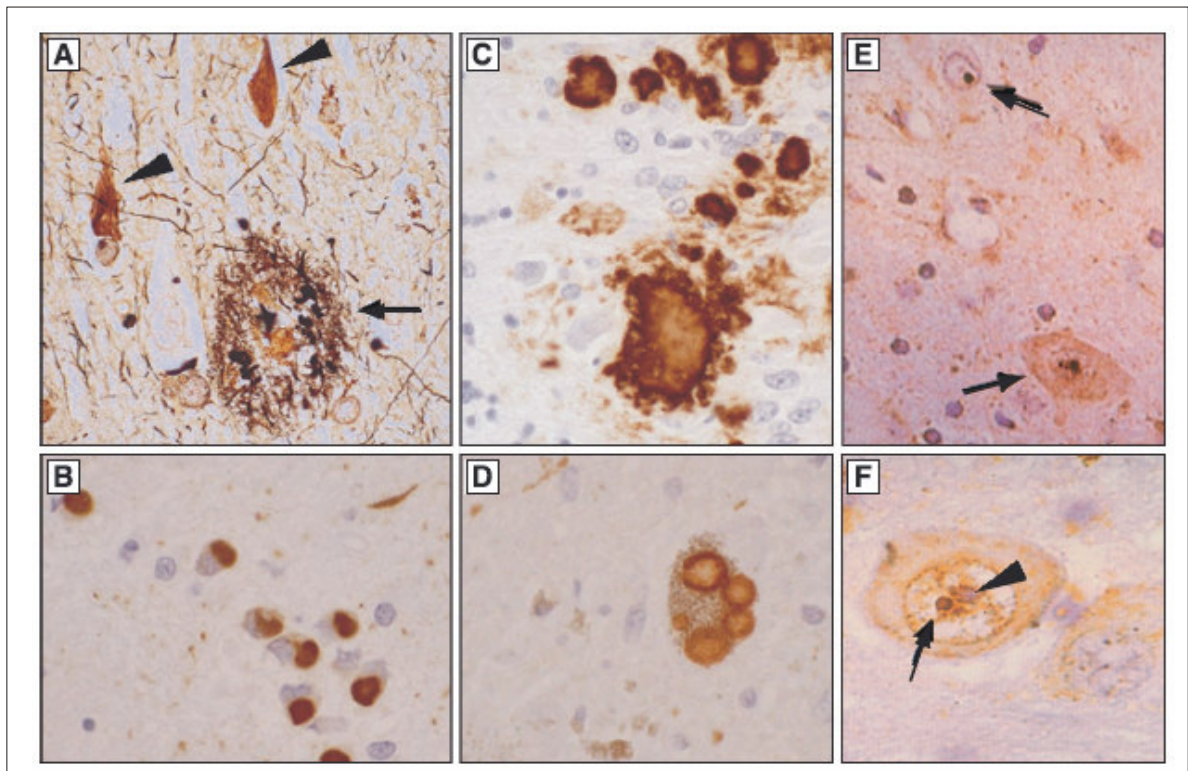
La Maladie d'Alzheimer : c'est la plus commune des maladies neurodégénératives. Elle est caractérisée par la présence de deux types de lésions corrélées à la formation d'agrégats et de dépôts : **les plaques**, qui correspondent à des lésions extracellulaires causées par l'accumulation du peptide amyloïde β et **les enchevêtrements de fibrilles ou « tangles »**, qui correspondent à des lésions intracellulaires causées par l'agrégation de la protéine du cytosquelette Tau. L'apparition de ces lésions est corrélée avec un dysfonctionnement et une dégénérescence synaptique ainsi qu'à une mort neuronale dans des régions du cerveau impliquées dans l'apprentissage et la mémorisation (Mattson, 1997).

La Maladie d'Huntington : c'est une maladie génétique causée par une expansion des répétitions de codons CAG codant pour un domaine polyglutamine dans la partie N-terminale de la protéine huntingtin. Cette maladie est caractérisée par une neuro-dégénérescence progressive corrélée avec la formation d'**agrégats ou inclusions** d'huntingtin dans le système nerveux des patients atteints. Cette expansion du codon CAG est réminiscente des mutations insertionnelles qui conduisent à une augmentation du nombre de motif octapeptidique dans PrP.

La Maladie de Parkinson : c'est la plus répandue des maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer. Elle est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques conduisant le patient à une déficience progressive de la capacité, à contrôler les mouvements de son corps. Les gènes impliqués sont ceux codant pour l' α -synuclein et la Parkin. Le marqueur biologique de la maladie est l'apparition de **corps de Lewy** (inclusion cytoplasmique composée essentiellement d' α -synuclein).

a

D'après Lars Bertram, 2005

b

D'après J. Paul Taylor, 2002

Figure 32 : Différentes maladies neurodégénératives.

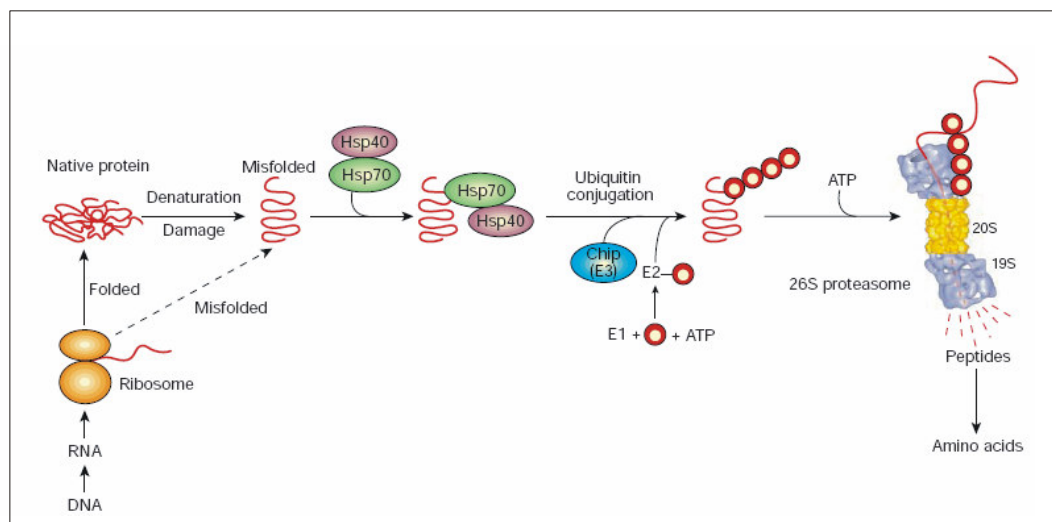
a. Localisation anatomique des lésions observées dans différentes maladies neurodégénératives.

b. Agrégation de protéines visibles en microscopie : A : la maladie d'Alzheimer; les têtes de flèches représentent des "tangles" intracellulaires et les flèches, des plaques amyloïdes extracellulaires. B : La maladie de Pick où l'on observe des inclusions de la protéine tau. C : Les maladies à prion avec leurs dépôts amyloïdes. D : La maladie de Parkinson avec ses multiples corps de Lewy. E, F : La maladie de Machado-Joseph avec ses inclusions intranucléaires de la protéine ataxine 3.

Toutes ces maladies ainsi que les maladies à prions sont liées à un problème de repliement de protéines. Il convient donc de revenir à des notions de base au sujet de la synthèse protéique et du repliement protéique ainsi que des mécanismes existants pour éliminer les protéines mal repliées et/ou agrégées.

III.2 Repliement d'une protéine et conséquences s'il ne se produit pas correctement

Les protéines sont synthétisées dans la cellule par les ribosomes à partir des ARNm eux-mêmes transcrits à partir des gènes. Le repliement d'une protéine peut se faire en fin de traduction lorsqu'elle est libérée dans le cytoplasme ou dans le réticulum endoplasmique (repliement post-traductionnel) (Hartl and Hayer-Hartl, 2002) mais aussi en cours de traduction (repliement co-traductionnel) (Hardesty and Kramer, 2001) (figure 33).



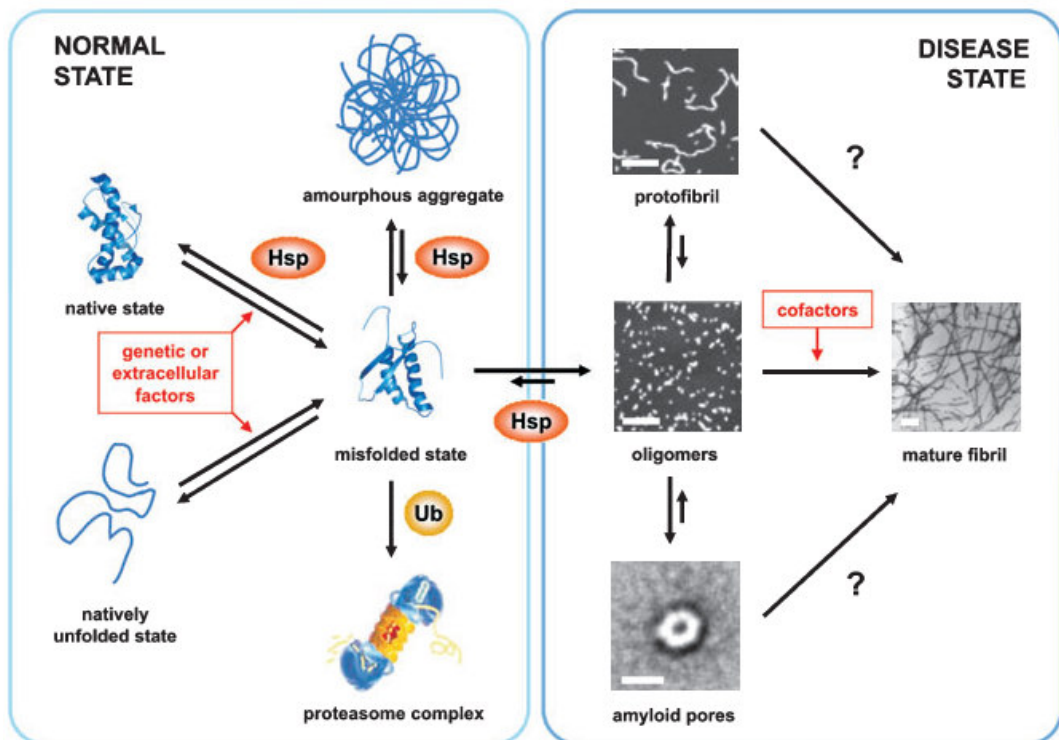
D'après Alfred L. Goldberg, 2003

Figure 33 : les différents systèmes de repliement ou de dégradation d'une protéine.

Les chaperons moléculaires ont une fonction dans le repliement des protéines et la dégradation des protéines mal repliées. Les chaperons Hsp70/40 favorisent le repliement de protéines nouvellement synthétisées. Ils peuvent aussi faciliter la reconnaissance des protéines anormalement repliées, menant à leur ubiquitination par le complexe CHIP et leur dégradation par le protéasome. Les cercles rouges représentent l'ubiquitine.

Ce repliement est aidé par des chaperons de protéines tels que les protéines de la famille des Hsp70p et des Hsp90p ou bien par le ribosome lui-même *via* son grand ARN. En effet ces

protéines néosynthétisées se retrouvent dans un milieu relativement hostile. Dans la cellule, les protéines sont constamment exposées à des conditions qui favorisent leur dénaturation comme une température trop élevée, la présence de petites molécules réactives causant l'oxydation des protéines, de nombreuses enzymes modifiant les protéines, de hautes concentrations en sels favorisant la dissociation des multimères, la présence de nombreux acides gras agissants comme des détergents, ou bien la présence d'autres protéines mal repliées (Goldberg, 2003). Ainsi, environ 30% des protéines nouvellement synthétisées sont rapidement dégradées car elles sont mal repliées suite aux mauvaises conditions du milieu environnant mais aussi au mauvais fonctionnement des chaperons de protéines. Ces dernières fonctionnent de plus en plus mal avec l'âge de l'individu ; C'est pourquoi l'incidence des maladies dues à des mauvais repliements de protéines augmente avec l'âge (figure 34).



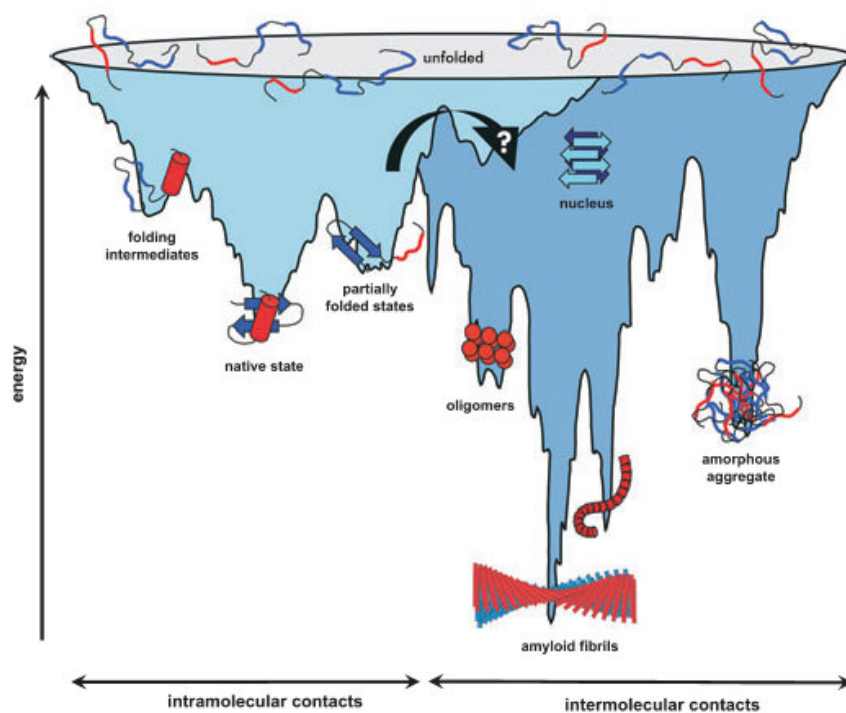
D'après Thomas R. Jahn, 2005

Figure 34 : passage d'un état normal à un état pathologique.

Les Hsps et le système ubiquitine-protéasome (Ub) empêchent l'agrégation des protéines mal repliées en catalysant leur repliement correct ou leur dégradation, respectivement. Chez les individus âgés, une augmentation de protéines mal repliées peut mener à une saturation de ces mécanismes de défense. Ces protéines partiellement repliées s'associent avec d'autres pour former des oligomères qui formeront par la suite des fibrilles provoquant ainsi la maladie. Dans ce modèle, les fibres amyloïdes matures correspondraient à une « voie de garage », seuls les intermédiaires d'agrégation de type oligomérique seraient toxiques.

Aujourd'hui, de plus en plus de maladies apparaissent comme liées à un mauvais repliement de certaines protéines ; citons l'allèle $\Delta F508$ du gène CFTR (70% des allèles mutés dans les populations occidentales) causant la mucoviscidose où la capacité de la protéine de membrane CFTR (impliquée dans le transport des ions chlorures) à atteindre un repliement correct est très réduite.

De plus en plus d'évidences indiquent que la capacité à former des fibres est une propriété intrinsèque des protéines (Dobson, 1999). Le repliement des protéines est constitué d'une série d'étapes séquentielles allant de l'état non natif jusqu'à l'état natif et fonctionnel. Ainsi, le repliement d'une protéine présenterait deux faces : une face « claire » où tout se passe bien et où la protéine acquiert une fonction normale et une face « obscure » où cette dernière se trouve dans un environnement propice à l'agrégation, provoquant éventuellement la maladie. Tout est lié à un équilibre fragile entre la face « claire » et la face « obscure » du repliement de la protéine (Jahn and Radford, 2005; Stefani, 2004) (figure 35).



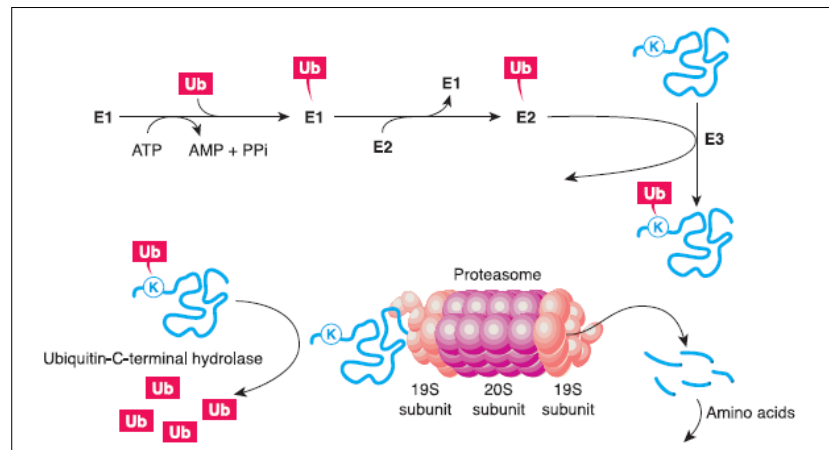
D'après Thomas R. Jahn, 2005

Figure 35 : un équilibre fragile entre l'état normal et anormal.
 La surface montre les multiples conformations faisant passer vers un état natif *via* la formation de contacts intra-moléculaires, ou vers la formation de fibres amyloïdes *via* des contacts inter-moléculaires.

Les causes actuellement avancées de ces mauvais repliements de protéines sont d'éventuelles mutations dans la séquence en acides aminés, un changement dans l'environnement local ou

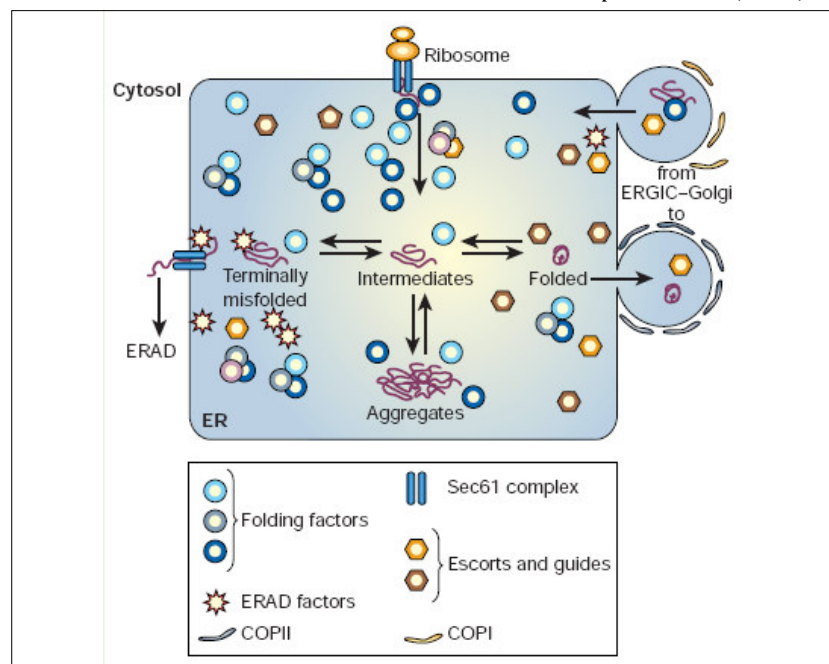
encore une forte concentration en protéine « sauvage ». Connaître les « forces » réellement impliquées dans cette transition serait une révolution dans la compréhension de la dynamique structurale des protéines et surtout dans les mécanismes d'apparition des maladies humaines liées au mauvais repliement des protéines (Jahn and Radford, 2005). Une forte identité de séquence (supérieure à 40%) entre deux protéines, favoriserait aussi l'agrégation de ces dernières alors qu'au contraire une basse identité de séquence défavoriserait l'agrégation et le mésappariement des protéines (Wright et al., 2005).

a



D'après Roberto Sitia, Nature, 2003

b



D'après J. Paul Taylor, Science, 2002

Figure 36 : les différents systèmes empêchant le mauvais repliement d'une protéine : protéasome et système ERAD.

a. Le système ubiquitine-protéasome : Les protéines ciblées pour la dégradation sont identifiées par liaison covalente avec l'ubiquitine. L'ubiquitination est accomplie par une série d'enzymes (E1 : enzyme activant l'ubiquitination, E2 : enzyme conjuguant l'ubiquitine et E3 : ubiquitine ligase). Les substrats ubiquitinylés sont reconnus et dégradés par le protéasome 26S.

b. Le système ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*): Cette voie permet aux protéines mal repliées, présentes dans le réticulum endoplasmique, de retourner dans le cytoplasme pour y être dégradées par le système cytoplasmique ubiquitine-protéasome. Le réticulum endoplasmique est riche en chaperons de protéines, en molécules impliquées dans le transport du cytosol vers le protéasome.

Il existe des systèmes empêchant la formation de ces protéines mal repliées :

- ✚ la voie de dégradation ubiquitine/protéasome (figure 36)
- ✚ la voie contrôle/qualité au niveau du réticulum endoplasmique : ERAD (figure 36)

Mais il arrive que ces systèmes soient « dépassés » par une accumulation de protéines mal repliées ou agrégées, ce qui peut aboutir à la maladie. Par ailleurs, des mutations inactives de différents gènes codants pour les différents acteurs du système ubiquitine/protéasome sont associées à la maladie d'Alzheimer, de Parkinson mais aussi à des dépôts intracellulaires de la protéine prion (Allen et al., 2007; Yoshida, 2007). De plus, il a été montré que les protéines agrégées pouvaient avoir une fonction inhibitrice sur le protéasome (Bence et al., 2001; Ross and Pickart, 2004; Verhoef et al., 2002).

Les mécanismes d'apparition et de propagation des protéines agrégées sont encore très mal connus de même que la relation entre agrégation et dégradation par les systèmes contrôle/qualité. Lorsque le voile sera levé, de nouvelles approches thérapeutiques sérieuses pourront voir le jour. En effet, des molécules qui régulent la réponse au stress du réticulum pourraient être des candidats médicaments (Yoshida, 2007).

Ainsi, des molécules actives contre les prions pourrait peut être avoir des applications pour le traitement d'autres maladies à dépôts protéiques telles que la maladie d'Alzheimer ($A\beta$), la maladie de Parkinson (α -synuclein), le diabète de type II (amylin/IAPP), l'ALS (amyotrophic lateral sclerosis, superoxide dismutase) et bien d'autres, même si dans tous ces cas les protéines impliquées ne sont pas infectieuses contrairement aux maladies à prions (Barnham et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Monaco et al., 2006).

Par ailleurs, le groupe de Susan Liebman a mis au point un criblage en levure pour identifier des inhibiteurs de l'étape initiale de l'oligomérisation du peptide $A\beta_{42}$. Le principe a été de fusionner le peptide $A\beta_{42}$ au domaine fonctionnel de Sup35p ; ceci provoque la formation d'oligomères compromettant l'activité de terminaison de la traduction de Sup35p causant ainsi une fréquence plus importante de translecture du codon stop prématuré dans le gène *ade1-14*. Ce système rapporteur permet ainsi d'étudier le degré de polymérisation en contrôlant la croissance des levures sur un milieu déficient en adénine (Bagriantsev and Liebman, 2006), et ainsi d'identifier des agents inhibant l'agrégation de cette protéine.

IV. Diagnostics et Thérapies des maladies à prions

IV.1 Diagnostic

Aujourd'hui, il n'existe aucun diagnostic *pre-mortem* efficace. Seuls les symptômes cliniques très larges tels l'anxiété, la dépression, l'apathie sont observés au début de la maladie. Il existe par contre des diagnostics *post-mortem* par analyse histologique du cerveau mais ils sont coûteux. De plus, des faux-négatifs peuvent être obtenus si l'échantillon de tissu a été prélevé dans une région saine du cerveau. D'importants progrès sont donc à faire sur le front du diagnostic. Un article récent montre l'utilisation de protéases de bactéries pouvant dégrader intégralement la PrP^{Sc} (Muller-Hellwig et al., 2006) ; en effet, ils ont identifié six souches de bactéries présentes à la surfaces de certains fromages possédant des enzymes protéolytiques capables de dégrader et inactiver la PrP^{Sc} dans des conditions natives (30°C, pH8). Ceci présente un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire. Un autre champ d'application serait la décontamination de machines et d'instruments chirurgicaux. De nombreuses méthodes de décontamination existent déjà mais elles sont beaucoup plus drastiques et donc non applicables pour des matériaux délicats. Des protéases actives à 30°C et à un pH neutre représentent une alternative très séduisante. Ceci servirait à la prévention en amont mais pour un diagnostic sur un patient atteint, les tests actuels sont encore insuffisants.

IV.1.1 Tests *post-mortem*

L'étendue de l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine a motivé la commission européenne à financer le développement de systèmes d'évaluation et de tests biochimiques ayant pour but de détecter rapidement les animaux infectés. Cinq tests basés sur la sensibilité (fréquence d'animaux de référence infectés qui sont détectés par le test) et la spécificité (fréquence d'animaux de référence sains qui ne sont pas détectés par le test) ont été approuvés par la commission européenne. Les deux plus connus sont les tests de détection développés par le CEA/Biorad et par Prionics. Ces tests sont basés sur l'immuno-détection de l'isoforme PrP^{Sc} après protéolyse : la digestion pendant deux heures à 37°C de cette isoforme par la protéinase K ne dégrade pas sa partie C-terminale, contrairement à la protéine PrP^C qui après un tel traitement est entièrement dégradée ; il en résulte une protéine d'environ 27-30 KDa pouvant être détectée par western-blot ou par ELISA en utilisant un anticorps anti-PrP.

IV.1.2 Nécessité d'un diagnostic pré-symptomatique

Actuellement, à partir du moment où un animal est infecté au sein d'un troupeau, le seul moyen de s'assurer que le reste du troupeau ne transmettra pas la maladie à l'homme est de tuer le cheptel entier. D'un point de vue économique et éthique, il s'agit d'une véritable catastrophe.

Chez l'homme, les modes de contamination peuvent être multiples : iatrogène, lors d'une intervention chirurgicale *via* un instrument mal désinfecté et contaminé, lors d'une transfusion sanguine, lors d'une transplantation d'organe, ou encore lors de l'ingestion de nourriture contaminée (figure 37). Pour toutes ces raisons, il est indispensable de disposer de diagnostics pré-symptomatiques afin :

- 1- d'éviter les contaminations alimentaires ou sanguines et
- 2- de traiter le patient au plus tôt.

Pour cela, plusieurs approches ont été développées :

Anticorps conformationnel reconnaissant PrP^{Sc}

Pendant longtemps, l'objectif premier a été l'obtention d'anticorps conformationnels, spécifiques de PrP^{Sc}, qui affranchirait ainsi de l'étape de protéolyse au cours de laquelle une majorité de la PrP^{Sc} est perdue. Ces anticorps augmenteraient ainsi la sensibilité des tests. Malgré la différence de conformation entre les deux protéines, personne n'a réussi à concevoir un tel anticorps. Ce n'est qu'en 1997 que Carsten Korth et collaborateurs (Korth et al., 1997) ont décrit un anticorps (15B3) qui reconnaît spécifiquement la PrP^{Sc} bovine, murine et humaine mais ne reconnaissant pas PrP^C (indiquant qu'il est spécifique d'un épitope de PrP^{Sc} commun à ces espèces). Malheureusement, cet anticorps présente une trop basse affinité avec les protéines et rend les tests peu fiables. Aujourd'hui, de nombreuses recherches sont toujours en cours dans le domaine. Ainsi, un anticorps anti-ADN, OCD4, prélevé dans le cerveau humain et animal, infecté par le prion et pas dans les cerveaux contrôles non-infectés (Zou et al., 2004) semble immuno-réagir avec de l'ADN formant un complexe avec PrP^{Sc}. De même, une équipe a développé un anticorps reconnaissant spécifiquement le motif répété tyrosine-tyrosine-arginine de la forme prion dans laquelle l'accessibilité à ces motifs est augmentée (Paramithiotis et al., 2003).

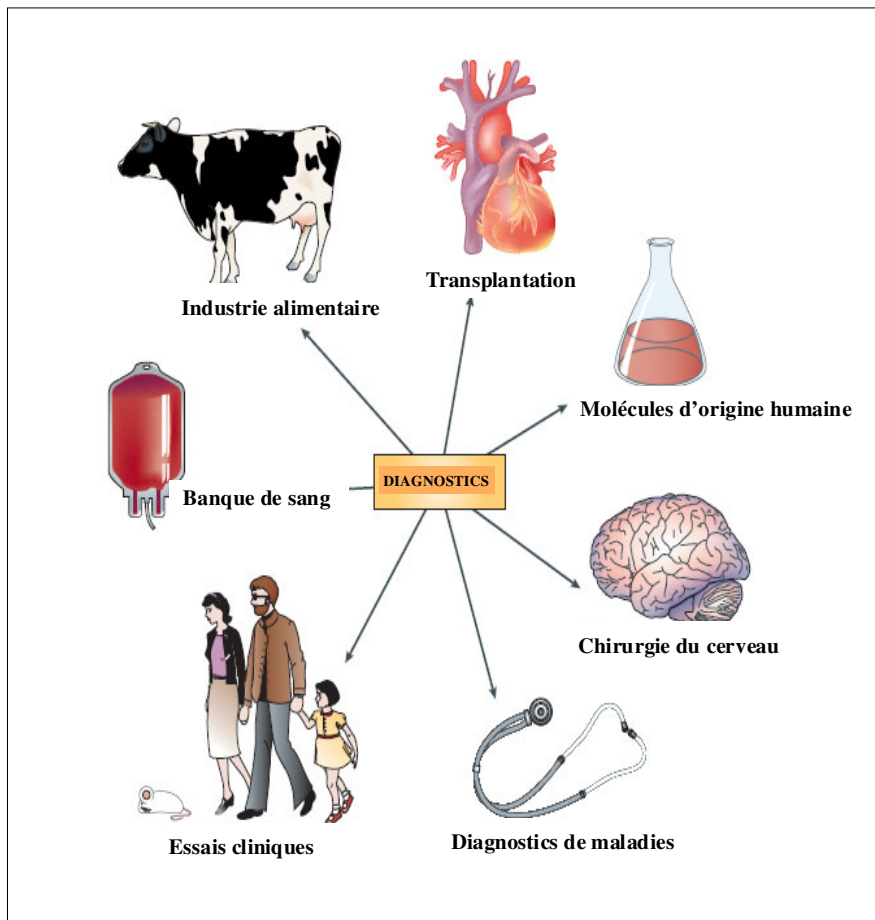


Figure 37 : Quelques exemples de la nécessité de la mise au point de diagnostics précoces.

Augmenter la sécurité des banques de sang et des molécules issues des tissus humains devrait être possible avec des méthodes de détection des prions, très sensibles. De plus, les manipulations chirurgicales de tissus nerveux et la transplantation d'organe pourraient être pratiquées de façon également plus sûre. Finalement, un test sensible et quantitatif devrait permettre des diagnostics précoces permettant ainsi un traitement précoce des patients mais aussi de réaliser plus de tests cliniques pour tester de nouvelles voies thérapeutiques.

🚦 Concentration de PrP^{Sc} et ligands spécifiques

Une stratégie alternative pour augmenter la sensibilité de la détection de PrP^{Sc} est d'augmenter la concentration du marqueur (PrP^{Sc}) dans l'échantillon avant détection : l'acide de sodium phosphotungstique précipite spécifiquement PrP^{Sc} (Safar et al., 1998). Cette procédure, couplée avec une détection chémoluminescente, a été développée pour un test à haute sensibilité de détection de PrP^{Sc} dans les tissus de patients tels que le thymus, le rectum, la rétine, le nerf optique et la rate (Wadsworth et al., 2001). Cependant, aucune détection dans le sang n'a été possible.

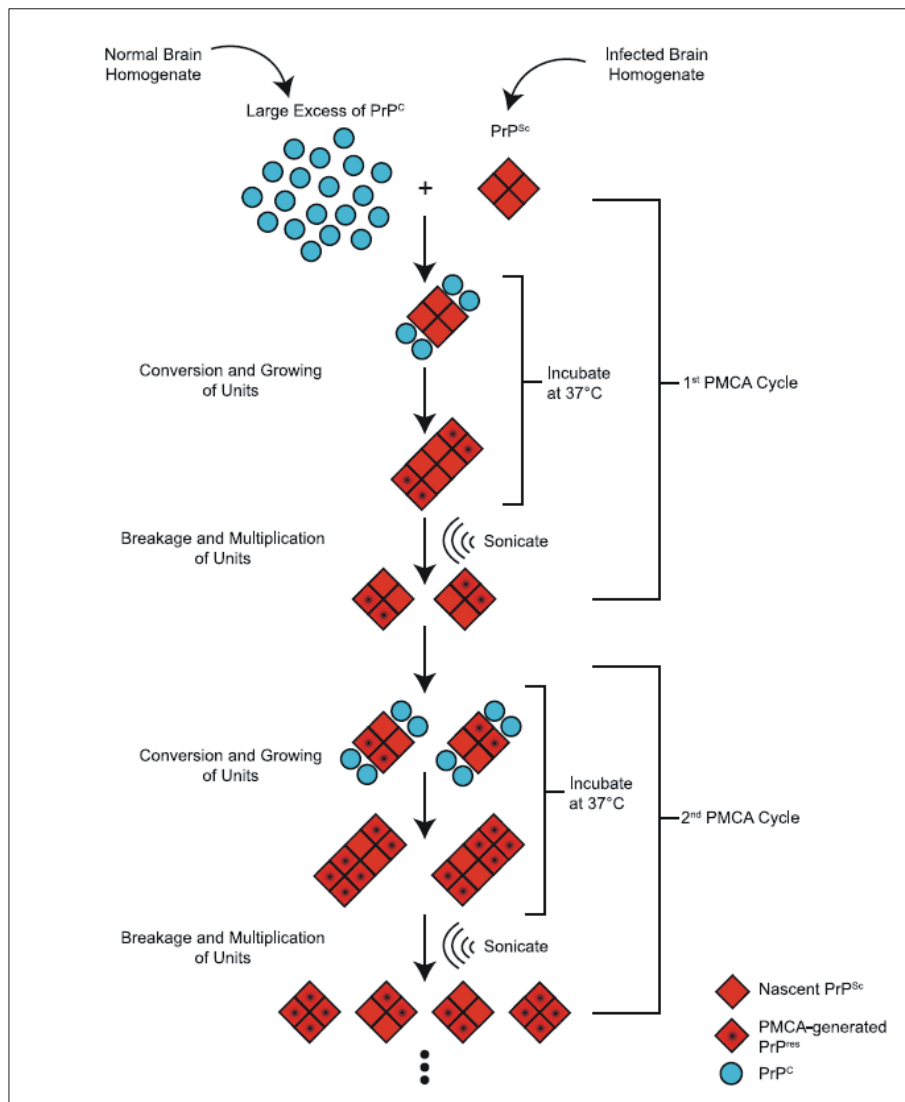
L'amplification de PrP^{Sc}

La PMCA (*Protein Misfolded Cyclic Amplification*) est une technique qui simule *in vitro* la réplication des prions *in vivo* (Saborio et al., 2001). C'est une technique qui au niveau du concept est similaire à celui de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sauf qu'elle concerne l'amplification des protéines sous forme prion et non pas celle des acides nucléiques (figure 38). Les échantillons subissent en alternance des cycles d'incubation et de sonication en présence d'une grande quantité de PrP^C. Le nombre de cycles peut être répété autant de fois que nécessaire pour produire de façon exponentielle une grande quantité de PrP^{Sc}. Grâce à cette méthode « révolutionnaire », PrP^{Sc} peut être amplifiée et détectée dans un simple échantillon de sang.

Les **avantages** de cette technique sont nombreux : **1-** sensibilité (deux rounds d'environ 100 cycles de sonications peuvent permettre de détecter des quantités de protéines prion de l'ordre de la femtomole), **2-** différents paramètres peuvent être modifiés pour l'optimisation de l'amplification de PrP^{Sc} suivant l'individu, et **3-** les molécules de PrP^{Sc} amplifiées par PMCA peuvent également être détectées par d'autres techniques très sensibles.

Cette méthode présente aussi quelques **inconvenients** : **1-** une semaine est nécessaire pour la réalisation de deux rounds complets d'amplification, **2-** l'homogénat de cerveau normal est un mélange de plusieurs constituants, **3-** le rendement diminue avec le temps ; et enfin **4-** les molécules de PrP^{Sc} peuvent provenir de souches prion pouvant avoir des difficultés à être amplifiées *in vitro* (Supattapone et al., 2006).

Outre son application dans les diagnostics, la PMCA peut avoir d'**autres applications** : **1-** Elucider les mécanismes moléculaires des phénomènes de barrières d'espèces et de souches encore inconnus à ce jour, **2-** connaître les facteurs impliqués dans la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} afin d'élucider les mécanismes moléculaires de la propagation des prions (Supattapone et al., 2006) et **3-** cribler des inhibiteurs de la propagation des prions.



D'après Joel C. Watts, 2006

Figure 38 : technique de PMCA (Protein Misfolded Cyclic Amplification). Un homogénat de cerveau infecté (contenant PrP^{Sc}) est dilué dans un homogénat de cerveau sain (contenant PrP^{C}) et incubé à 37°C . Durant cette étape, quelques molécules de PrP^{C} sont converties en PrP^{Sc} et sont ajoutées pour la croissance des oligomères de PrP^{Sc} . Une étape de sonication casse les oligomères de PrP^{Sc} en petites unités, générant ainsi de nouvelles amorces pour la conversion de nouvelles PrP^{C} . Ces étapes sont répétées par cycles dans le but d'amplifier la quantité de PrP^{Sc} présente initialement dans l'échantillon.

Etant donné que les maladies à prions constituent un problème majeur de santé publique du fait de leur caractère infectieux, le développement de méthodes pour diagnostiquer la maladie est essentiel afin de réduire la propagation de la maladie. Au cours de ces cinq dernières années, de nouvelles stratégies prometteuses ont été développées pour la détection de la maladie de façon précoce, non invasive et sensible, à partir d'un simple échantillon de sang.

En plus des méthodes de détection, il est nécessaire d'éradiquer la maladie c'est-à-dire, trouver des traitements efficaces sur la base des connaissances des mécanismes fondamentaux d'apparition et de propagation des prions.

IV.2 Thérapies contre les maladies à prions

Le modèle de cellules chroniquement infectées le plus communément utilisé a été établi en 1987 par Richard Race et collaborateurs (Race et al., 1987). Des neuroblastomes murins ont été incubés en présence de broyat de cerveaux de souris infectées par la souche RML (souche de tremblante provenant du laboratoire de William Hadlow à Hamilton, MT aux *Rocky Mountain Laboratory*). Après plusieurs passages successifs des cellules, des tests d'immuno-détection ont révélé la présence de PrP^C et de PrP^{Sc}.

A la suite de ces travaux, d'autres modèles cellulaires chroniquement infectés par diverses souches de prions murins et ovins, ont été établis (Archer et al., 2004; Bosque and Prusiner, 2000; Nishida et al., 2000; Vilette et al., 2001).

En dépit de nombreuses tentatives, aucune lignée cellulaire infectée avec des agents d'EST humaines n'a encore été obtenue.

IV.2.1 Approches pharmacologiques

L'établissement des neuroblastomes chroniquement infectés a permis une première sélection de molécules ayant une activité "antiprion" comme par exemple :

- le rouge Congo et ses dérivés (Caughey and Race, 1992; Demaimay et al., 2000)
- les polyanions sulfatés (Caughey and Raymond, 1993)
- les antibiotiques polyéniques comme l'amphotéricine B (Mange et al., 2000)
- la filipine (Marella et al., 2002),
- les dérivés porphyriques (Caughey et al., 1998b)
- la Quinacrine et la Chlorpromazine (Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001).

Ces composés se sont, pour la plupart, révélés inactifs lors d'essais thérapeutiques chez l'animal (Collins et al., 2002; Demaimay et al., 1997; Priola et al., 2000).

L'intervention thérapeutique est envisageable à différents niveaux (figure 39) :

- ✚ inhibition de la synthèse de PrP^C
- ✚ stabilisation de la PrP^C, en rendant la modification conformationnelle moins favorable
- ✚ inhibition de l'interaction PrP^C/PrP^{Sc}
- ✚ déstabilisation et induction de la disparition de la PrP^{Sc}
- ✚ inhibition de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}
- ✚ inhibition des médiateurs neurotoxiques qui pourraient être synthétisés en réponse à l'accumulation de PrP^{Sc}.

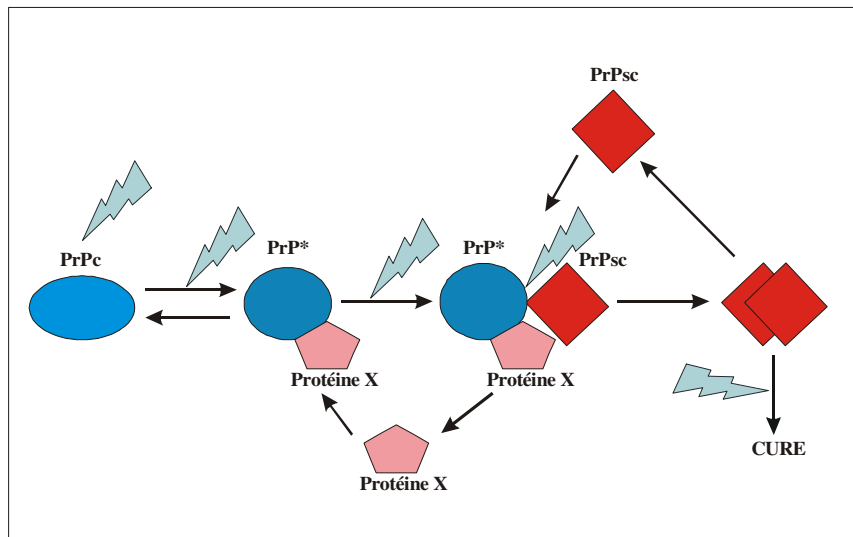


Figure 39 : les différentes voies d'actions thérapeutiques.

L'intervention thérapeutique est envisageable à différents niveaux : soit par inhibition de la synthèse de PrP^C, soit par stabilisation de la PrP^C soit par inhibition de l'interaction PrP^C /PrP^{Sc}, soit par déstabilisation et induction de la disparition de la PrP^{Sc}, soit encore par inhibition de la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}.

De plus, les approches thérapeutiques peuvent être envisagées à différents moments de l'infection :

1- une approche curative : traitement de la maladie **au stade clinique** après neuroinvasion par compensation des dommages neuronaux et gliaux et inhibition de la réplication de l'agent infectieux. Les molécules doivent dans ce cas être capables de franchir la barrière hémato-

encéphalique (BHE). Cependant, compte-tenu des nombreuses lésions subies par le cerveau en phase clinique, il est peu probable que ces dommages puissent être réversés par un simple traitement pharmacologique. Néanmoins, les travaux de Mallucci ont ouvert une nouvelle voie de recherche à ce sujet (Mallucci et al., 2003). En effet, Les auteurs ont utilisé des souris transgéniques dans lesquelles le gène PrP^C est sous le contrôle d'un promoteur inductible. Après infection par PrP^{Sc}, les auteurs ont permis l'expression de PrP^C et à partir du moment où les premiers symptômes de la maladie sont apparus, ils ont empêché la transcription du gène PrP. Ils ont observé un blocage de la progression de la maladie et même une régression de la maladie à partir du moment où la protéine PrP^C n'était plus produite, empêchant ainsi la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}. Ces résultats montrent qu'après l'apparition des symptômes, il n'est pas trop tard pour effectuer un traitement permettant d'éradiquer la maladie.

Cependant, cette approche présente certaines limites. Par exemple, dépler la protéine normale par un *knock-out* ou par l'intermédiaire d'un anticorps anti-PrP aura certainement des effets délétères puisque nous savons maintenant que la protéine joue un rôle important dans la survie cellulaire et la signalisation cellulaire ; de même, inhiber la croissance des fibres amyloïdes peut aussi causer des dommages cellulaires car la présence de corps d'inclusion est maintenant connue comme étant nécessaire pour la protection neuronale (May et al., 2006).

2- un traitement de la maladie **au stade préclinique** avant la neuroinvasion (après exposition périphérique). Les molécules doivent agir au niveau des cellules immunitaires.

Aujourd'hui, il devient urgent d'avoir des traitements efficaces contre les maladies à prions pour éviter l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine, de maladie de Creutzfeldt-Jacob ou bien encore de tremblante du mouton dans le monde. Cependant, cela reste encore difficile à mettre au point étant donné la méconnaissance de la biologie des prions. Il est fort possible que le traitement efficace sera une combinaison de différentes thérapies (May et al., 2006).

IV.2.2 Approches immunologiques

Bien qu'aucune réponse immunitaire spécifique n'ait pu être détectée chez les individus infectés, plusieurs essais thérapeutiques ciblant le système immunitaire ont été évalués.

Des cellules qui sont très importantes pour la propagation des prions sont les cellules folliculaires dendritiques (FDC) (Brown et al., 1999). Ces cellules immunitaires ont une forte capacité d'endocytose et elles transitent en continu entre la périphérie de l'organisme où elles sont en charge de la détection des antigènes et les centres germinatifs où elles jouent un rôle prépondérant dans le développement de la réponse immunitaire contre ces mêmes antigènes. Mais face au prion, elles seraient impuissantes puisque l'agent infectieux semble s'accumuler dans ces cellules folliculaires. PrP^{Sc} s'accumule dans les tissus lymphoïdes avant d'atteindre le système nerveux central *via* les FDC où la pathologie se traduit par une activation et une prolifération des cellules microgliales (macrophages du cerveau) (Heppner et al., 2001) ainsi que de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Perry et al., 2002). Il semblerait possible qu'une intervention sur le système immunitaire pourrait affecter la réplication des prions dans le système lymphoïde, et bloquer ou ralentir la neuro-invasion comme cela a été montré lors d'expériences de déplétion du TNF- α et du complément (Mabbott et al., 2000).

Concernant ces approches immunologiques, trois alternatives ont été envisagées :

1. Stimulation du système immunitaire inné : l'administration d'oligodéoxynucléotides CpG, motifs apparaissant à une forte fréquence dans l'ADN bactérien et stimulant le système immunitaire inné (Wagner, 2002), a permis d'augmenter très significativement la période d'incubation de souris infectées (Sethi et al., 2002). Ce retard dans le développement de la pathologie pourrait être le résultat d'un effet adjuvant des CpG conduisant à la production d'anticorps, ou bien d'une modification de l'architecture de la rate en raison des traitements répétés, ce qui pourrait conduire à une sur-stimulation des cellules immunitaires et aussi à une déplétion fonctionnelle des cellules folliculaires dendritiques (FDC).
2. Suppression de la fonction des FDC afin de réduire les sites de réplication du prion : le blocage de l'interaction entre les FDC et les cellules, médiée par la lymphotoxine b, conduit à une diminution de la maturation des FDC et de l'accumulation de PrP^{res} dans les centres germinatifs et à un retard significatif de l'apparition des symptômes (Mabbott et al., 2000; Montrasio et al., 2000; Prinz et al., 2002)
3. Elimination de PrP^{Sc} *via* l'utilisation d'anticorps spécifique de PrP.

Plusieurs publications récentes ont mentionné que des anticorps dirigés contre PrP^C peuvent empêcher l'infection par PrP^{Sc} *in vitro* (Enari et al., 2001; Peretz et al., 2001; Perrier et al., 2004). Ces données indiquent qu'une interférence avec l'interaction inter-moléculaire de PrP^C empêche la conversion PrP^C en PrP^{Sc}.

Cependant, un anticorps dirigé contre PrP^C, la forme cellulaire normale de PrP, pourrait avoir des conséquences fâcheuses en immunothérapie *in vivo* puisque PrP^C est une protéine ubiquitaire ; la circulation d'anticorps contre celle-ci induirait une lyse complément-dépendante dans beaucoup de cellules. Ainsi, l'utilisation de tel anticorps pourrait induire des maladies auto-immunes. Enfin, ces anticorps pourraient, en empêchant la fonction normale de PrP^C, induire des phénomènes d'apoptose dans le cerveau (Solfrosi et al., 2004) ou encore causer l'activation de cascades de signalisation inappropriées (Mouillet-Richard et al., 2000). Pour contourner tous ces problèmes, l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre PrP^{Sc} est attractive. Un papier récent montre que la protéine prion possède un motif Tyr-Tyr-Arg accessible à un anticorps uniquement dans la forme PrP^{Sc} (Paramithiotis et al., 2003).

Des vaccins thérapeutiques ont aussi été testés pour d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer avec des anticorps dirigés contre le peptide A β (Schenk et al., 1999).

Avant tout, un premier critère essentiel pour être un bon composé antiprion est la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Actuellement, ce qui est le plus recherché est un composé qui en plus, empêche la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (Caughey et al., 2006) : soit un inhibiteur direct empêchant l'interaction entre PrP^C et PrP^{Sc}, soit un inhibiteur indirect affectant l'expression de PrP (Mallucci et al., 2003), son « turn-over » ou sa liaison avec des ligands. Très récemment, De petites molécules d'ARN interférant ont été utilisées pour inhiber l'expression de PrP donc la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (Daude et al., 2003).

IV.2.3 Les différentes molécules déjà testées

Aujourd'hui, de nombreuses molécules ont été testées mais la grande majorité s'est révélée inactive ou toxique, à long terme. La liste ci-dessous, répertorie les molécules les plus connus et déjà testées.

L'iododoxorubicine (IDX)

Cette molécule est connue pour son activité antitumorale mais des études chez des patients chez lesquels on a détecté des amyloïdoses ont aussi montré que le traitement par l'anthracycline 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicine (IDX) entraînait une résorption partielle des dépôts amyloïdes en s'intercalant entre les feuillets β de le PrP^{Sc} (Gianni et al., 1995). Cependant, l'IDX est très toxique et ne traverse pas la BHE.

Tétracycline

En raison de leur homologie structurale avec une partie de l'IDX et de leur capacité à passer la BHE, la tétracycline a été évaluée dans le traitement des EST. Sa capacité à interagir avec les agrégats de PrP^{Sc} a été établie en utilisant des fibrilles amyloïdes générées par des peptides synthétiques 106-126 (Tagliavini et al., 2000). Ces études ont montré que la tétracycline pouvait prévenir l'agrégation et la résistance aux protéases des peptides synthétiques.

Composés liés aux Glycosaminoglycanes (GAGs)/Polyanions polysulfatés

-Le Rouge Congo (CR)

Le Rouge Congo est un pigment couramment utilisé en histopathologie pour marquer les dépôts de protéines amyloïdes. *In vitro*, cette molécule inhibe l'accumulation de PrP^{Sc} dans des cellules chroniquement infectées (Caughey and Race, 1992). Le Rouge Congo stabiliserait la PrP^{Sc}, l'empêchant de se déplier pour atteindre un état intermédiaire nécessaire à la transconformation de PrP^C en PrP^{Sc} (Caspi et al., 1998). *In vivo*, les résultats semblent contradictoires.

-La suramine

La suramine est un composé polysulfaté utilisé depuis longtemps dans le traitement des trypanosomioses. Lorsque des cellules sont traitées avec ce composé, l'apparition *de novo* de PrP^{Sc} est totalement inhibée même après plusieurs passages sans traitement (Gilch et al., 2001).

Porphyries tétrapyroles

Les tétrapyroles représentent des inhibiteurs potentiellement efficaces dans le sens où elles ont été décrites pour se lier fortement et de façon sélective aux protéines et changer ainsi leur conformation (Hunter et al., 1997). Les tétrapyroles sont structurellement proches du rouge

congo. Elles ont été testées dans différents systèmes et leur activité antiprion a été démontrée (Caughey et al., 1998b; Priola et al., 2003; Priola et al., 2000).

Peptides synthétiques « β -sheet breaker peptides »

Il a été montré que des peptides synthétiques pouvaient interagir avec la PrP^C et former un complexe agrégé (Kaneko et al., 1997). Les travaux de Joëlle Chabry ont mis en évidence que des peptides synthétiques composés d'une partie centrale de la séquence de la PrP (PrP106-126, 109-141, 113-141) inhibaient efficacement la transconversion de PrP^C en PrP^{Sc} dans un modèle de conversion acellulaire (Chabry et al., 1998). Les résultats obtenus avec le peptide 109-141 ont par ailleurs permis de suggérer que des interactions spécifiques entre PrP^C et PrP^{Sc} s'établissaient par l'intermédiaire de la région centrale de la molécule. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que des molécules de PrP délétées pour la séquence 114-121 ne se convertissent pas en isoforme résistante à la PK après expression dans des cellules de neuroblastomes infectés (Holscher et al., 1998).

Polyanions

Les polyanions sont des molécules très fortement chargées (négativement) qui interagissent avec la membrane cellulaire. Ils sont connus pour inhiber l'entrée de certains virus de manière non spécifique. Le dextran sulfate (DS500), le pentosan polysulfate (PPS), la suramine et l'HPA- 23 sont efficaces dans différentes combinaisons souche/hôte.

- Le DS500

Le DS500 est un polymère de glucose contenant 2 groupes sulfates par sucre dont le poids moléculaire est de 500 kDa. Après inoculation de PrP^{Sc} par voie intra-péritonéale, une seule injection de 250 mg de DS500 prolonge la période d'incubation chez la souris infectée et réduit la sensibilité à l'infection, seulement dans les phases précoces, un mois avant ou 2 semaines après l'infection (Ehlers and Diringer, 1984; Farquhar and Dickinson, 1986).

- Le PPS

Des études *in vivo* chez la souris indiquent que le DS500 est toxique, alors que le pentosan polysulfate (PPS) présente une toxicité réduite (Diringer, 1991). Le pentosan polysulfate (PPS) est un xylose sulfaté (1,4-D-xylopyranoside polysulfaté de poids moléculaire variant de

3500-5000). L'effet *in vivo* du PPS est très dépendant de la dose, de la voie d'administration, de la souche d'ATNC et du modèle animal considéré.

- Les héparanes mimétiques

De nouvelles molécules appelées HM (Héparan Mimetics) mimant la structure des glycosaminoglycanes (GAGs), et en particulier des héparanes sulfates, initialement synthétisés pour leur capacité de régénération tissulaire (d'où leur autre appellation de RGTA pour Regenerating Agents) (Blanquaert et al., 1995; Meddahi et al., 2002), ont été testées dans le traitement des maladies à prions. Ces molécules support de l'adhésion et de la prolifération cellulaire (Bernfield et al., 1999) peuvent se lier à la PrP au niveau de sites spécifiques (Warner et al., 2002) et jouent un rôle prépondérant dans l'endocytose de la PrP et le métabolisme des prions (Ben-Zaken et al., 2003). Elles agissent en outre comme co-récepteurs pour la liaison de la PrP avec la récepteur de la laminine LR (Hundt et al., 2001). Deux études récentes ont montré que deux HM inhibaient efficacement et de façon dose dépendante la PrP^{res} dans différentes lignées cellulaires (Adjou et al., 2003; Schonberger et al., 2003). Cet effet inhibiteur est très rapide *in vitro*. En effet, on observe une diminution du taux de PrP^{res} après 24h de traitement et son élimination totale après 96h et jusqu'à 50 jours. Les HM semblent se lier avec la PrP^C inhibant ainsi la conversion de PrP^C en PrP^{res}.

La dapsonne

C'est une phénylsulfone prescrite habituellement comme antibactérien ou antiparasitaire qui peut passer la BHE et qui a été utilisée dans le traitement de la lèpre. L'administration par voie orale de dapsonne à 2 mg/kg dès le début de la contamination et poursuivie pendant toute la période d'incubation et la phase clinique, entraîne une augmentation du temps de survie de 30% chez les animaux traités (Manuelidis et al., 1998).

La Quinacrine

La Quinacrine est une molécule qui a longtemps été prescrite dans le traitement du paludisme et du trypanosome. Un traitement de neuroblastomes murins en culture avec la Quinacrine inhibe totalement l'accumulation de PrP^{res} (Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001). La spectroscopie RMN a permis de déterminer que la Quinacrine se lie sur la protéine PrP humaine recombinante au niveau du tripeptide ²²⁵YYQ²²⁷ de l'hélice α 3 (Vogtherr et al., 2003). Ce tripeptide est localisé près du site d'interaction putatif avec un facteur cellulaire X

qui serait impliqué dans la propagation de PrP^{Sc}. L'effet de la Quinacrine pourrait donc passer par une compétition avec le facteur X pour la liaison à la PrP^C.

Une étude récente montre également que l'effet antiprion de la Quinacrine serait lié à sa capacité à déstabiliser les membranes lipidiques par une redistribution du cholestérol (Klingenstein et al., 2006). Cette molécule, utilisée depuis longtemps en médecine, est vite apparue comme la molécule « miracle » pour traiter des patients atteints de CJ.

Cependant, une étude *in vivo* a montré que 10 mg/kg/jour de Quinacrine par voie orale pendant 5 ou 65 jours après une inoculation intracérébrale à des souris ne permettait pas d'augmenter la survie des animaux (Collins et al., 2002). Les effets cytotoxiques de cette molécule consécutifs à une administration régulière (dysfonctionnement du foie, psychose, cardiomyopathie) ont conduit l'équipe de Prusiner à tester des énantiomères de la Quinacrine (Ryou et al., 2003) comme cela avait déjà été fait pour le paludisme (Webster et al., 1991). Grâce à des études de structure-activité, des bis-acridines ont été créés. Elles présentent une activité dix fois plus forte que la Quinacrine. La chimie combinatoire joue donc un rôle très important pour l'optimisation des molécules actives, par l'ajout ou la suppression de groupements (Dollinger et al., 2006).

La Chlorpromazine

La Chlorpromazine est une phénothiazine utilisée depuis de nombreuses années comme antipsychotique et connue pour passer la BHE. Cette molécule est capable d'inhiber l'accumulation de PrP^{Sc} dans le modèle de neuroblastome murin avec une IC50 de 3 µM (Korth et al., 2001).

Polyamines branchées

Les polyamines branchées telles que le polyéthylèneimine (PEI) et les polyamidoamides (PAMAM) ont été décrites pour inhiber totalement l'accumulation de PrP^{Sc} dans des cellules ScN2a (Supattapone et al., 2001). Ces composés se lieraient directement à la PrP^{Sc} et stimuleraient la protéolyse de la PrP^{Sc} dans les endolysosomes dans les 3h qui suivent l'administration.

Approches thérapeutiques ciblant la protéine PrP^C

- « Knock-out » du gène PrP^C dans les souris adultes

La délétion du gène neuronal PrP^C dans des souris adulte n'a montré aucun effet délétère majeur (Mallucci et al., 2002). Ces souris sont résistantes à l'inoculation du prion (Mallucci et al., 2003). Ces résultats suggèrent que des approches thérapeutiques visant à réduire l'expression de PrP peuvent être efficace sans être trop délétères.

- Acides ribonucléiques

L'utilisation de petits ARN appelés ARN interférence (*RNAi*), dirigés contre l'ARNm codant la PrP^C ovine : Ces RNAi ont été transfectés dans des cellules RK13 (*rabbit kidney epithelial cells*) transfectées avec un vecteur exprimant les gènes *Prnp* murin et ovin et dans des cellules Rov9 (lignée de cellules épithéliales de lapin chroniquement infecté par le prion ovin) exprimant des taux élevés de PrP^C ovine. Une inhibition significative de l'expression de la PrP ovine dans les 2 types cellulaires (Tilly et al., 2003) est observée.

Plus récemment, l'équipe d'Alexander Pfeifer a montré que des shRNA (*short hairpin RNA*) anti- PrP^C, incorporés dans des lentivirus (capables d'infecter des cellules ne se divisant pas comme les neurones par exemple) répriment la réplication du prion aussi bien, *in vitro* dans une lignée de neuroblastomes infectée par une souche murine du prion que, *in vivo* chez des souris chimériques où les cellules souches embryonnaires ont été transfectées par le lentivirus portant le shRNA, allongeant ainsi significativement la survie de ces souris après infection par l'agent du scrapie (Kong, 2006; Pfeifer et al., 2006).

Par ailleurs, Daniela Proske a isolé des petits acides ribonucléiques appelés aptamères qui se lient à la PrP^C humaine au niveau des acides aminés 90-129. Ces aptamères, permettent de réduire la synthèse de PrP^{Sc} *de novo* en 16h dans une lignée cellulaire de neuroblastome (3F4-ScN2a) qui exprime de façon stable la PrP murine endogène et une PrP chimérique souris-hamster-souris (MHM2) (Proske et al., 2002). Le mode d'action de ces aptamères passerait par une inhibition de la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} selon le modèle de polymérisation par noyau de nucléation, en se liant initialement à la PrP^C.

Modulateurs de la mort neuronale

Plusieurs stratégies ont été développées afin de prévenir ou de compenser la perte neuronale caractéristique de la pathogenèse. La mort neuronale qui survient est majoritairement reliée à un mécanisme d'apoptose, provoquée par un dépôt de protéines et de médiateurs

neurotoxiques sécrétés par les cellules gliales. Des drogues anti-apoptotiques telles que la flupirtine et la mémantine ont montré un effet cytoprotecteur dans des modèles expérimentaux mettant en jeu des cellules neuronales exposées au peptide 106-126 connu pour ses propriétés neurotoxiques *in vitro* et *in vivo* par induction de l'apoptose (Forloni et al., 1993; Perovic et al., 1995). La flupirtine, dérivé de puridine, augmenterait l'expression de Bcl2 qui est une molécule anti-apoptotique.

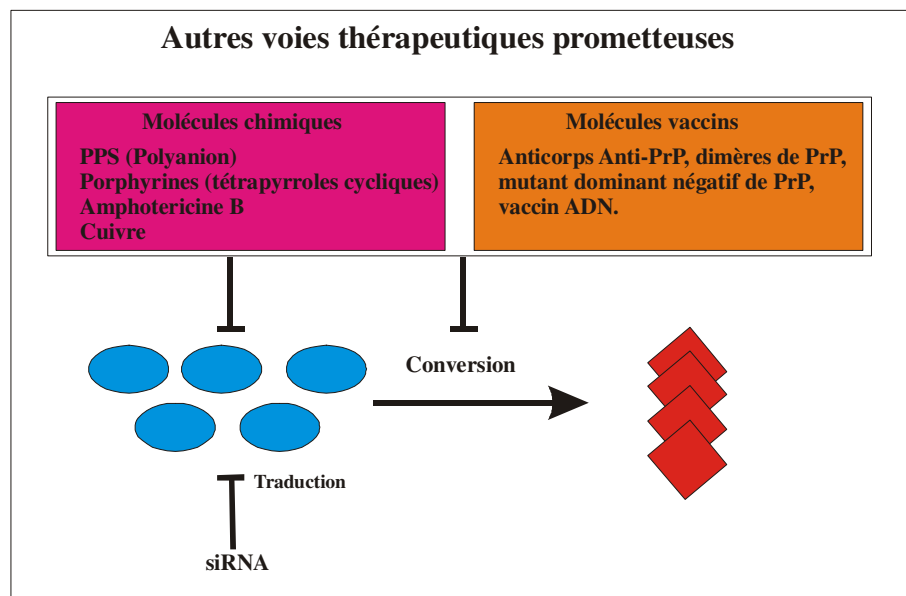


Figure 40 : Différentes voies d'actions thérapeutiques contre les maladies à prion.

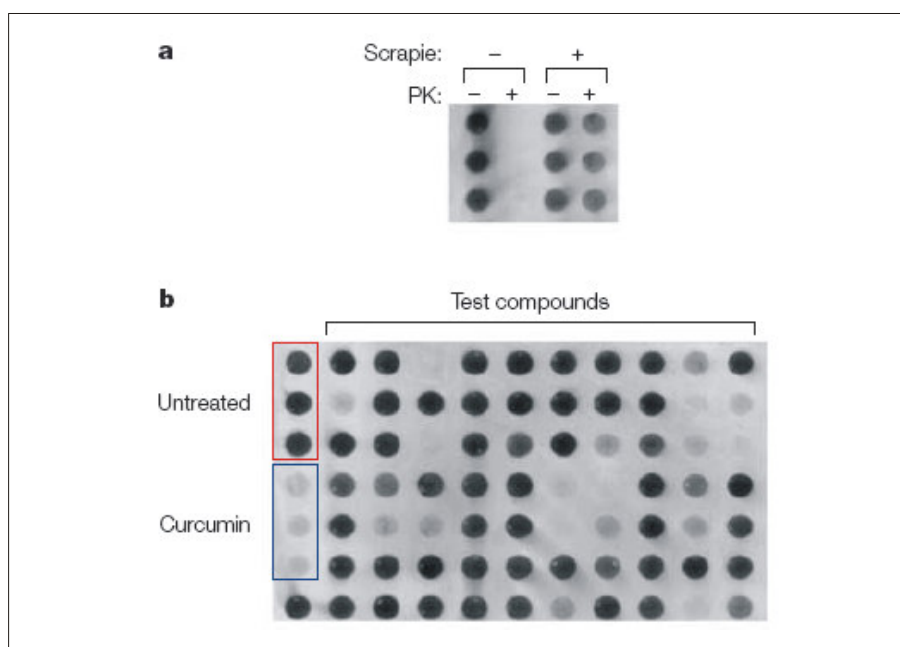
Aujourd'hui plusieurs molécules chimiques sont actives dans des systèmes cellulaires de maladies à prion. Plus récemment des molécules vaccins ont été découvertes ou encore les ARN antisens ont montré une activité.

IV.3 Criblage de molécules antiprion

Depuis le début de ce manuscrit, nous avons abondamment évoqué le criblage *in vivo* en levure. Ce criblage est effectivement très utile puisqu'il est très simple et permet de tester un grand nombre de molécules en très peu de temps. Les molécules efficaces en levure peuvent ensuite être testées *ex vivo* contre le prion de mammifère. Le fait de faire un premier criblage en levure permet de faire un premier tri et ainsi de tester moins de molécules dans le système *ex vivo* de mammifère dont on sait que le crible est plus fastidieux. Enfin les molécules efficaces *ex vivo* en système mammifère sont ensuite testées *in vivo* dans des modèles murins de maladie à prion.

IV.3.1 Criblage *in vitro* en système mammifère

Tester *in vivo* des composés antiprion potentiels est très long et très coûteux. La plupart des cribles initiaux sont donc des tests *in vitro* (figure 41).



D'après Cashman, 2004

Figure 41 : Criblage « haut-débit » d'inhibiteurs de PrP^{Sc} en système mammifère

Des cellules de neuroblastomes murins N2a infectées par l'agent du scrapie sont mises à croître dans des plaques 96 puits pendant plusieurs jours en absence ou en présence des drogues à tester. Les cellules sont lysées, traitées à la protéinase K (PK) pour éliminer l'isoforme normale de la protéine prion (PrP^C) et quantifiées pour observer l'accumulation de PrP résistante par dot blot *via* un immunomarquage avec des anticorps anti-PrP.

a. Dot blot *via* un immunomarquage avec des anticorps anti-PrP sur des cellules N2a après traitement ou non à la PK de lysats infectés ou non par l'agent du scrapie. Les lysats infectés par l'agent du scrapie présentent bien une résistance à la PK.

b. Représentation d'un criblage en dot blot de différents composés pour l'inhibition de l'accumulation de PrP^{Sc}. Le curcumin (10 μ M), un inhibiteur connu, sert de contrôle positif et les cellules non traitées, de contrôle négatif.

Plusieurs lignées cellulaires chroniquement infectées par essentiellement deux souches de prion, **RML** (Rocky Mountain Laboratory scrapie strain) (Race et al., 1987) et **22L** (Nishida et al., 2000)) ont été développées : des lignées neurales murines :

- N2a (Butler et al., 1988; Race et al., 1987),

- SMB (Clarke and Haig, 1970),
- GTI (Schatzl et al., 1997)) et
- des lignées cellulaires de fibroblastes (Vorberg et al., 2004).

De plus, des cellules épithéliales de lapin exprimant la PrP^C de mouton, infectées par la souche scrapie 127L (Sabuncu et al., 2003; Vilette et al., 2001) ou encore, très récemment, une lignée cellulaire de cerveau d'élan infectée par le CWD (Raymond et al., 2006) ont aussi été développées.

Cependant, avec ce type de systèmes, aucun composé isolé contre le prion de mammifère ne s'est révélé être vraiment efficaces *in vivo* ; même s'ils semblaient être de très bons candidats puisqu'en plus d'être actifs *ex vivo* ils franchissent la barrière hémato encéphalique.

Par exemple, la Quinacrine (classe des acridine) a été trouvée inactive contre la maladie chez l'homme en tests cliniques (Nakajima et al., 2004) et en modèle souris infectées par la tremblante (Collins et al., 2002) alors qu'elle est très active *ex vivo* en tests cellulaires N2a (Doh-Ura et al., 2000). La même chose a été observée récemment pour la mefloquine (classe des quinoline), très active *in vitro* en cellules N2a mais complètement inactive *in vivo* chez la souris (Kocisko and Caughey, 2006).

De plus, ce criblage en cellules mammifères, de par sa lourdeur (par exemple toutes les expériences doivent être réalisées en P2/P3) et sa complexité, ne permet clairement pas un criblage haut-débit.

Pour pallier à ces inconvénients, un criblage informatisé a été mis au point pour identifier des composés antiprion parmi une banque virtuelle de molécules qui pourraient lier la molécule chaperone « X », et ainsi empêcher la réplication du prion. De ce crible est sorti une molécule, la 2-aminopyridine-3,5-dicarbonitrile, qui est maintenant en test chez l'animal (May et al., 2007).

Récemment, une technique bien plus simple a été mise au point au laboratoire. Une méthode de criblage haut débit en système levure a été développée. Le pari initial était que les mécanismes contrôlant l'apparition et/ou le maintien des prions étaient conservés de la levure à l'homme. La grande facilité d'emploi, le faible coût et l'innocuité de la levure pouvaient être mises à profit pour réaliser du criblage haut-débit (Bach et al., 2003).

IV.3.2 Criblage *in vivo* en système levure

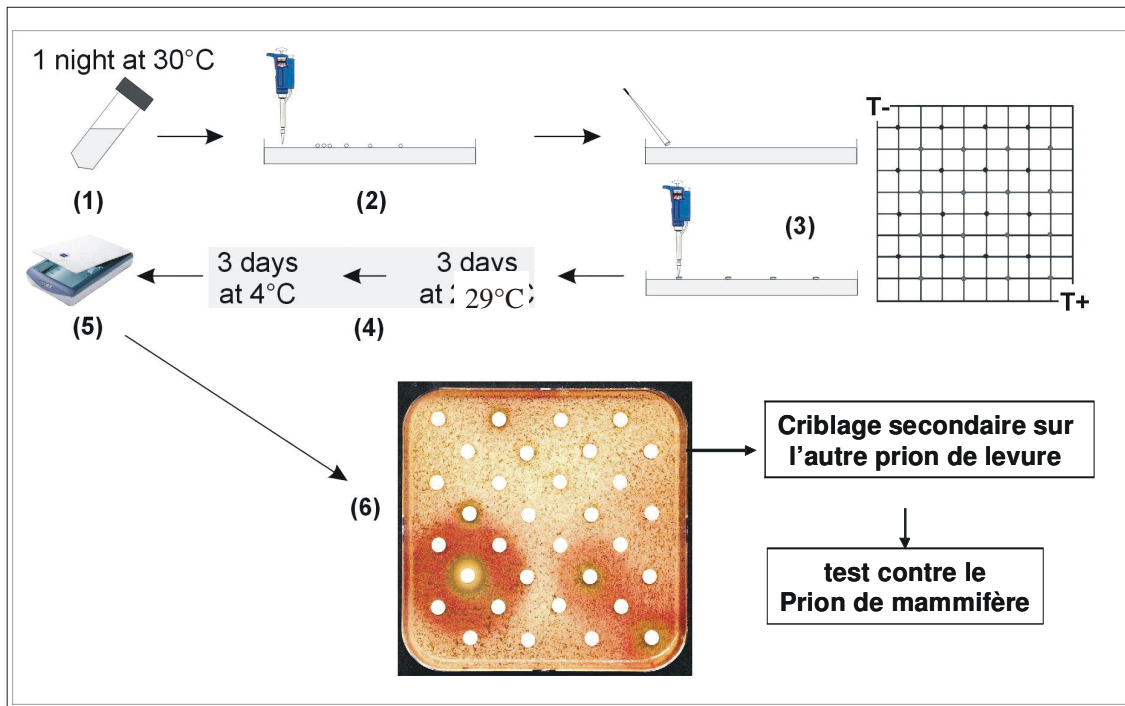
L'équipe a ainsi mis au point une méthode en deux étapes, basée sur la levure *S. cerevisiae* pour faire du criblage haut-débit de nouveaux inhibiteurs de prions (figure 42).

Cette méthode de criblage décrite dans les articles 1 et 2 de ce manuscrit, est basée sur le système de coloration blanc-rouge détaillé précédemment.

Dans un crible primaire, les molécules de différentes chimiothèques (regroupant environs 2500 composés) sont testées pour leur activité contre le prion [*PSI*⁺], puis les quelques molécules efficaces sont ensuite testées contre le prion [*URE3*] : sont considérés comme potentiellement actifs les produits capables de curer les prions de levure, c'est-à-dire de faire changer la couleur des colonies, du blanc (cellules [*PSI*⁺] ou [*URE3*]) vers le rouge (cellules [*psi*⁻] ou [*ure3-0*]) sur milieu riche.

Etant donné la grande divergence, tant de séquence primaire que de fonction biochimique, des protéines responsables de l'apparition de ces deux prions, des molécules actives à la fois contre les deux, sont supposées agir sur des mécanismes généraux de contrôle des prions de levure et non sur des mécanismes spécifiques à l'un ou l'autre de ces prions.

D'un point de vue pratique, les levures contenant un prion sont étalées sur un milieu solide riche YPD (Yeast extract Peptone Dextrose), dans des boîtes de pétri carrées et des petits filtres (à antibiogrammes) sont placés à la surface de l'agar. Sur ces filtres, sont déposés les composés à tester. Ils vont diffuser dans le milieu, autour de la pastille, créant ainsi un gradient de concentration : en une seule manipulation, tout un gradient de concentration est ainsi testé.



D'après Bach et al., 2003

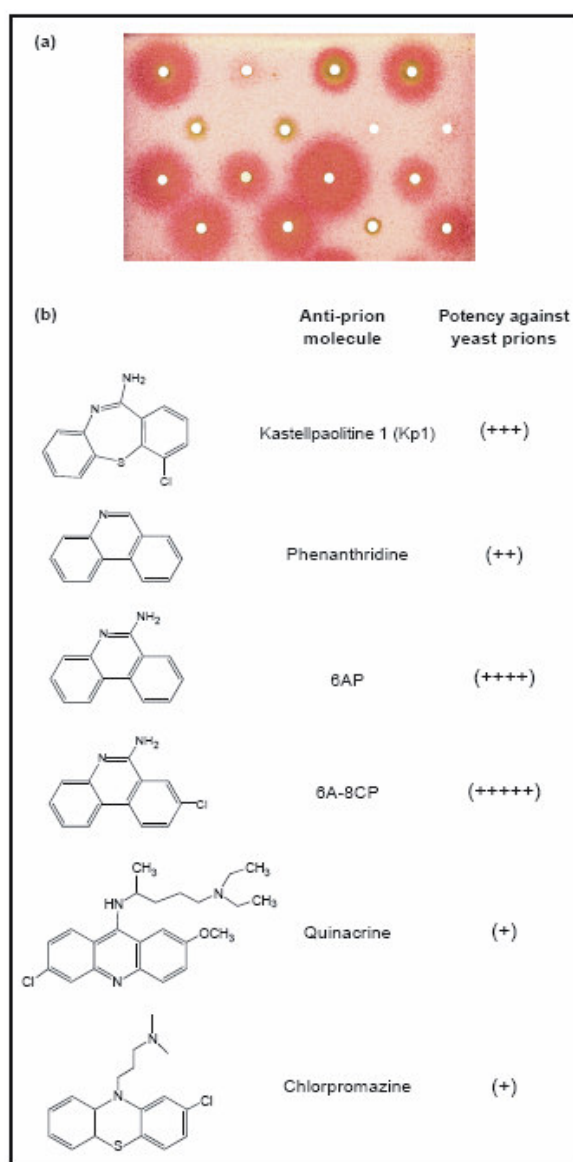
Figure 42 : Criblage haut-débit en système levure d'inhibiteurs des prions.

Des cellules de levures contenant un prion sont étalées sur un milieu riche, puis des filtres à antibiogramme sont déposés à la surface du milieu afin de déposer dessus les différentes drogues à tester. Les boîtes sont mises à incuber 3 jours à 25°C puis 3 jours à 4°C. Les drogues déposées diffusent dans le milieu autour du filtre et, si une molécule se révèle avoir une activité antiprion, un halo de colonies rouges apparaît autour du filtre. En effet, les colonies qui étaient blanches au départ car contenant un prion deviennent rouges suite à la cure de la protéine prion par la molécule. Cette molécule est ensuite testée contre un deuxième prion de levure et si elle se révèle toujours active, elle est testée contre le prion de mammifère en système cellulaire puis éventuellement *in vivo* dans des modèles animaux. Le DMSO, solvant, des drogues testées est utilisé comme contrôle négatif (en haut à gauche) et le Chlorure de Guanidium (GuHCl) comme contrôle positif (en bas à droite).

Afin d'augmenter la **perméabilité membranaire** des levures, les souches utilisées ont été délétées pour le gène *ERG6* (codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ergostérol : constituant des membranes). Le gène *ERG6* est remplacé par le marqueur d'auxotrophie *TRP1* (Bach et al., 2003; Bach et al., 2006), en effet une létalité synthétique existe entre l'inactivation du gène *ERG6* et celle du gène *TRP1+*. En remplaçant le gène *ERG6* par le gène *TRP1* wt, nous sommes sûres que toutes les souches *erg6Δ* sur lesquelles nous travaillons ne sont pas *trp1-*.

Afin d'augmenter **la sensibilité** du test, une quantité sub-efficace de Chlorure de Guanidium (GuHCl) est ajoutée directement dans le milieu de culture (200µM, environ 1/20 de la quantité efficace pour inhiber Hsp104p et donc curer les prions).

De ce premier crible, 6 composés ont été isolés. Ils présentent tous une forte synergie avec une basse concentration en GuHCl. Cette synergie suggère que ces molécules agissent *via* une voie distincte de celle d'Hsp104p (figure 43). Cinq des 6 molécules isolées forment une nouvelle classe, appelée Kastellpaolitines (en référence à Saint-Pol de Léon, près de Roscoff), la sixième étant la phénanthridine, une molécule déjà connue et commercialisée.



D'après Saupe et al., 2003

Figure 43 : les premiers composés à activité antiprion isolés grâce à un crible levure. Les Kastellpaolitines et la phénanthridine sont les premières molécules à avoir été isolées à partir du crible en levure. La 6AP et la 6AP-8CP sont des dérivés très proches de la phénanthridine mais encore plus actifs. La Quinacrine et la Chlorpromazine sont issus des criblages *ex vivo* en systèmes mammifère et qui se sont avérés aussi actifs *in vivo* contre les prions de levure.

Pour tester le pari initial de conservation des mécanismes de contrôle des prions de la levure à l'homme, la Quinacrine et la Chlorpromazine, quelques unes des molécules efficaces *in vitro* contre le prion de mammifère (Korth et al., 2001), ont également été testées chez la levure et se sont révélées actives (figures 43 et 44). Inversement, grâce à la collaboration avec le laboratoire du Pr. Dominique Dormont du CEA de Fontenay-aux-roses et avec le laboratoire du Dr. Didier Vilette de l'INRA de Jouy-en-Josas, nous avons observé que la plupart des molécules issues du test levure présentent également une activité contre le prion de mammifère (prion murin). En effet, les molécules antiprion issues du test levure présentent une activité antiprion dans un système de neuroblastomes murins semblable à celui développé par le groupe de Stanley Prusiner (Korth et al., 2001) (collaboration avec le Dr. Dominique Dormont) mais également dans deux systèmes très différents basés, l'un sur des cellules épithéliales de lapin, les cellules ROV (Vilette et al., 2001) (collaboration avec le Dr. Didier Vilette) (figure 44), et l'autre sur des cellules neurogliales de souris, les cellules MOV (Archer et al., 2004), toutes deux infectées par le prion ovin.

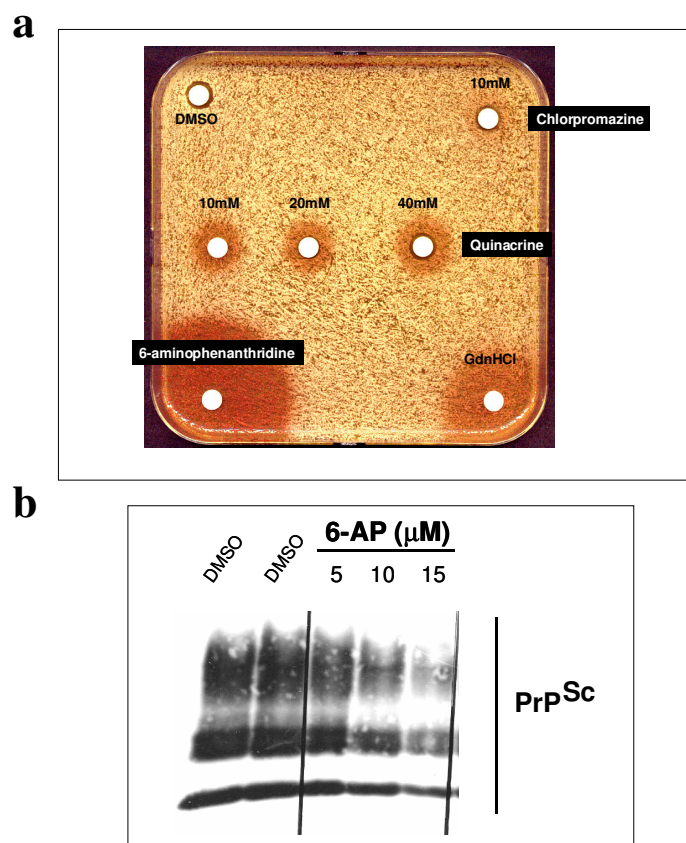


Figure 44 : tests des molécules antiprion dans les systèmes mammifère et levure.

a. La 6 aminophenanthridine (6AP) est active contre les prions en système levure (en bas à gauche) comme le contrôle positif, le chlorure de guanidium mais également comme la Quinacrine et la Chlorpromazine (des molécules antiprion isolées dans des cribles en système mammifère).

b. La 6AP est aussi active contre les prions en système mammifère. En effet, en présence de 6AP, la PrP devient sensible à un traitement à la protéinase K.

Le fait que ces molécules soient actives dans ces deux systèmes (levure et mammifère) confirme leur activité contre le prion de mammifère. Ces résultats sont très importants car ils constituent, à notre connaissance, la première indication fonctionnelle d'une conservation des mécanismes de contrôle des prions de la levure à l'homme. A ce titre ils valident notre méthode de criblage basée sur la levure, mais aussi, de façon importante, l'utilisation de la levure pour étudier les mécanismes de « prionisation ». Ceci a permis le dépôt d'un brevet auprès du CNRS pour protéger cette méthode ainsi que les premières molécules qu'elle a permis d'isoler.

IV.3.3 Test *in vivo* chez les mammifères

Après avoir criblé des molécules intéressantes soit *in vivo* en levure soit *in vitro* en système mammifère, il est nécessaire de les tester *in vivo* en système mammifère.

Malheureusement, les maladies à prions sont connues pour avoir une longue période d'incubation ; pour pallier à ce problème, des souris transgéniques ont été développées avec un temps d'incubation réduit. Par exemple, les souris Tg7 (Priola et al., 2000; Race et al., 2000) qui surexpriment la PrP de hamster : de hautes concentrations de PrP infectieuses administrées au niveau intracérébral provoquent l'apparition de la maladie au bout de 44 jours et au bout de 90 jours si le mode d'administration est intra-péritonéal. Un autre exemple : les souris Tga20 (Fischer et al., 1996) qui surexpriment la PrP de souris : le temps d'incubation est sensiblement le même que celui obtenu pour les souris Tg7.

Finalement, les souris Tg338 infectées par la souche ovine 127S et exprimant la PrP ovine, présentent des périodes d'incubation relativement courtes allant jusqu'à un mois (Beringue et al., 2000; Vilotte et al., 2001).

Ce dernier modèle a été choisi pour tester nos molécules *in vivo*, contre le prion de mammifère. Ces modèles sont les plus rapides, en revanche, ils sont probablement extrêmement stringents, du fait de la forte surexpression de PrP.

V. Objectif et projet de la thèse

V.1 L'objectif majeur de ma thèse

L'objectif est d'utiliser les drogues à activité antiprion, isolées au laboratoire, comme des hameçons moléculaires pour aller « pêcher » leurs cibles cellulaires dans le but de :

- ✚ mieux comprendre leurs mécanismes d'action antiprion,
- ✚ d'identifier de nouveaux mécanismes contrôlant la « prionisation » et
- ✚ finalement d'identifier d'éventuels effets secondaires de ces molécules

Connaître les mécanismes moléculaires précis d'action antiprion de ces molécules pourrait ainsi permettre des avancées importantes dans le domaine des maladies à prions, mais aussi d'autres maladies neurodégénératives ou encore des maladies associées à un mauvais repliement de protéine.

Ces maladies de « mauvaises conformations de protéines » incluent la maladie d'Alzheimer (AD), la maladie de Huntington (HD), la maladie de Parkinson (PD), l'ALS (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*), le diabète de type II et bien sûr les maladies à prions (Cohen and Kelly, 2003). Bien que toutes les protéines impliquées dans ces maladies aient des séquences très différentes et soient localisées dans des compartiments cellulaires différents, elles ont des caractéristiques communes de « mauvais repliement » et d'agrégation (Ross and Pickart, 2004).

Ainsi, de nombreuses approches thérapeutiques dirigées contre la cible prion sont également utilisées en parallèle contre d'autres maladies neurodégénératives (May et al., 2006). Un article récent va dans ce sens, en montrant que dans un modèle de maladie de Huntington basé sur des embryons de *zebrafish*, des molécules antiprion de la classe des N'-benzylidene-benzohydrazide inhibent également l'agrégation des polyQ ainsi que leur toxicité, suggérant ainsi que les agrégats polyQ et les prions pourraient partager des « épitopes » communs (Schiffer et al., 2006).

L'incidence des maladies liées au mauvais repliement des protéines augmente avec l'âge de l'individu. Etant donné que l'âge moyen ainsi que l'espérance de vie de la population augmentent, il devient urgent de développer des thérapies efficaces contre toutes ces maladies. Ceci nécessite de comprendre leurs mécanismes d'apparition et de propagation.

A terme, l'identification de ces facteurs cellulaires devrait nous permettre également de mettre au point de nouvelles méthodes de criblage basées sur le dosage de leur activité. Ces méthodes *in vitro* devraient être encore plus sélectives que notre système *in vivo* actuel tout en permettant toujours le criblage haut débit.

V.2 Projet de recherche

Les molécules antiprion utilisées dans cette étude sont la 6-amino phénanthridine (6AP) et le Guanabenz, molécule issue d'un criblage d'une chimiothèque de molécules au moins en phase 2 de tests cliniques, déjà sur le marché contre l'hypertension.

Pourquoi avoir choisi la 6AP et le Guanabenz ?

Initialement, c'est la phénanthridine qui a été isolée comme ayant une activité antiprion. Cette molécule a l'avantage d'être disponible commercialement, ce qui permet de s'en procurer facilement de grandes quantités. La collaboration avec différents chimistes (Jean Michel Vierfont, Hervé Galons) nous a permis d'optimiser l'activité de cette molécule en lui rajoutant un groupement amino en position 6. Ce qui a donné la 6-amino phénanthridine (6AP), molécule très active dans le système levure mais aussi dans le système mammifère (article 1).

Le Guanabenz (GA) a été isolé comme étant actif contre les prions de levure mais aussi de mammifère suite au criblage d'une collection de molécules toutes au moins en phase 2 de tests cliniques. Ayant déjà passé les tests cliniques, il pourrait être ainsi utilisé chez l'homme très rapidement en traitement compassionnel (article 5).

Ces 2 molécules sont actuellement testées *in vivo* dans des modèles murins de maladies à prions : les premiers résultats sont très encourageants.

Afin d'essayer de répondre à mon principal objectif, deux approches ont été utilisées pour identifier les cibles intracellulaires de la 6AP et du GA :

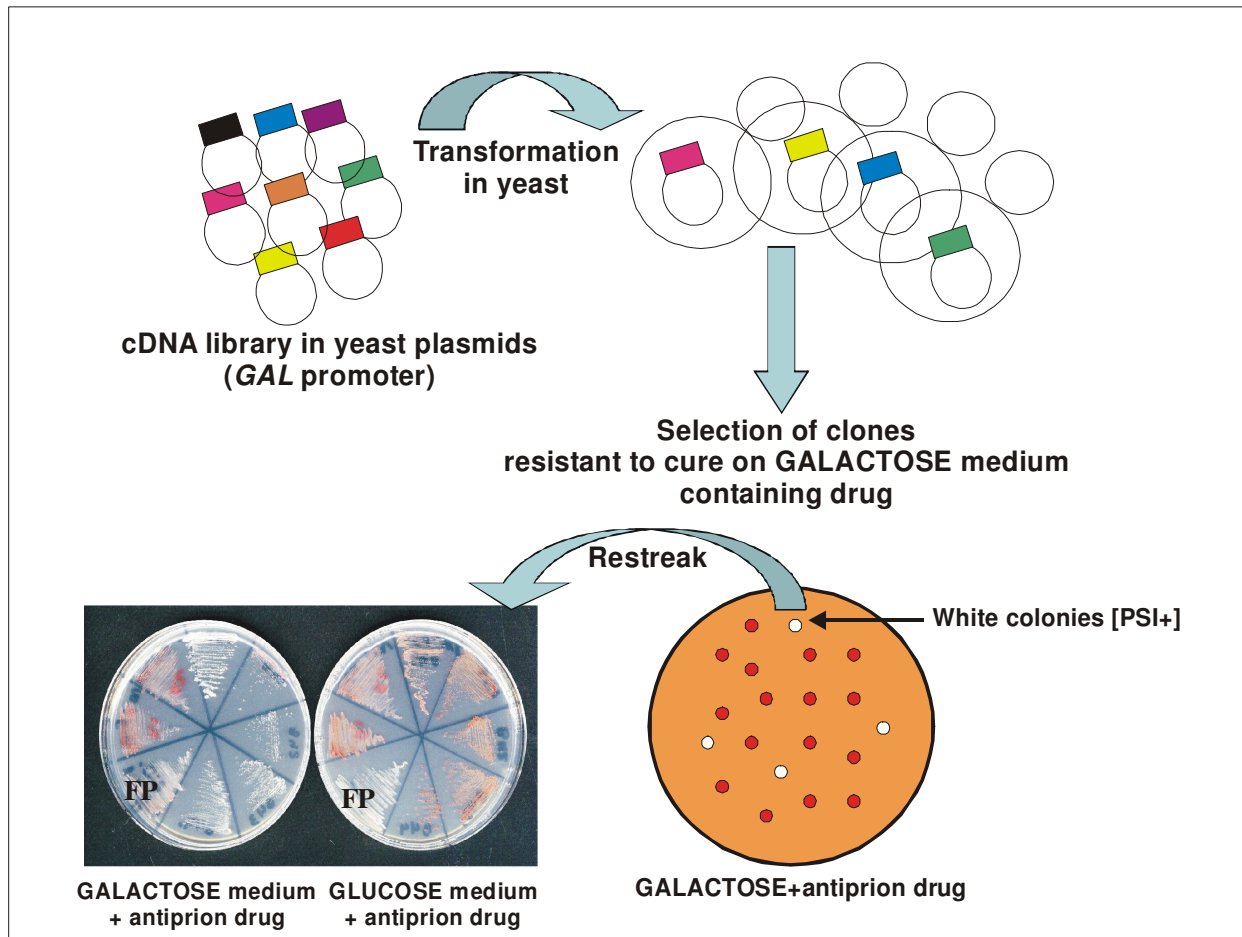
V.2.1 Une approche génétique basée sur la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae a été le premier organisme eucaryote dont le génome a été séquencé (Goffeau et al., 1996), ce qui a mené à différentes bases de données contenant toutes les séquences annotées avec leurs informations fonctionnelles. De là est parti un nombre d'études pionnières utilisant des approches génomiques et protéomiques systématiques. Un exemple est la technique du double hybride qui a permis d'identifier plus de 2700 interactions putatives impliquant au moins 2000 protéines de levure ((Schwikowski et al., 2000; Uetz et al., 2000). Les localisations subcellulaires de plus de 1300 protéines ont pu être identifiées grâce à des fusions systématiques avec la GFP (Green Fluorescent Protein) aux protéines ((Ross-Macdonald et al., 1999). De plus, diverses collections sont disponibles commercialement:

- une collection de 5500 souches dans chacune desquelles un des gènes de levure (Yeast Open Reading Frame (ORF) Collection, Open Biosystem, Huntsville, AL) est placé sous le contrôle du promoteur inductible GAL1 ; cette collection est stockée en plaques 96 puits permettant d'étudier systématiquement l'effet de la surexpression de chacun des gènes de levure sur le phénomène que l'on étudie : effet d'une drogue, d'une mutation, de la surexpression d'un gène humain etc ...
- Une collection de souches de levure délétées pour chacun des gènes de levure, initialement développé par le Saccharomyces Genome Deletion Project (Giaever et al., 2002; Winzeler et al., 1999). Cette collection contient 4850 souches mutantes haploïdes viables et a été utilisée avec succès pour identifier des nouveaux gènes et mécanismes impliqués dans la tolérance aux radiations (Birrell et al., 2001), des maladies humaines mitochondriales (Steinmetz et al., 2002) ou encore pour caractériser les effets de molécules pharmacologiques (Chan et al., 2000).

Pour toutes ces raisons, la levure est un modèle très utile et précieux pour tenter d'élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires affectés par une drogue et donc impliqués dans l'apparition de maladies.

Notre crible génétique n'est pas basé sur ces collections mais le but reste identique : identifier des protéines dont la surexpression empêche la cure par nos drogues et ainsi favorise la formation et la propagation des prions (figure 45). Ce crible est détaillé dans l'article 4 de ce manuscrit.



D'après Tribouillard et al., 2007

Figure 45 : schématisation du crible génétique pour l'identification de protéines "pro-prion".

Une banque de cDNA (qui peut être de diverses origines) exprimée sous contrôle d'un promoteur inductible au galactose dans un plasmide de levure est transformée dans une souche [PSI+] (formant des colonies blanches) et les cellules sont étalées sur un milieu contenant du galactose (condition où l'expression des cDNA est fortement induite) et les drogues antiprion. L'effet de cure rend les colonies rouges. Les colonies qui restent blanches malgré la présence des drogues antiprion expriment un cDNA dont la surexpression empêche la cure par nos drogues. Ces colonies blanches sont restreintes sur le même milieu et aussi en parallèle sur un milieu contenant du glucose à la place du galactose. Les vrais positifs doivent rester blancs sur le milieu inductible mais deviennent rouges sur le milieu où l'expression du cDNA est réprimée (milieu glucose). Dans l'exemple montré, un clone apparaît être un faux positif (FP) puisqu'il reste blanc sur le milieu contenant le glucose. La résistance n'est donc pas causée par la surexpression du cDNA.

V.2.2 Une approche biochimique

L'approche biochimique est décrite dans les articles 3 et 4 de ce manuscrit.

C'est une approche utilisant la méthode de chromatographie d'affinité qui consiste à attacher nos drogues antiprion, la 6AP et le Guanabenz, à des billes de sépharose *via* un bras.

Ces matrices d'affinité servent ensuite à purifier les composants cellulaires ayant de l'affinité pour la 6AP et le GA afin d'élucider les mécanismes de prionisation.

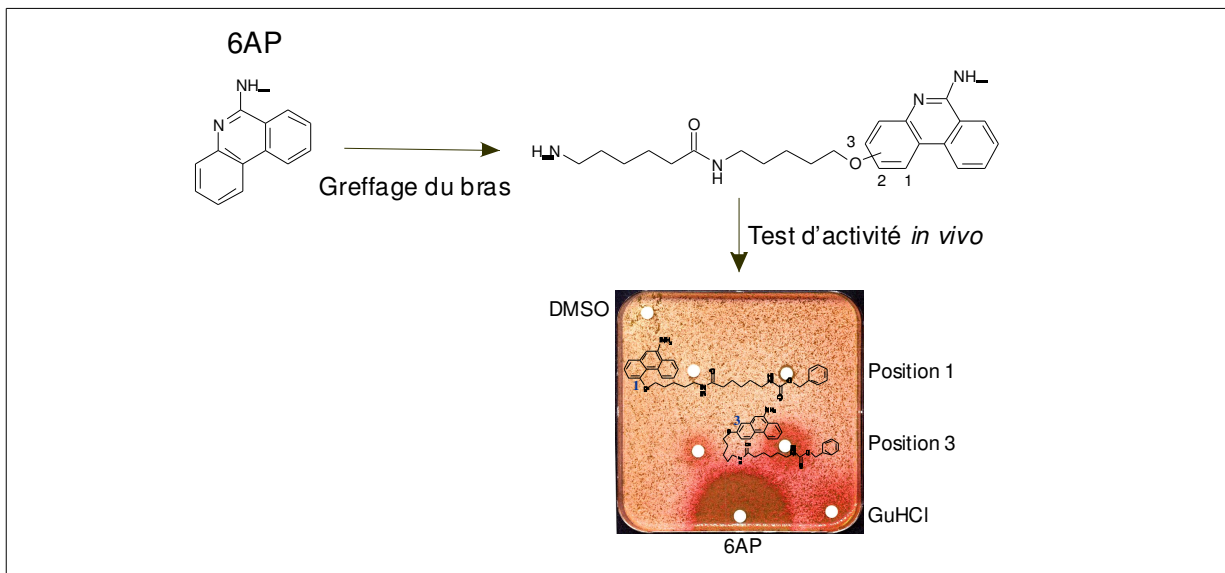
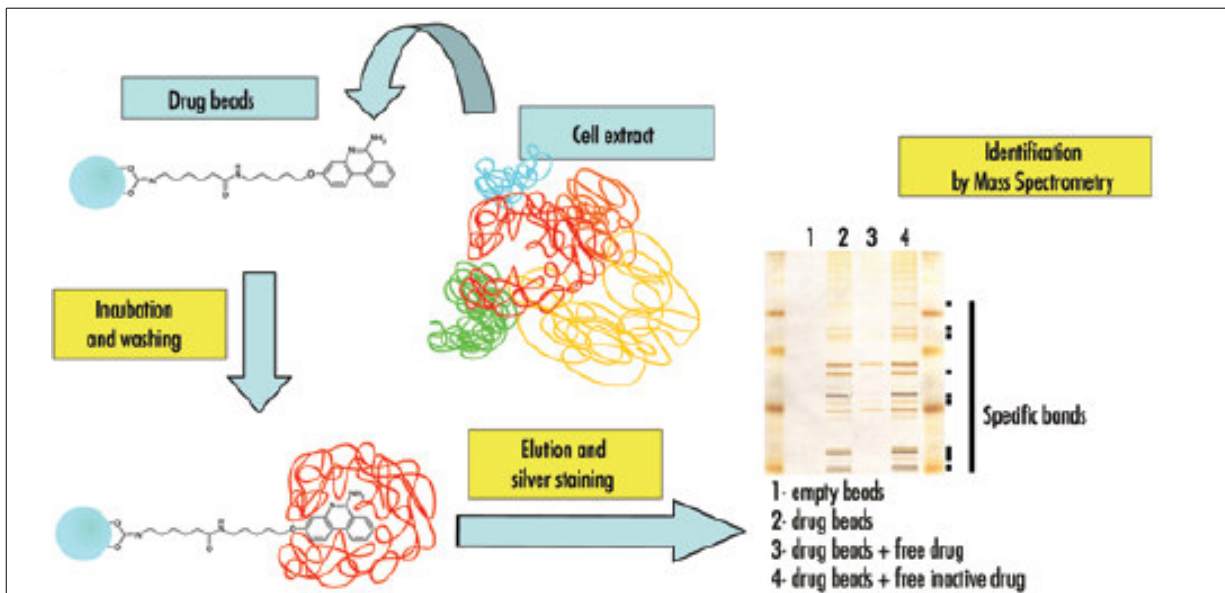
L'activité antiprion des molécules avec le bras est testée *in vivo* chez la levure de façon à s'assurer que ce dernier n'affecte pas (ou peu) leur activité antiprion (figure 46).

Les matrices d'affinité sont mises en contact avec des lysats cellulaires de différents organismes (levure, porc, souris, lapin infectés ou non par le prion ; mais aussi lysats de cellules pour les modèles « huntington » ou « mucoviscidose »).

Les protéines interagissant avec les drogues se fixent sur ces matrices qui sont ensuite lavées de façon intensive.

Les protéines fixées sont ensuite éluées et analysées en SDS PAGE. Des colorations à l'argent (très sensibles) permettent de révéler ces protéines.

Des colorations au bleu (moins sensibles mais compatibles avec la spectrométrie de masse) permettent une découpe des bandes jugées intéressantes afin de les envoyer pour identification par spectrométrie de masse (collaboration avec Charles Pineau de Rennes dans le cadre de la Génopole Grand-Ouest).

a**b**

D'après Tribouillard et al., 2007

Figure 46 : approche biochimique pour l'identification des cibles de molécules à activité anti-prion.

a. Un bras d' amino caproylaminopentyl oxy est greffé à la 6AP afin de fixer au bout de ce bras une bille sépharose. L'activité anti-prion de la 6AP avec son bras est testée en système levure. La fixation en position 1 de la 6AP inhibe l'activité de la molécule mais pas lorsque le bras est greffé en position 3. Cette dernière position sera donc utilisée pour les expériences de chromatographie d'affinité.

b. Des extraits cellulaires (de diverses origines) sont mis en contact avec la 6AP immobilisée *via* le bras d' amino caproylaminopentyl oxy en position 3. Après des lavages intensifs, les protéines restant fixées à la matrice sont mises à migrer sur gel SDS puis révélées par une coloration à l'argent. Les protéines se liant spécifiquement sont analysées par spectrométrie de masse. Différents contrôles sont réalisés pour identifier les fixations spécifiques: piste 1. les extraits cellulaires sont passés sur une matrice sans drogue, piste 3. une compétition est réalisée avec la drogue anti-prion libre, cette dernière empêche les protéines de se fixer sur la matrice drogue-bille et enfin piste 4. une compétition est réalisée avec la 6APi, un proche dérivé de la 6AP mais inactif comme anti-prion, cette dernière ne devrait pas empêcher la fixation des protéines sur la matrice. Ainsi, les protéines se liant spécifiquement sont absentes sur la matrice sans drogue, compétées par la drogue active libre (6AP) et non compétées par la drogue inactive libre (6APi).

MATERIELS ET METHODES

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés au cours de la thèse.

Gène	Nom	Séquence	Position	Utilisation
SSA1	OBM 1130	5' GTAATCAAgTATTACAAgAAACAA AAATTCAGTAAATAACAATAAT Cgg ATCCCgggTTAATTAA 3' FI	Oligo aller, 47 nucléotides (nt) avant l'ATG	Amplifier la cassette SSA1 : HIS5
	OBM 1131	5' CCcAgATCATTAAAgAgCATTTTCg TTATTATCAATTgCCgCACCAATTggC g AATTCgAgCTCgTTTAAAC 3' RI	Oligo retour, 53 nt après le Stop	
	OBM 1132	5' gATgTATCTTCgAgAagg 3'	Oligo aller, 150 nt avant l'ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion SSA1 : HIS5
	OBM 1133	5' gTTAgCgATAATCAAgAag 3'	Oligo retour, 190 nt après le Stop	
SSA2	OBM 1173	5' gATTAATTCCAACAATCAAgCAgATT TTATACAATAATTTATACA CggATCC CCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 48 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette SSA2 : HIS5
	OBM 1172	5' ggAAAgCAAAAgTAAACTTTTCggAT ATTTTACAaggCgATCgCTAAGc gAATTC GAgCTCgTTTA 3'	Oligo retour, 50 nt après le Stop	
	OBM 1124	5' gACTgCATggCACTgCATTc 3'	Oligo aller, 340 nt avant l'ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion SSA2 : HIS5 et amplifier la cassette SSA2 : LEU
	OBM 1125	5' ggTTTCgACggTATAgATg 3'	Oligo retour, 325 nt après le Stop	
SSA3	OBM 1126	5' CgAggATgATgAgCACAAACC 3'	Oligo aller, 330 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette SSA3 : TRP1 et vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion SSA3 : TRP1
	OBM 1127	5' ggAggCCCATCgAAGAggg 3'	Oligo retour, 370 nt après le Stop	
SSA4	OBM 1128	5' CgCACATCCATTCCggTATg 3'	Oligo aller, 370 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette SSA4 : KanMX et vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion SSA4 : KanMX
	OBM 1129	5' gAAACACCTgTACgCTgTAG 3'	Oligo retour, 370 nt après le Stop	
SSB1	OBM 1116	5' gTTTCTTgCTTTggATTTTCAgATg TCCCAAgATCATTACAATATTg AACAAACggATCCCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 60 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette SSB1 : TRP1
	OBM 1117	5' gAgAAACAAAATTATATACAATA TAAgTAATATTCATATATgATgAAT GCAGTCgAATTCgAgCTCgTTTAAAC 3'	Oligo retour, 60 nt après le Stop	
	OBM 1118	5' gTCgCTTTgCTTTTCCTC 3'	Oligo aller, 90 nt avant l'ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion SSB1 : TRP1
	OBM 1119	5' CAgTAAACgTTATCAAgC 3'	Oligo retour, 158 nt après le Stop	
SSB2	OBM 1112	5' gCACCTgTTACCCATCgTTTTCCTT CAAgAAACCAAgAACCAATATCCCTAT TAACAggATCCCCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 60 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette SSB2 : KanMX
	OBM 1113	5' gCATTAATAAATgAAAATATATATA TgTgTATAACCTTAACCAgAATgACATC g AATTCgAgCTCgTTTAAAC 3'	Oligo retour, 55 nt après le Stop	
	OBM 1114	5' CAACTgCTATTCTCAATCg 3'	Oligo aller, 127 nt avant l'ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion SSB2 : KanMX
	OBM 1115	5' gATCgTgATATACAgAAC 3'	Oligo retour, 103 nt après le Stop	
HOR7	OBM 1175	5' ggACTATCAATCATACAATATTgTC AAAAAAAAAAAgACTATAATAAAAA CggATCCCCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 54 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette HOR7 : HIS5
	OBM 1176	5' CCACCTTTCTCTTCATgTATCCA AACAAAgTCTAAAT gAATTCgAgCTCgTT TAAAC 3'	Oligo retour, 41 nt après le Stop	
	OBM 1177	5' gTTTCTgggACgTCTTAAAC 3'	Oligo aller, 85 nt avant l'ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion HOR7 : HIS5
	OBM 1178	5' ggATTgTTCTTTCTACAC 3'	Oligo retour, 68 nt après le Stop	
ZUO1	OBM 1186	5' CCTACCgATgCTTTATAAAATCTTCg TTTTgTCTCACATATACCAACAAGTA ACgCggATCCCCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 58 nt avant l'ATG	Amplifier la cassette ZUO1 : Nar
	OBM 1187	5' CgTTCCTATAATATTCgTATCATTc gTATATATTCATTCATTTCTTACggTAT gAAT TCgAgTCTgTTTAAAC 3'	Oligo retour, 57 nt après le Stop	
	OBM 1190	5' TCAAAGAgCTggTAGAgAA 3'	Oligo aller, 92 nt avant l'ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de déletion ZUO1 : Nat
	OBM 1191	5' gggAACCGTTACCCgAAC 3'	Oligo retour, 100 nt après le Stop	

Gène: Gène amplifié.

Nom: nomenclature attribuée aux oligonucléotides dans la base de donnée du laboratoire.

Position: position dans le gène de la première base de l'oligonucléotide.

PKC1	OBM 1288	5' gCTCTA gCgAggAAA gTA AgATAA g TATCACACATATA gggAgCAgTTTACA g TCCggATCCCCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 56 nt avant l' ATG	Amplifier la cassette PKC1 : KanMX
	OBM 1289	5' CAACCTTTTCCgCTTA gATgT TTTATAT AAAAT TAAATAAATCATggCATgACCT TTTCTgAATTCgAgCTCgTTTAAAC 3'	Oligo retour, 59 nt après le Stop	
	OBM 1298	5' CgACA gTTCAggAgCAgTAAA Ag 3'	Oligo aller, 270 nt avant l' ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de délétion PKC1 : KanMX
	OBM 1299	5' CCTgAgCTgTTTCTTAgATgC 3'	Oligo retour, 273 nt après le Stop	
FES1	OBM 1352	5' gCCATTACCTTTCAACgAAA gAgTAA AATAgAAAAAAAACACATACATA ACT CggATCCCCgggTTAATTAA 3'	Oligo aller, 53 nt avant l' ATG	Amplifier la cassette FES1 : HIS5
	OBM 1353	5' CCggTTA AA gATA ATATgAAATggTgAA TgTAATATCATTTTATTCTACggACgTA AgAATTCgAgCTCgTTTAAAC 3'	Oligo retour, 58 nt après le Stop	
	OBM 1354	5' CCTCTTggACTggAATCTTC 3'	Oligo aller, 183 nt avant l' ATG	Vérifier le remplacement du gène sauvage par la cassette de délétion FES1 : HIS5
	OBM 1355	5' ggTAAATACTTgATgACTgAggC 3'	Oligo retour, 312 nt après le Stop	
T3	OBM 1082	5' ATTAACCTCACTAAA g 3'	Oligo aller, juste en amont du promoteur GAL1 (95 nt avant le cDNA)	Amplifier dans la banque CMB 102
M13	OBM 1083	5' gTAAACgACggCCAgT 3'	Oligo retour, 80 nt après le cDNA	
	OBM 1167	5' CgACggCCAgTgAATTgCg 3'	Oligo aller, en position + 385	Amplifier dans la banque pFL44
	OBM 1168	5' CAgCTATgACCATgATTACg 3'	Oligo retour, en position +486	
SSA1-SacI	OBM 1136	5' CgTACgAgCTCgCACgTgTgCgCgg TgTg 3'	Oligo aller, 292 nt avant l' ATG	Cloner SSA1 dans p416 CYC1 sous son propre promoteur
SSA1-HindIII	OBM 1137	5' gTACTgAAgCTTgCCgCACCAATTgg CTTAAT 3'	Oligo retour, 15 nt après le Stop	Cloner SSA1 dans p416 CYC1
SSA1-BamHI	OBM 1138	5' gTACgggATCCATgTCAAAA gCTgTC gg 3'	Oligo aller partant de l' ATG	Cloner SSA1 dans p416 CYC1 sous le promoteur CYC1
SSA2-BamHI	OBM 1160	5' gTACgggATCCATgTCTAAA gCTgT Cgg 3'	Oligo aller, partant de l' ATG	Cloner SSA2 dans p416 Gal Ura sous le promoteur Galactose
SSA2-HindIII	OBM 1161	5' gTACTgAAgCTTgggCgATCgCTAAgCTT AAT 3'	Oligo retour, 15 nt après le Stop	
SSB1/2-BamHI	OBM 1162	5' gTACgggATCCATgCgTgAAggTgTTTTTC 3'	Oligo aller, partant de l' ATG	Cloner SSB1/2 dans p416 Gal Ura sous le promoteur Galactose
SSB1-HindIII	OBM 1163	5' gTACTgAAgCTTgTgATgAATgCAgTCTT AAC 3'	Oligo retour, 15 nt après le Stop	Cloner SSB1 dans p416 Gal Ura sous le promoteur Galactose
SSB2-HindIII	OBM 1164	5' gTACTgAAgCTTCCAgAATgACATCTTA ACg 3'	Oligo retour, 13 nt après le Stop	Cloner SSB2 dans p416 Gal Ura sous le promoteur Galactose
SUP35-BamHI	OBM 1064	5' gTACgggATCCATgCggATTCAAACCAA ggC 3'	Oligo aller, partant de l' ATG	Cloner la région NM (1-254 acides aminés) de SUP35 dans pBM360 sous promoteur CYC1 et en fusion avec GFP
SUP35-EcoRI	OBM 1166	5' gAAgggAATTCATATCgTTAACAACCT CgTC 3'	Oligo retour, 762 nt après l' ATG	

B. Matériel et méthodes

I. Matériels

I.1 Oligonucléotides

Les oligonucléotides que nous avons utilisés sont récapitulés dans le tableau 9. Ils ont été synthétisés chez Proligo et Eurogentec.

I.2 Vecteurs et banques de plasmides

I.2.1 Les vecteurs

- 🚩 P4XX promotor (Martin Furk, 1994) : plasmides possédant le gène de résistance à l'ampicilline et permettant d'exprimer des gènes sous leur propre promoteur mais aussi sous le promoteur CYC1, ADH, TEF, GPD ou GAL (figure 47).

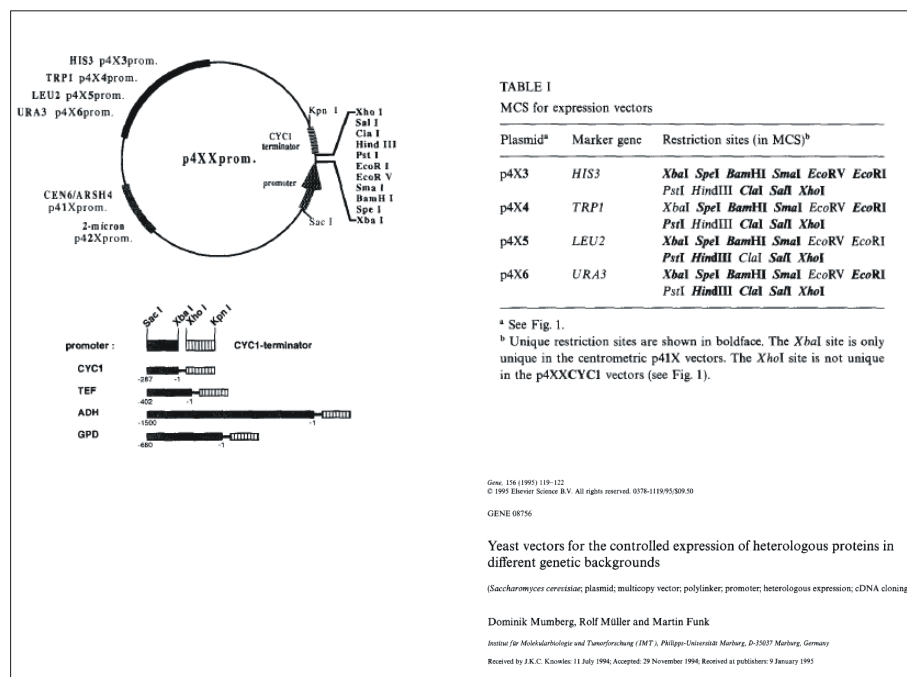


Figure 47 : Carte du plasmide p4XX promotor.

Les P4XX promotor (Martin Furk, 1994) sont des plasmides qui, possédant le gène de résistance à l'ampicilline permettent l'expression en bactéries mais aussi les marqueurs de sélection (*HIS3*, *TRP1*, *LEU2* et *URA3*) permettent l'expression en levures. Ces plasmides permettent aussi d'exprimer des gènes sous leur propre promoteur mais aussi sous le promoteur *CYC1*, *ADH*, *TEF*, *GPD* ou *GAL* suivant si le gène est inséré dans le site de restriction après le promoteur du plasmide ou bien dans le site de restriction avant le promoteur du plasmide (dans ce cas, le site *Sac1* est utilisé).

✚ pFA6a (Longtine, 1998) : plasmides permettant de construire des cassettes de délétion ou de fusionner des gènes à un Tag HA, GFP, Myc, GST (figure 48).

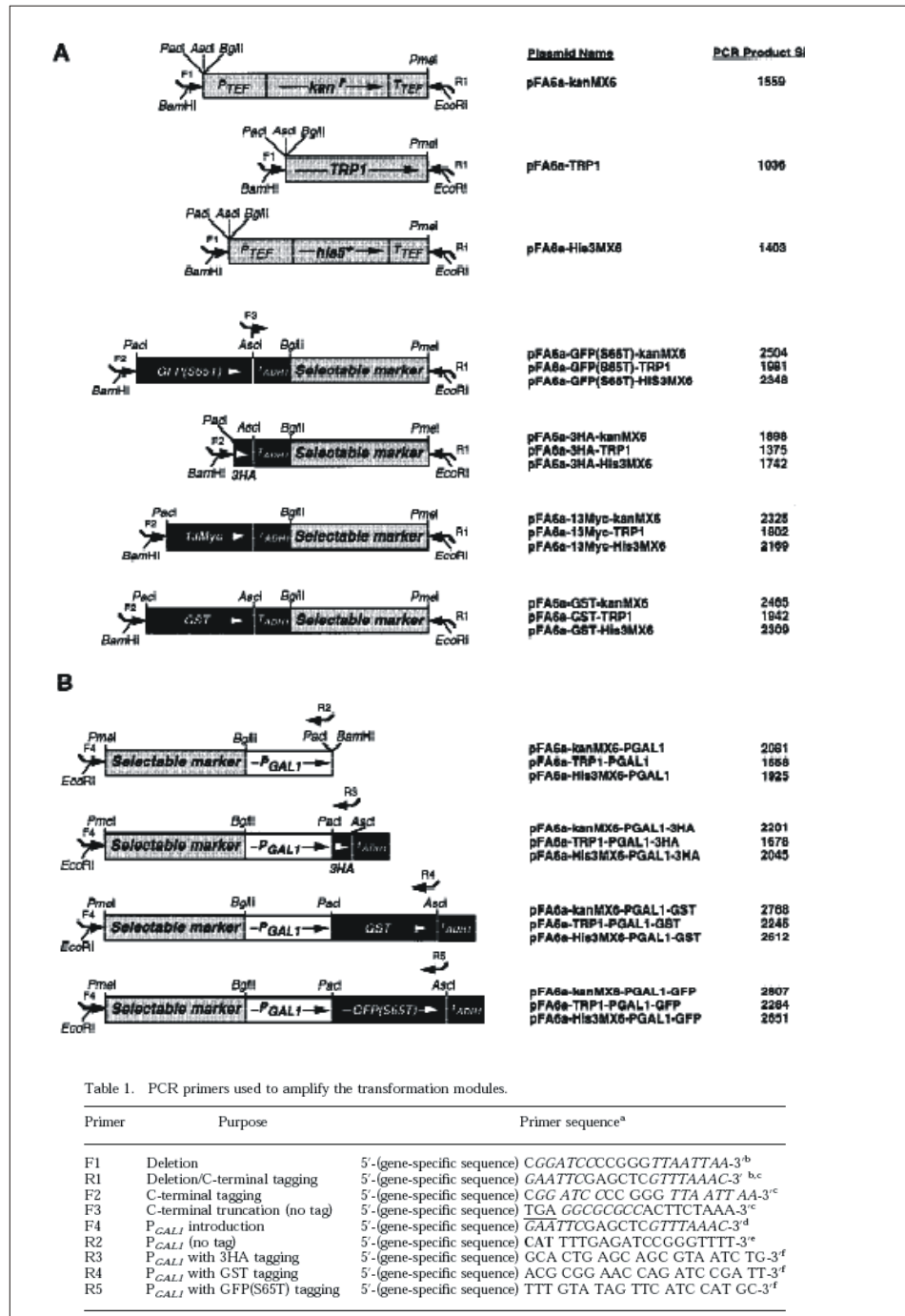


Figure 48 : Carte des plasmides pFA6a.

PFA6a (longtine, 1998) sont des plasmides permettant de construire des cassettes de délétion *via* les trois premières constructions ou de fusionner des gènes à un Tag HA, GFP, Myc, GST *via* les constructions suivantes. Le tableau montre la séquence des amorces utilisées de part et d'autre des cassettes.

- ✚ pBM360 (Blondel et al., 2000) possédant la protéine Hof1p fusionnée à la GFP, permettant ainsi de fusionner une protéine d'intérêt à la GFP.
- ✚ pET-21a (Novagen) : Vecteur d'expression bactérien
- ✚ pRS423
- ✚ pRS315
- ✚ pRS424
- ✚ pRS416

I.2.2 Banque de plasmides

- ✚ Banque de cDNA de levure CMB102 (Liu et al., 1992) : Banque portant le marqueur de sélection URA3 et dont l'expression des gènes est régulée par le promoteur *GAL1*. L'expression des cDNA est inducible par le galactose (figure 49).

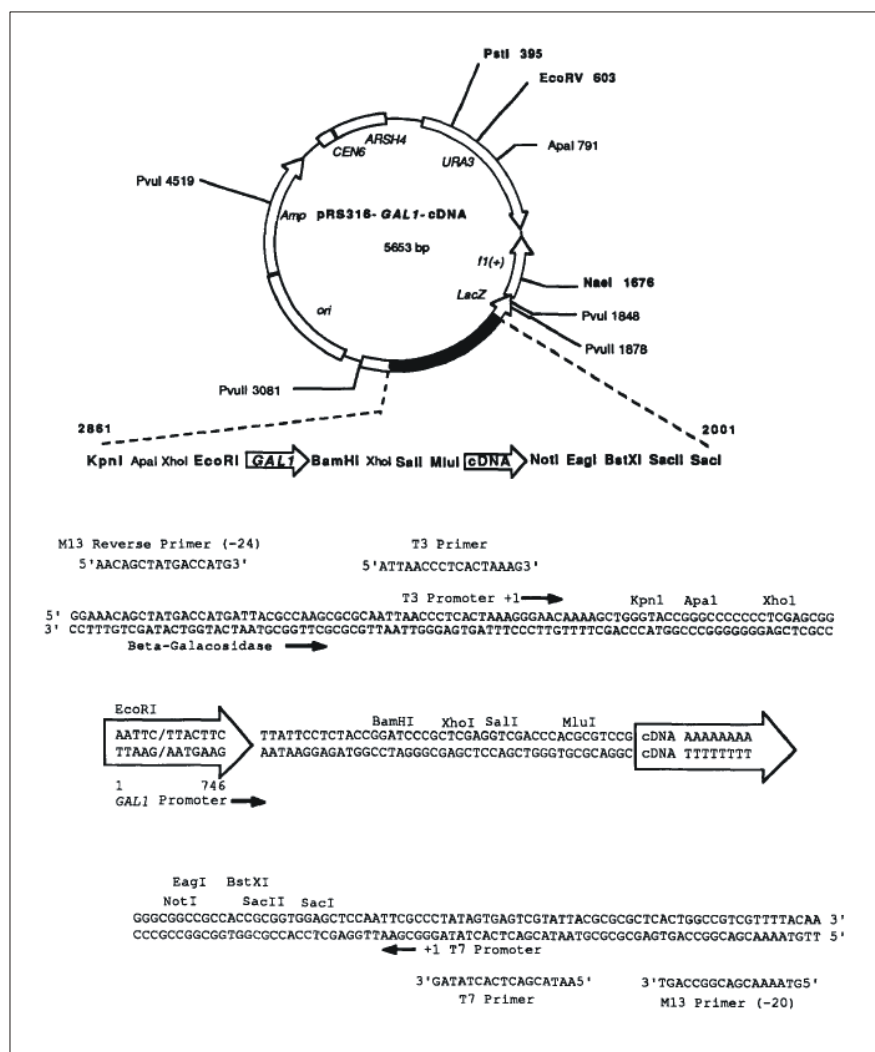


Figure 49 : Carte de la banque de cDNA de levure CMB102.

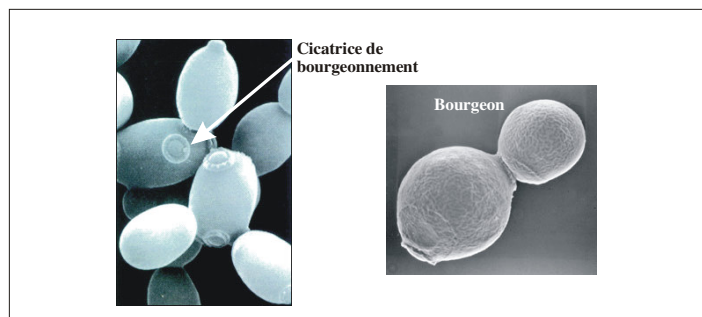
La Banque de cDNA de levure CMB102 (Liu, genetics, 1992) est une banque portant le marqueur de sélection URA3 et dont l'expression des gènes est régulée par le promoteur *GAL1*, ainsi l'expression des cDNA est inducible par le galactose.

I.3 Matériels biologiques

I.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est une levure utilisée depuis l'aube de l'humanité dans l'élaboration du pain, du vin et de la bière de fermentation haute. C'est pourquoi elle est appelée « levure de boulanger » ou « levure de bière ». Enfin, du fait de son mode de division, elle est également nommée « levure à bourgeon » (ou « levure bourgeonnante », *budding yeast* en anglais) (figure 50).

a



b

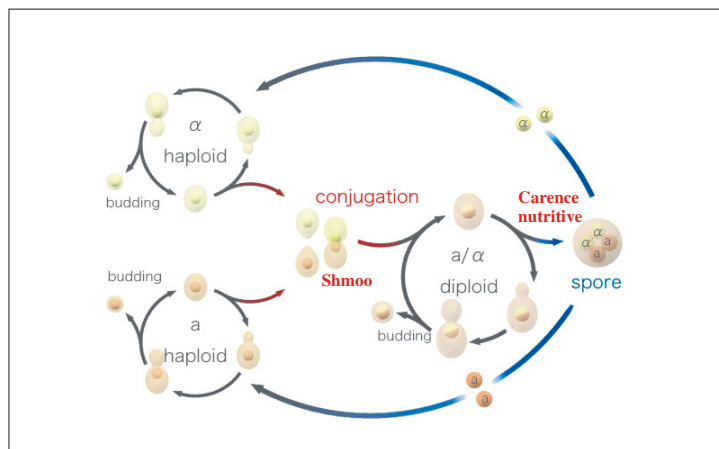


Figure 50 : *Saccharomyces cerevisiae*.

Les cellules de *S.cerevisiae* ont un mode de division assez particulier : le bourgeonnement, c'est pour cette raison que cette levure est nommée "budding yeast". En **a**, on voit parfaitement que le bourgeon est plus petit que la cellule mère; on peut également observer les cicatrices des bourgeonnements précédents. La cellule mère peut se diviser un certain nombre de fois (environ trente) avant de mourir.

En **b**, le cycle sexuel est représenté: Les spores haploïdes issues d'une méiose germent et se reproduisent par divisions mitotiques, tout en produisant un faible niveau de phéromones sexuelles. En présence de partenaire sexuel, elles conjuguent *via* la formation d'un "shmoo" puis d'un zygote a/α qui ne synthétise pas de phéromones. Les cellules diploïdes poursuivent leur reproduction végétative jusqu'à ce qu'une carence nutritive induise l'entrée en phase stationnaire. Un phénomène équivalent se produit dans les cellules haploïdes. Seule une carence sévère induit la méiose dans les cellules diploïdes, qui retournent alors à l'haplophase.

Métabolisme

Saccharomyces cerevisiae peut produire l'énergie (ATP) nécessaire à sa survie et à sa reproduction de deux manières différentes, en fonction du milieu ambiant. Ces deux modes de production d'énergie sont :

- ✚ la respiration, transformation de l'oxygène en gaz carbonique,
- ✚ la fermentation alcoolique du glucose.

La respiration est utilisée en panification : en respirant, les levures dégagent du CO₂ qui fait gonfler les pâtes (levure : agent de « levage »). La fermentation alcoolique est utilisée par l'industrie brassicole et viticole.

Une température de 28 degrés est optimale pour sa division.

Génome

Saccharomyces cerevisiae est également très utilisée comme organisme modèle en biologie cellulaire et en génétique. Ce fut le premier eucaryote dont le génome ait été intégralement séquencé (séquence complète rendue publique en avril 1996). Le génome de *S.cerevisiae* contient 13 millions de paires de bases et 6 275 gènes répartis en 16 chromosomes. On estime que cette levure partage 23 % de son génome avec l'homme.

Sexualité

Chez *S.cerevisiae*, il existe 2 types sexuels appelé Mat a et Mat α . Les cellules haploïdes Mat a ou Mat α , peuvent se diviser par mitose et générer des clones haploïdes. La division s'effectue par bourgeonnement donnant deux cellules de tailles différentes : la cellule mère et la cellule fille. La conjugaison (équivalent à la fécondation) ne peut avoir lieu qu'entre une cellule haploïde Mat a et une cellule haploïde Mat α . La cellule diploïde résultant de la fusion peut aussi se diviser par mitose et ainsi former des clones diploïdes. Lorsque se produit une carence en nutriment, la cellule diploïde effectue une méiose. Celle-ci ne peut se produire que dans une cellule diploïde Mat a / Mat α . Une cellule diploïde produit 4 spores haploïdes empaquetées dans un asque. L'ensemble des 4 spores forme une tétrade (figure 50). C'est pourquoi *S.cerevisiae* est un champignon ascomycètes.

Souches utilisées :

Les souches sauvages que nous utilisons pour ce travail sont :

- ✚ la souche Strong WT [*PSI*+] (74-D694) qui contient le prion [*PSI*+] et dont le génotype est : Mat a, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3-Δ200*, *ura3-52*, *leu2-3, 112* (Bach et al., 2003; Chernoff et al., 1995)

la souche NT64 [URE3] qui contient le prion [URE3] et dont le génotype est Mat α , ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2

Ces souches constituent les souches de références. Toutes les autres souches mentionnées dans le tableau 10 ont été construites lors de ce travail et sont nommées YD (YEAST DEBORAH) suivi d'un numéro. Elles correspondront aux différentes souches construites dont la méthode de construction est expliquée plus loin.

Tableau 10 : Souches de levures utilisées au cours de la thèse.

Nom	Background
ES108	WT: W303-1b; MAT α ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112, trp1-1 ura3-1 can1-100
ES216	W303-1b; MAT α ade2-1 his-11, 15 leu2-3, 112, trp1-1 ura3-1 can1-100 ssa1ts ssa2::LEU2 ssa3::TRP1, ssa4::KanMX
Strong WT [PSI+]	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112
Strong WT [PSI+]	(74-D694) MATalpha, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112
NT64 [URE3]	Mat α , ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2
NT35 [URE3]	Mat a, ade2::KanM, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura2::HIS3, pDal5::ADE2
AB34 [URE3]	Mat a, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3
CC30	MATa, trp1-1, ade2-1, leu 2-3,112, his 11-15, URA2::His3, ure3-0
NT34 a	Mat a, ade2-1, trp1-1, his3-11-15, leu2-3,112, ura2::HIS3, Dal5::ADE2
NT34 α	Mat α , ade2-1, trp1-1, his3-11-15, leu2-3,112, ura2::HIS3, Dal5::ADE2
NT34 a/ α	Mat a/ α , ade2-1, trp1-1, his3-11-15, leu2-3,112, ura2::HIS3, Dal5::ADE2
CC30 ure2 delta	MATa, trp1-1, ade2-1, leu 2-3,112, his 11-15, URA2::His3, ure3-0 ure2 delta (KanMx6)
YEL3	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1
YD1	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN
YD2	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN
YD3	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN, ssa3::TRP1
YD4	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN ssa1::HIS
YD5	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN, ssa3::TRP1 ssa2::LEU2
YD6	MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 ssb2::KAN
YD7	MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 ssa1::HIS
YD8	MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 ssa2::LEU2
YD9	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN, ssa3::TRP1, ssa1::HIS
YD10	Mat a, ade2::KanM, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura2::HIS3, pDal5::ADE2 erg6::TRP1
YD11	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN ssa2::LEU
YD12	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN, ssa3::TRP1, ssa1::HIS, ssa2::LEU PDT1
YD13	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN, ssa3::TRP1, ssa1::HIS, ssa2::LEU PDT2
YD14	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa2::LEU2, ssa1::HIS
YD36	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN ssa1::HIS ssa2::LEU
YD37	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::Kan PDT5
YD38	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN PDT6
YD39	Mat α , ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2 ssa2::LEU
YD40	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 PDT7
YD41	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 CUREE
YD51	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 SSA2-HA
YD52	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 HOR7::HIS
YD53	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 PDT8
YD54	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 PDT9
YD55	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 CUREE-1 PDT8
YD56	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 CUREE-1 PDT9
YD57	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 CUREE-2 PDT8
YD58	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 CUREE-2 PDT9
YD59	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 pSVEN
YD60	MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 ssa2::LEU2 pSVEN
YD61	Mat α , ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2 pSVEN
YD62	Mat α , ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2 ssa2::LEU pSVEN
YD63	Mat α , ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2 ssa2-HA
YD64	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN PDT9
YD65	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssa4::KAN, ssa3::TRP1 ssa2::LEU2 PDT9
YD66	MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 ssa2::LEU2 PDT9
YD67	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 zuo1::HIS5
YD68	MATa, ade1-14, trp1-289,his3 Δ -200, ura3-52, leu2-3, 112, ssb1::TRP1 ssb2::KAN zuo1::HIS5
YD69	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 p416GAL
YD70	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 pDT4
YD71	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 pDT5
YD72	Mat a, ade2::KanM, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura2::HIS3, pDal5::ADE2 zuo1::nat
YD73	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 Wsc1::His5
YD74	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 Eap1::TRP1
YD75	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 GCN2::KanMX
YD76	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 GCN2::HIS5 Erg6::TRP1 PAS ERG6 delta!!!!
YD77	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 Eap1::Nat
YD78	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 GCN2::HIS5
YD79	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 Wsc1::His5 Erg6::Nat (TRP1+)
YD80	YD76-3 (74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 GCN2::HIS5 WSC1::KANmX
YD81	YD76-3 (74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3- Δ 200, ura3-52, leu2-3, 112 GCN2::HIS5 EAP1::NAT

YD82	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	
YD83	G602= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+] ssa2::HIS3	
YD84	G630= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+] ssa1::NEO	
YD85	G632= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+] ssa1::NEO ssa2::HIS3	
YD86	G401= MATalpha ade2-1 SUQ5 kar1 ssa1::NEO ssa2::HIS3 ssa3::TRP1 ssa4::URA3 ura.1 lys2 pRS315-SSA1	
YD87	G402= MATalpha ade2-1 SUQ5 kar1 ssa1::NEO ssa2::HIS3 ssa3::TRP1 ssa4::URA3 ura.1 lys2 pRS316-SSA1	
YD88	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	PKC1::HIS5
YD89	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	RPL14B::Kan clone 1
YD90	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	Pgal(kan)-PKC1
YD91	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	Pgal(kan)-PKC1
YD92	NT34 (2n) / PKC1::kan	
YD93	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	PKC1::kan
YD94	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	PKC1::kan
YD95	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	HAP4-3HA (kan)
YD96	G402= MATalpha ade2-1 SUQ5 kar1 ssa1::NEO ssa2::HIS3 ssa3::TRP1 ssa4::URA3 ura.1 lys2 pRS315-SSA2	
YD101	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS423 clone 1
YD102	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS423 clone 2
YD103	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS423-Fes1-1 clone 1
YD104	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS423-Fes1-1 clone 2
YD105	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS423-Fes1-2 clone 1
YD106	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS423-Fes1-2 clone 2
YD107	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	pRS423 clone 1
YD108	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	pRS423 clone 2
YD109	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	pRS423-Fes1-1 clone 1
YD110	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	pRS423-Fes1-1 clone 2
YD111	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	pRS423-Fes1-2 clone 1
YD112	G600= WT,MATalpha ade2.1 SUQ5 kar1 his3 leu2 trp1 ura3 [PSI+]	pRS423-Fes1-2 clone 2
YD113	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	fes1::HIS5 clone1
YD113	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	fes1::HIS5 clone2
YD114	Mat a/α, ade2-1, trp1-1, his3-11-15, leu2-3,112, ura2::HIS3, Dal5::ADE2 ure2::TRP1 clone 4	
YD114	Mat a/α, ade2-1, trp1-1, his3-11-15, leu2-3,112, ura2::HIS3, Dal5::ADE2 ure2::TRP1 clone 6	
YD115	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pNOY102 clone1
YD115	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pNOY102 clone2
YD115	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pNOY102 clone3
YD116	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pNOY102 clone1
YD116	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pNOY102 clone2
YD116	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pNOY102 clone3
YD117	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pNOY102 RRN3::kanMX clone 1
YD117	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pNOY102 RRN3::kanMX clone A
YD117	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pNOY102 RRN3::kanMX clone C
YD118	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pNOY102 RRN3::kanMX clone 4
YD118	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pNOY102 RRN3::kanMX clone 5
YD118	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pNOY102 RRN3::kanMX clone 6
YD119	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	pRS416
YD120	Mat α, ade2-1, trp1-100, his3-11-15, leu2-3,115, ura3-1, pDal5::ADE2	pRS416
YD121	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	CUREE pRS416
YD122	(74-D694) MATa, ade1-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3, 112	CUREE pNOY102
YD123	K699/pRS416 clone 1	
YD123	K699/pRS416 clone 2	
YD124	K699/pNOY102 clone 1	
YD124	K699/pNOY102 clone 2	
YD125	Mat a, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3	pRS424 clone 1
YD125	Mat a, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3	pRS424 clone 2
YD126	Mat a, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3	pNOY200 clone 1
YD126	Mat a, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3	pNOY200 clone 2

I.3.2 Escherichia Coli

La souche que nous avons utilisée pour les clonages plasmidiques est TOP10.

I.3.3 Cerveau de porc

Les cerveaux de porc sont issus d'un abattoir local (Louis Gad SA) puis immédiatement pesés, broyés, soniqués et homogénéisés afin d'obtenir des extraits protéiques.

I.3.4 Lignée de cellules ROV et MOV

🚩 Cellules ROV : Lignée de cellules épithéliales de lapins transgéniques exprimant la PrP ovine de façon inductible, par la doxycycline (Vilette et al., 2001).

- Cellules MOV : Lignée de cellules neurogliales issues de la racine dorsale des ganglions de souris transgéniques, exprimant la PrP ovine de façon constitutive (Archer et al., 2004).

II. Méthodes

II.1 Milieux de cultures et Conditions de cultures

II.1.1 Pour les levures

La croissance des levures est réalisée soit en milieu riche YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) soit en milieu minimum SD (Synthetic Dextrose). Ce dernier peut être supplémenté en bases azotées (adénine 40mg/ml et uracile 20mg/ml) et en acides aminées pour compléter des auxotrophies (de 20 à 50 mg/ml selon l'acide aminé).

Leurs compositions exactes pour 1 Litre de milieu sont les suivantes :

- YPD : 10 g d'extrait de levure, 20 g de glucose et 10 g de peptone.
- SD : 6.7 g de "Yeast nitrogen base without amino acid" et 20 g de glucose.

Pour les milieux solides, 20 g/L d'agar sont additionnés.

Après autoclavage pendant 20 minutes à 120°C, les milieux peuvent être coulés si c'est pour des cultures solides ou bien être utilisés tel quels pour des cultures liquides. Les acides aminés et base azotées nécessaires sont ajoutés afin de réaliser des milieux auxotrophes pour des acides aminés bien déterminés. Les drogues 6AP et GuHCl (200 µM final à partir d'un stock 300 mM) sont ajoutés dans les milieux YPD pour réaliser les tests de sensibilités.

Les levures sont cultivées à 30°C aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Dans ce dernier cas, une agitation à 220 rpm est nécessaire pour l'oxygénation.

II.1.2 Pour les bactéries

Les bactéries sont cultivées dans le milieu LB contenant 25 g/L de Luria Broth Base. Pour les milieux solides, 20 g/L d'agar sont additionnés. Après autoclavage pendant 20 minutes à 120°C, le marqueur de sélection approprié est ajouté : 100 mg/L d'ampicilline, 34 mg/L de chloramphénicol ou 50 mg/L de kanamycine. Les bactéries sont cultivées à 37°C aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Dans ce dernier cas, une agitation à 220 rpm est nécessaire pour l'oxygénation.

II.1.3 Pour les cellules mammifères MOV et ROV

- ✚ Cellules MOV : Mélanger $\frac{3}{4}$ de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) avec $\frac{1}{4}$ de F12 puis ajouter 10% SVF et de la pénicilline/Streptomycine 1000X.

Les cellules sont maintenues en culture à 37°C avec un pourcentage de 6% de CO₂ dans le milieu décrit ci-dessus puis diluées au 1/10 toutes les semaines.

- ✚ Cellules ROV : Mélanger à du milieu EMEM 10% de SVF, pénicilline/Streptomycine 1000X et de la glutamine 100X.

Les cellules sont maintenues en culture à 37°C avec un pourcentage de 6% de CO₂ dans le milieu décrit ci-dessus puis diluées au 1/4 toutes les semaines. Pour induire l'expression de la PrP ovine, les cultures sont traitées avec 1µg/ml de doxycycline (DOX).

II.2 Mesure de la croissance

Un spectrophotomètre d'absorption permet d'estimer la concentration cellulaire à une longueur d'onde de 600 nm.

Pour les levures : pour une densité optique de 1, on considère généralement qu'il y a environ $2 \cdot 10^7$ cellules haploïdes/ml et $1 \cdot 10^7$ cellules diploïdes/ml.

Pour les bactéries : pour une densité optique de 1, on considère généralement qu'il y a environ $2 \cdot 10^8$ cellules/ml.

II.3 Méthodes relatives à *Saccharomyces cerevisiae*

II.3.1 Les acides nucléiques

II.3.1.1 Extraction rapide de l'ADN génomique

- ✚ « Propre »

5 ml de culture sont centrifugés 5 minutes à 5 000 rpm et le culot est resuspendu dans 1 ml de TE 1X. Centrifuger 1 minute et enlever le surnageant ; cette étape permet de retirer toutes traces résiduelles de milieu. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 200 µl de tampon de lyse (pour 10 ml : 200 µl de triton X100, 1 ml de SDS 10%, 200 µl de NaCl 5M, 100 µl de Tris HCl 1 M pH8 et 20 µl EDTA 500 mM pH8), 200 µl de biophénol et 300 µl de billes de verres. Le tube est vortexé à vitesse maximale durant 4 minutes puis 200 µl de TE 1X est ajouté. Vortexer à nouveau 30 secondes. Le tube est centrifugé 4 minutes à 13 000 rpm à 4°C durant 5 minutes et la phase aqueuse est transférée dans un tube propre. L'ADN est précipité avec 0.1 M de NaOAc et 1 ml d'éthanol 100% froid. Le tout est mélangé par inversion puis

centrifugé 3 minutes à 13 000 rpm à 4°C. 1ml d'éthanol froid est ajouté sur le culot puis une nouvelle centrifugation est effectuée. Le culot est resuspendu dans 50 µl d'eau stérile.

✚ Très rapide pour effectuer des PCR de vérification (PCR sur cellules)

Une « anse de cellules » est resuspendue dans 200 µl d'eau stérile, un volume de billes de verres et 300 µl de phénol. Le tout est vortexé 2 minutes puis centrifugé 5 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. 200 µl de chloroforme-alcool isoamylique sont ajoutés afin de vortexer 30 secondes et centrifuger 5 minutes. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube puis conservé à -20°C.

II.3.1.2 Extraction des ARN totaux

Lorsque la densité optique des levures atteint 1, 20 ml de culture sont centrifugés, puis le culot est stocké à -80°C. Après décongélation, les cellules sont resuspendues dans 500 µl de tampon AE (50 mM Acétate de sodium 3M pH 5.3, 10 mM EDTA 0.5M) et 50 µl de SDS 10 % puis vortexées. Un volume de 500 µl de phénol (pH acide, 0.1 % 8-hydroxyquinolone) équilibré dans le tampon AE est ajouté. Le tout est vortexé 3 fois 20 secondes avec passages de 20 secondes dans la glace. Le tube est mis à incuber à 65°C pendant 4 minutes. Les cellules sont ensuite congelées dans un mélange Ethanol-carboglance pendant 2 minutes puis laissées à décongeler lentement à température ambiante pour ensuite être centrifugées à 14 000 rpm pendant 4 minutes, à température ambiante. 450 µl de la phase aqueuse sont prélevés, auquel est ajouté le même volume de Phénol-Chloroforme Isoamylique puis vortexés 3 fois 20 secondes, à température ambiante. Après une seconde centrifugation, 350 µl de la phase aqueuse sont prélevés. La dernière étape est la précipitation des ARN, par l'ajout d'1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 5.3 et de 2.5 volumes d'éthanol absolu et de l'incubation à -80°C au minimum 30 minutes. Après une centrifugation à 14 000 rpm, à 4°C pendant 30 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol 80 % stocké à -20°C. Le culot est séché au speed-vac et repris dans 20 µl d'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate). Enfin la concentration en ARN est estimée par la mesure de la densité optique à 260 nm (une DO de 1 correspond à 40 µg/ml) et sa pureté par le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm (il doit être proche de 2).

II.3.2 Mutagenèse en levure : Délétion d'un gène

II.3.2.1 Choix des amorces

Deux couples d'amorces doivent être synthétisés : un premier, pour construire la cassette de délétion et un second, pour vérifier après transformation si les levures sont bien mutées pour le gène d'intérêt (figure 48).

II.3.2.2 Construction de la cassette de délétion

Nous avons en notre possession tous les plasmides de Mark S. Longtine (longtine, 1998, yeast) (figure 51). Ces derniers permettent, soit de construire des cassettes de délétion à l'aide des plasmides possédant un marqueur de sélection avec de part et d'autre des séquences F1 et R1 constantes, soit de tagger un gène avec GFP, 3HA, Myc ou GST avec les quatre plasmides suivants ou encore de mettre un gène sous un promoteur Gal avec les constructions suivantes ayant des marqueurs de sélection différents.

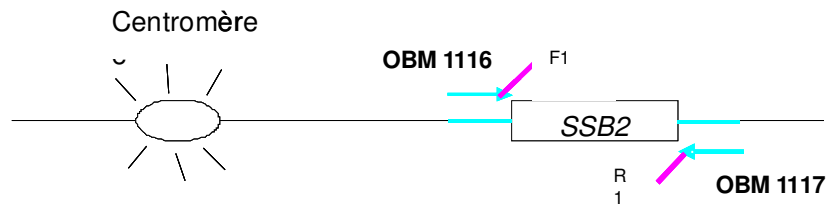
Pour construire une cassette de délétion, il suffit de commander deux amorces, une d'environ 50 nucléotides en partant en amont du 5' de l'ORF du gène et la seconde d'environ 50 nucléotides en partant de l'extrémité 3' de l'ORF ; il ne reste plus qu'à ajouter la séquence F1 en 3' de l'amorce 1 et la séquence R1 en 3' de l'amorce 2.

Pour finir, une réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est réalisée avec les deux amorces (25 pmol chaque), le plasmide d'intérêt (1 à 100 ng), les dNTP (5 mM chaque), l'enzyme Taq polymérase (Roche) et son tampon, le tout dans un volume final de 50 µl. L'amplification est réalisée dans un thermocycler en utilisant différents programmes :

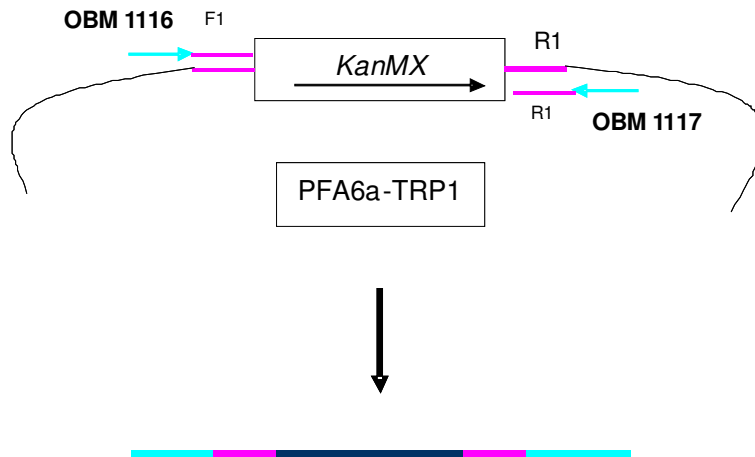
5 min à 95°C		durant 1 cycle
30 sec à 95°C	Dénaturation	durant 30 cycles
30 sec à 50°C	Hybridation	
1 min par kb à 72°C	Elongation	
10 min à 72°C		durant 1 cycle

Le produit de PCR est ensuite déposé sur gel pour vérifier qu'il est bien amplifié et qu'il est à la bonne taille.

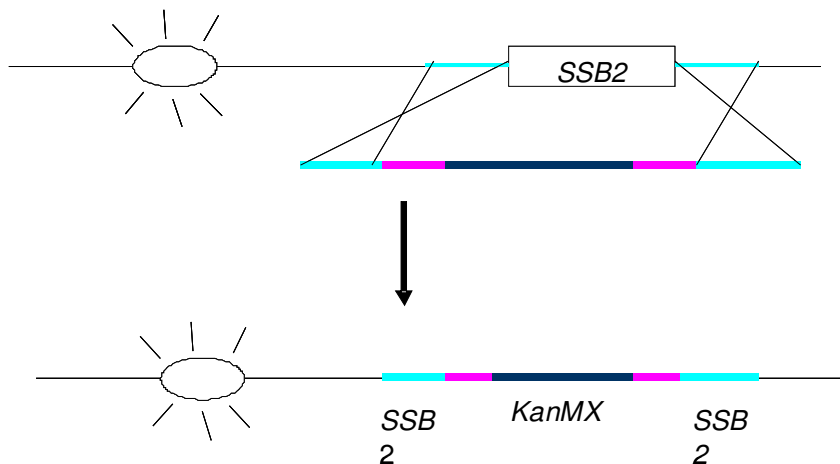
- 1- Choix des amorces : 1- séquence homologue aux 60 paires de bases juste avant l'ATG suivi de la séquence F1 2- séquence homologue aux 60 paires de bases juste après le codon stop suivi de la séquence R1.



- 2- Amplification de la cassette de délétion par PCR via les amorces OBM 1116/OBM 1117 et le plasmide PFA6a-TRP1



- 3- Transformation dans les levures YEL3 ($SSB1\Delta$) sur un milieu contenant de la Kanamycine: recombinaison entre les séquences homologues des fragments de gène *SSB2*



- 4- Vérification de la bonne insertion de la cassette de délétion via les amorces OBM 1118/OBM 1119

Figure 51 : Les différentes étapes de délétion d'un gène de levure.

II.3.2.3 Transformation

Voir ci-dessous

II.3.2.4 Vérification

La vérification se fait à l'aide du deuxième couple d'amorces : les deux amorces ont une longueur d'environ 20 nucléotides. La première amorce est située à environ 300 nucléotides de l'ORF, en 5' et la seconde amorce se situe à environ 300 nucléotides de l'ORF, en 3'. La vérification nécessite une PCR sur cellules avec les deux amorces, l'ADN génomique, les dNTP, l'enzyme et le tampon.

Pour vérifier que le produit de PCR est bien à la bonne taille, il est déposé sur un gel agarose, avec en parallèle, un contrôle où le gène d'intérêt n'a pas été délété. S'il est à la taille attendue, notre mutant est construit.

II.3.2.5 Stockage en glycérol

D'une culture de 5 ml lancée sur la nuit, est pris 500 µl auquel nous ajoutons 500 µl de glycérol 70%. Le tout est congelé en microtubes à -80°C.

II.3.2.6 Exemple d'obtention d'un « mutant »

Les autres seront décrits dans le matériel et méthodes des articles.

YD1 : Le mutant YD1 contient la double mutation *SSB1*, *SSB2*. Comme tous les mutants de délétion, il a été obtenu à partir d'un plasmide de la série PFA6a de Longtine. Pour YD1 le plasmide PFA6a-TRP1 a été amplifié avec les amorces OBM 1116/OBM 1117. Les levures YEL3 contenant la mutation *SSB1*Δ ont été transformées par le produit d'amplification contenant le marqueur de sélection KanMX avec de part et d'autre les séquences homologues au gène *SSB2*. Ainsi, après recombinaison homologue le gène sauvage *SSB2* sera remplacé par la cassette de délétion. On obtiendra notre souche double délétée pour les gènes *SSB1* et *SSB2* : YD1. Elle sera utilisée pour des tests de sensibilités : voir l'effet des drogues sur ces souches délétées.

II.3.3 Transformation des levures

Méthode Acétate de Lithium/ PEG : **La première étape** consiste à rendre les levures compétentes. Pour cela 50 ml d'une culture de levure de densité optique située entre 0.5 et 1

sont centrifugés 5 minutes à 3000 g à température ambiante. Le culot est repris dans 1 ml de LiAc-mix (10% LiAc 1M, 10% TE 10X et 80% d'H₂O) puis centrifugé 1 minute à 3000 g. Le culot est resuspendu à nouveau dans 500 µl de LiAc-mix. Les cellules sont maintenant compétentes et aptes à la transformation ou bien peuvent être stockées dans 7% DMSO à -80°C. **La deuxième étape** consiste à incorporer un morceau d'ADN plasmidique ou génomique dans les levures compétentes. Pour cela, à 80 µl de cellules, sont ajoutés 1-2 µl de plasmides (pour l'expression de protéines) ou 10 µl de cassette de délétion (pour la construction de mutant de délétion), 8 µl d'ADN transporteur (ADN de sperme de saumon) et 500 µl de PEG-mix (pour 100 ml, 40 g de Polyethylene glycol 4000 et 100 ml de LiAc-mix). Le tout est incubé sur la roue à température ambiante durant 30 minutes puis un choc thermique à 42°C est effectué durant 15 minutes. Le tube est centrifugé 2 minutes à basse vitesse, 3000 rpm à température ambiante et le culot est repris dans 150 µl de milieu riche YPD pendant 20 minutes (3 heures lorsque le marqueur de sélection est la kanamycine et que les cellules transformées sont étalées sur un milieu avec kanamycine). Les cellules sont ensuite étalées sur le milieu approprié permettant de sélectionner les cellules ayant bien incorporé l'ADN transformé. Enfin, les boîtes sont mises à incubées à 30°C pour deux-trois jours.

II.3.4 Microscopie à fluorescence

Les observations microscopiques à fluorescence sont réalisées avec un microscope BX61 Olympus à épifluorescence équipé d'un objectif à immersion X60 et du filtre chroma GFP4 (excitation 455-495 nm). Les images sont capturées avec une caméra refroidie Spot RT et analysées par Photoshop (Adobe) (Blondel et al., 2005).

II.4 Méthodes relatives à *Escherichia Coli*

II.4.1 Clonage

But : Cloner un gène dans un plasmide afin de l'exprimer en bactérie pour en avoir de grandes quantités.

II.4.1.1 Choix des amorces

La première est constituée de 20 nucléotides située soit directement en amont de l'ORF (si nous voulons le gène sous un promoteur du plasmide) soit 400 nucléotides en amont de l'ORF (si nous voulons le gène avec son propre promoteur) et la seconde amorce est constituée de 20

nucléotides située directement en aval du gène. En 5' de ces amorces sont ajoutées les séquences spécifiques des sites de restrictions correspondant aux sites de restrictions du plasmide à l'endroit d'incorporation de gène d'intérêt. Cinq-six nucléotides sont additionnés en amont de chaque amorce afin de faciliter la restriction.

II.4.1.2 PCR pour amplifier la construction

Dans le mélange réactionnel sont présents : l'ADN de levure, les deux amorces, les dNTP, l'enzyme Long Expand (faisant du « proofreading » c'est-à-dire qu'elle relie derrière elle s'il n'y a pas d'erreur lors de l'amplification) et son tampon.

II.4.1.3 Purification des produits de PCR

Cette purification est réalisée à l'aide du kit Qiagen.

II.4.1.4 Digestion enzymatique

But : Digérer le produit de PCR et le vecteur par le même couple d'enzymes afin de les « ligaturer ».

Digestion de l'ADN : 20 µl de produit de PCR + 20 µl d'H₂O stérile + 5 µl de tampon + 2.4 µl de l'enzyme 1 + 2.4 µl de l'enzyme 2.

Digestion du vecteur : 1 µl de vecteur + 39 µl d'H₂O stérile + 5 µl de tampon + 2.4 µl de l'enzyme 1 + 2.4 µl de l'enzyme 2.

Le tout est incubé 2-3 heures à 37°C (la température, dépendant de l'enzyme).

II.4.1.5 Purification des bandes sur gel d'agarose

Sur un gel agarose 1% très épais, les 50 µl de digestion repris avec 6 µl de bleu sont déposés. Les bandes sont découpées sous Ultra-Violets et la purification se fait à l'aide du kit Qiagen.

II.4.1.6 Ligation

But : Relier le fragment de PCR avec le vecteur digéré avec les mêmes enzymes de restriction que le fragment de PCR.

La ligation s'effectue dans un volume final de 15 µl et à 16°C sur la nuit.

Le mélange réactionnel est composé de 11 µl de fragment PCR digéré et purifié, 1.5 µl de plasmide digéré et purifié, 1 µl de T4 DNA ligase et 1.5 µl de son tampon. Le résultat de la ligation est vérifié en déposant 5 µl sur gel agarose 1%. Si la réaction a bien fonctionné, une échelle de ligation doit apparaître.

II.4.1.7 Transformation dans les bactéries compétentes

But : Introduire le produit de ligation (insert-vecteur) dans la bactérie afin qu'il soit amplifié.

La transformation des bactéries est réalisée à partir de bactéries compétentes par électroporation selon la méthode décrite dans le manuel *Molecular Cloning de Sambrook, Fritsch & Maniatis* (Maniatis et al., 1989).

A la fin de l'électroporation, les cellules transformées sont étalées sur un milieu solide LB contenant l'antibiotique approprié (généralement l'ampicilline puisque le plasmide contient un gène de résistance à ce dernier) puis incubées à 37°C sur la nuit.

II.4.1.8 Passage en milieu liquide

But : Se procurer une grande quantité de cellules

1 colonie bien isolée est ensemencée dans 4 ml de LB additionnée avec de l'ampicilline et est incubée à 37°C sous agitation.

II.4.1.9 Mini-prep

But : Récupérer la construction (plasmide-insert) amplifiée dans la bactérie.

Cette étape se réalise à l'aide du kit Qiagen.

II.4.1.10 Vérification par digestion enzymatique

But : Vérifier si notre construction est bonne.

Le mélange réactionnel se fait dans un volume final de 10 µl : 0.2 µl d'enzyme 1, 0.2 µl d'enzyme 2, 1 µl de tampon, 7.6 µl d'H₂O et 1 µl d'ADN. L'incubation est réalisée généralement à 37°C (selon les enzymes) durant 5 minutes à 1 heure. Enfin les 10 µl de digestion sont déposés sur un gel agarose 1 %. Si la construction est bonne, elle peut par exemple être transformée dans la levure ou être stockée à -20°C sous un nom PDT X (Plasmid Déborah Tribouillard X). Les vecteurs construits et utilisés sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Plasmides utilisés au cours de ce travail.

Nom	Background
PDT1	Exprimant le plasmide P416 digéré par B/H et contenant l'insert ssa1 ^{ts} PCyc1-SSA1 ^{ts}
PDT2	Exprimant le plasmide P416 digéré par Sac1/H et contenant l'insert ssa1 ^{ts} ownP-SSA1 ^{ts}
PDT3	Exprimant le plasmide P416 digéré par BamH1/H et contenant l'insert ssa1 PGAL1-SSA1
PDT4	Exprimant le plasmide P416 digéré par BamH1/H et contenant l'insert ssa2 PGAL1-SSA2
PDT5	Exprimant le plasmide P416 digéré par BamH1/H et contenant l'insert ssb1 PGAL1-SSB1
PDT6	Exprimant le plasmide P416 digéré par BamH1/H et contenant l'insert ssb2 PGAL1-SSB2
PDT7	Exprimant le plasmide PBM360 digéré par BamH1/EcoR1 et contenant l'insert Sup35-NM-GFP CYC1
PDT8	Exprimant le plasmide PBM360 digéré par BamH1/EcoR1 et contenant l'insert Sup35-NM-GFP ADH
PDT9	Exprimant le plasmide PBM360 digéré par BamH1/EcoR1 et contenant l'insert Sup35-NM-GFP TEF
PDT10	pSven: HetS-GFP
PDT11	Exprimant le plasmide P416 digéré par BamH1/E et contenant l'insert SUP35NM
PDT12	Exprimant le plasmide P416 digéré par BamH1/E et contenant l'insert ZUO1
PDT13-1	Pssa2 (prs315) résistant à la cure
PDT13-2	Pssa2 (prs315) résistant à la cure
PDT13-1	pRS423-1
PDT13-2	pRS423-2
PDT14-1	pRS423-FES1 1-1
PDT14-2	pRS423-FES1 1-2
PDT15-1	pRS423-FES1 2-1
PDT15-2	pRS423-FES1 2-2
PDT16	pET-21a het-s
PDT17	pET-21a het-S
PDT18	pET-24a het-S

II.4.2 Construction des vecteurs

II.4.2.1 PDT1 (figure 52)

Ce vecteur contient le gène *SSA1* thermosensible sous le promoteur constitutif CYC1.

Il permet d'exprimer la protéine Ssa1p thermosensible de façon constitutive dans des mutants contenant la quadruple mutation létale, *SSA1Δ*, *SSA2Δ*, *SSA3Δ*, *SSA4Δ* afin d'avoir une souche viable. Pour l'obtenir, une PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique d'une souche sauvage ES216 contenant le gène *SSA1* thermosensible *ts* avec les amorces OBM 1137 et OBM 1138 pour amplifier le gène *SSA1ts* avec en 5' le site de restriction BamH1 et en 3' le site de restriction HindIII. Les produits de PCR ainsi que le vecteur P416 CYC1 ont été digérés par les enzymes de restriction BamH1 et HindIII puis le fragment de PCR a été cloné dans le vecteur « ouvert » afin d'obtenir PDT1.

II.4.2.2 PDT2 (figure 53)

Ce vecteur contient le gène *SSA1* thermosensible sous son propre promoteur. Il a la même utilisation que PDT1. Pour l'obtenir, une PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique d'une souche sauvage ES216 contenant le gène *SSA1* thermosensible *ts* avec les amorces OBM 1136 et OBM 1137 pour amplifier le gène *SSA1ts* avec en 5' le site de restriction *SacI* et en 3' le site de restriction *HindIII*. Les produits de PCR ainsi que le vecteur P416 *CYC1* ont été digérés par les enzymes de restriction *SacI* et *HindIII* puis le fragment de PCR a été cloné dans le vecteur « ouvert » afin d'obtenir PDT2.

II.4.2.3 PDT3, PDT4, PDT5 et PDT6

Ces vecteurs contiennent respectivement les gènes *SSA1*, *SSA2*, *SSB1* et *SSB2* sous le promoteur inductible *GAL1*. Ils permettent de surexprimer ces gènes dans une souche *StrongWT* contenant le prion [*PSI+*] afin de voir l'effet de leur surexpression sur la cure des prions par nos drogues. Pour les obtenir, une PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique d'une souche sauvage *Strong WT* avec respectivement, les amorces OBM 1138/OBM 1137, OBM 1160/OBM 1161, OBM 1162/OBM 1163, OBM 1162/OBM 1164 pour amplifier les gènes avec en 5' le site de restriction *BamHI* et en 3' le site de restriction *HindIII*. Les produits de PCR ainsi que le vecteur P416 *GAL1* ont été digérés par les enzymes de restriction *BamHI* et *HindIII* puis les fragments de PCR ont été clonés dans le vecteur « ouvert » afin d'obtenir PDT3, PDT4, PDT5 et PDT6.

II.4.2.4 PDT7

Ce vecteur contient le domaine prion NM (acide aminée 1 à 254) du gène *SUP35* fusionné au marqueur de fluorescence « *Green Fluorescent Protein* », GFP et mis sous le promoteur constitutif faible *CYC1*. Il permet d'exprimer ces gènes dans une souche *StrongWT* contenant le prion [*PSI+*] afin de visualiser au microscope à fluorescence l'effet de nos drogues sur l'agrégation des protéines prion. Pour l'obtenir, une PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique d'une souche sauvage *Strong WT* avec les amorces OBM 1064/OBM 1166 pour amplifier les gènes avec en 5' le site de restriction *BamHI* et en 3' le site de restriction *EcoRI*. Les produits de PCR ainsi que le vecteur pBM360 contenant le gène *HOF1* fusionné à la GFP et mis sous le promoteur *CYC1*, ont été digérés par les enzymes de restriction *BamHI*

et EcoR1 puis les fragments de PCR ont été clonés dans le vecteur « ouvert » afin d'obtenir PDT7.

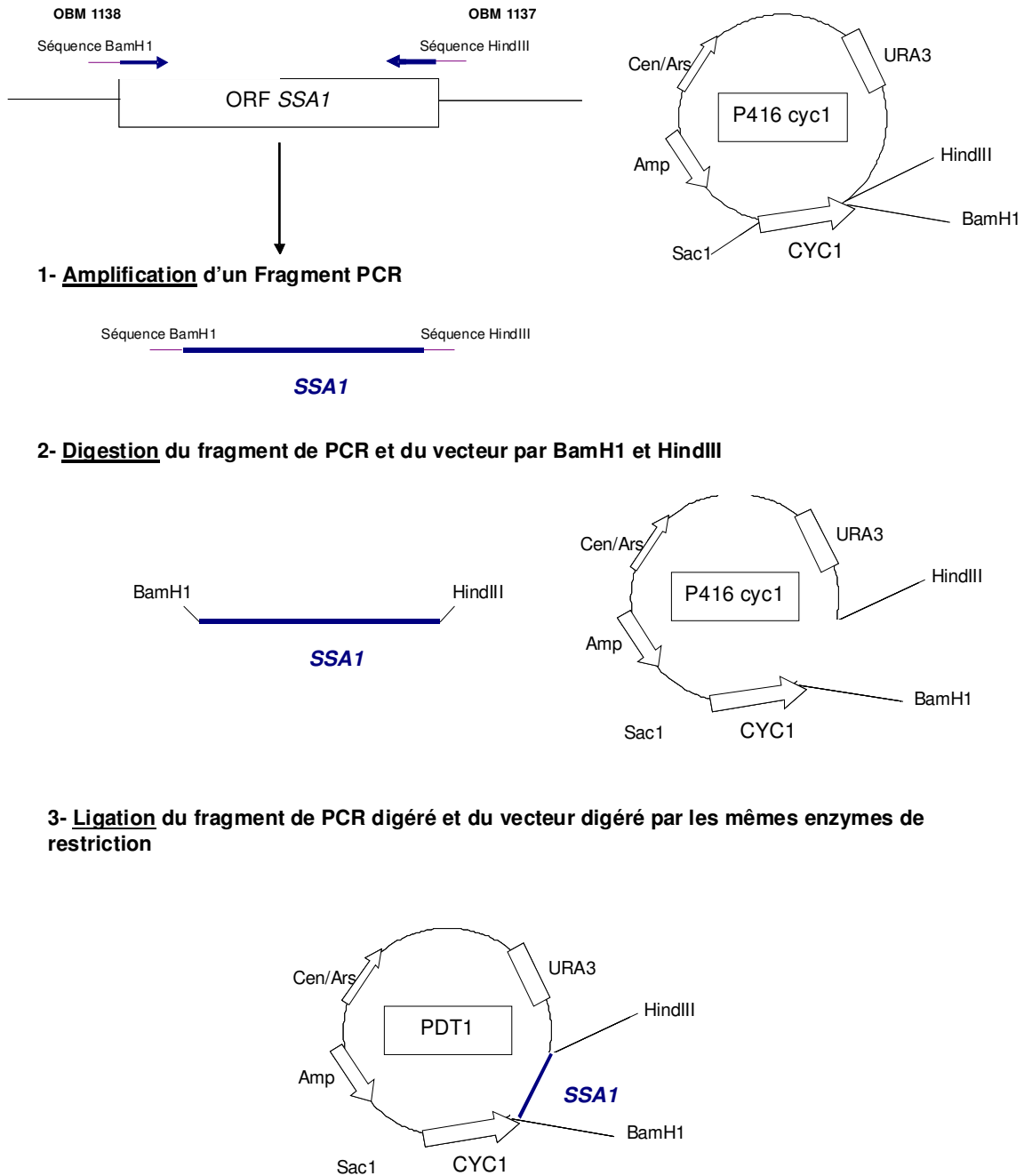
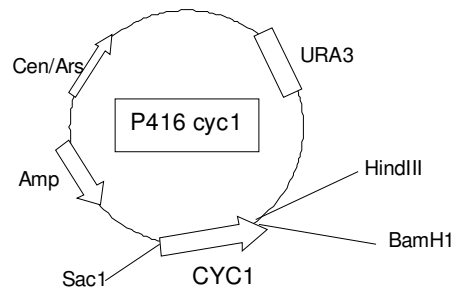
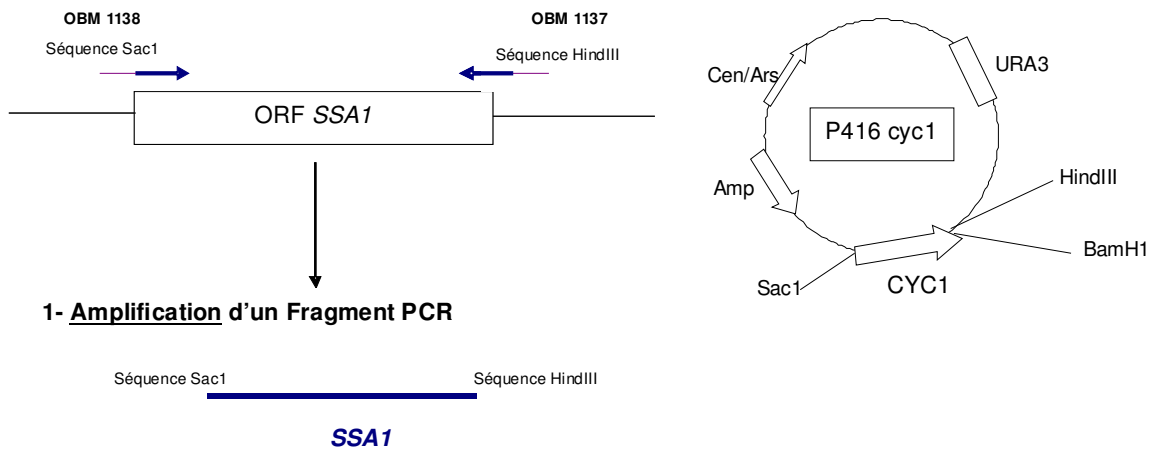
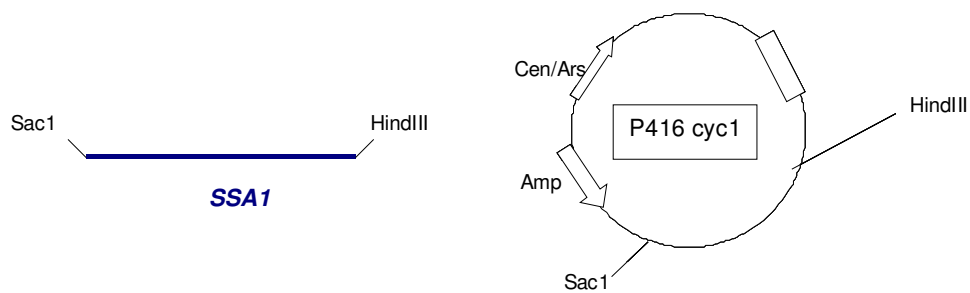


Figure 52 : Construction du vecteur PDT1.



2- Digestion du fragment de PCR et du vecteur par Sac1 et HindIII



3- Ligation du fragment de PCR digéré et du vecteur digéré par les mêmes enzymes de restriction

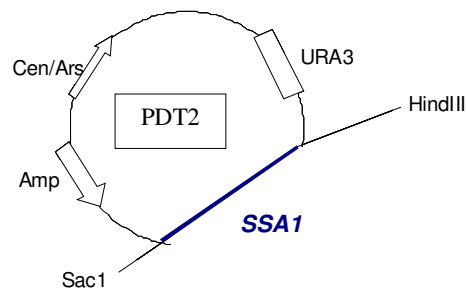
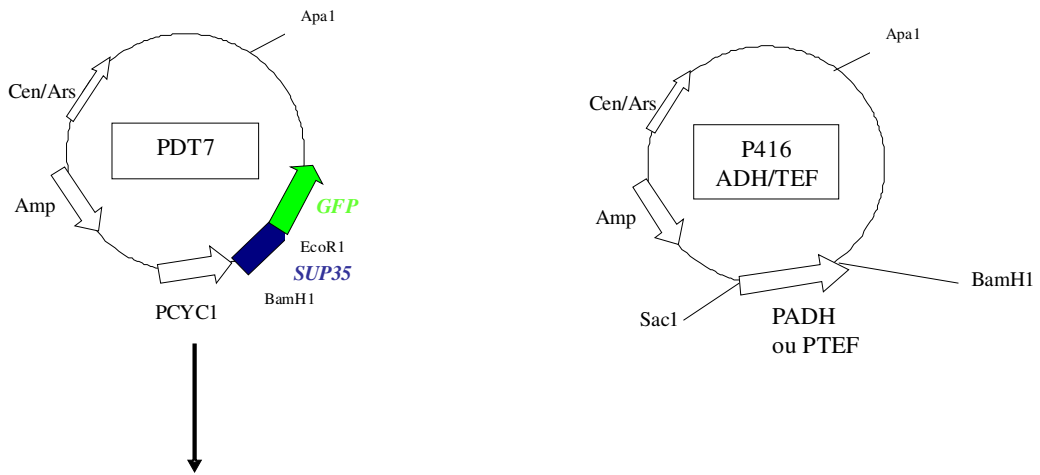
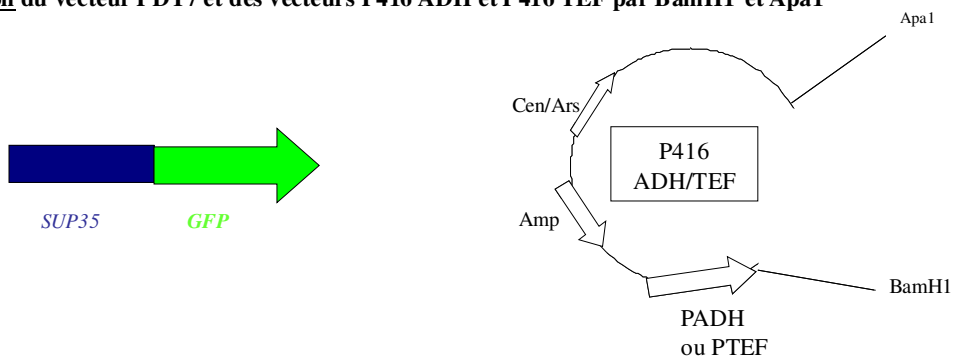


Figure 53 : Construction du vecteur PDT2.



1- Digestion du vecteur PDT7 et des vecteurs P416 ADH et P416 TEF par BamH1 et Apa1



2- Ligation fragment libéré des vecteurs « ouverts » par les mêmes enzymes de restriction

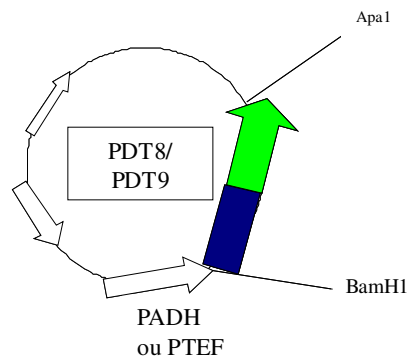


Figure 54 : Construction des vecteurs PDT8 et PDT9.

II.4.2.5 PDT8 et PDT9 (figure 54)

Ces vecteurs contiennent comme PDT7 le domaine prion NM (acide aminée 1 à 254) du gène *SUP35* fusionné au marqueur de fluorescence « *Green Fluorescent Protein* », GFP et mis respectivement sous le promoteur constitutif moyennement fort ADH et le promoteur constitutif fort TEF. Ils ont la même utilisation que PDT7 mais ce dernier n'exprimait pas assez fort la protéine prion. Pour les obtenir, un sous clonage a été réalisé : Le vecteur PDT7 ainsi que les vecteurs P416 ADH et P416 TEF ont été digérés par les enzymes de restriction BamH1 et Apa1 puis les fragments de digestion clonés dans les vecteurs « ouverts » afin d'obtenir PDT8 et PDT9.

II.5 Méthodes générales de biochimie

II.5.1 Les Protéines

II.5.1.1 Extractions

❖ Extraction des protéines de levures : « propre »

2 méthodes :

- **Lyse à l'aide de billes de verre** : Une culture de 50 ml de DO située entre 0.5 et 1 est centrifugée 5 minutes à 3000 rpm puis le surnageant est retiré. Pour un volume de cellules, un volume de tampon (300 µl) (25 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0.2% Triton et 1 mM PMSF) est ajouté, afin de resuspendre puis environ deux volumes de billes de lyse sont ajoutés. Six séries de vortex de 30 secondes entrecoupées de 30 secondes dans la glace sont réalisées. Puis un volume de tampon (300 µl) est rajouté. Le tout est centrifugé 3 minutes à 13 000 rpm à 4°C pour éliminer les billes ainsi que les débris cellulaires. Récupérer le surnageant et doser les protéines par un Bradford.

- **Lyse par la Presse de French** : Elle permet d'extraire les protéines grâce à de fortes pressions qui broient les levures. Une culture de levure de 50 ml est centrifugée 5 minutes à basse vitesse, 3000 rpm puis le culot est repris dans 1 ml de PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases (Mini complete de roche). Le liquide est ensuite placé dans la presse de French puis une pression de 2,8 bars est exercée. Les protéines peuvent être récupérées puis dosées.

❖ **Extraction rapide des protéines de levure en vue d'analyse sur Western-Blot**

Lorsqu'une culture de 5 ml a atteint une densité optique d'environ 0.7, trois millilitres de cette culture sont centrifugés à basse vitesse, 3 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est incubé 5 minutes sur la glace puis resuspendu dans 150 µl d'une solution contenant 73.9% d'H₂O, 18.5% de NaOH 10M et 7.6% de β-mercaptoethanol. Le tube est incubé 10 minutes sur la glace, puis 150 µl d'une solution contenant 50% d'H₂O et 50% de TCA 100% sont ajoutés ; une seconde incubation 10 minutes dans la glace est réalisée. Le tube est centrifugé 2 minutes à 4°C et le culot est lavé avec 1 ml d'acétone. Après une dernière centrifugation le culot est repris dans 100 µl de bleu de charge, Laemmli 2X (2 µl de Tris-HCl pH 7.5 sont ajoutés si le mélange devient vert, trop acide). L'échantillon est dénaturé 5 minutes à 95°C puis centrifugé rapidement pour être soit déposé sur un gel SDS-PAGE ou soit stocké à -20°C.

II.5.1.2 Analyses des protéines

❖ **Dosage des protéines**

Le dosage des protéines est réalisé par la technique de Bradford à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad) selon les indications du fournisseur.

❖ **Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide**

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, 10% SDS. Les gels précoulés et le système de migration proviennent du fournisseur Invitrogen (NuPAGE- 1 mm d'épaisseur). Les échantillons qui sont repris dans le bleu de charge Invitrogen sont déposés sur le gel et l'électrophorèse est réalisée à voltage constant (200 V) pendant 45 minutes en tampon MOPS.

❖ **Western-blot : Immunodétection de protéines d'intérêts**

Le transfert des protéines se fait sur une membrane de nitrocellulose 0.45 µm (Schleicher and Schuell) par transfert liquide puis la membrane est incubée 1 heure à température ambiante sous agitation dans une solution de saturation (5% de lait écrémé en poudre). La membrane est ensuite incubée 1 heure dans une solution TBS contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt avant d'être lavée 5 fois, 5 minutes dans du tampon TBS. La membrane est alors placée sous agitation dans une solution TBS contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à une peroxydase avant d'être à nouveau lavée 5 fois, 5

minutes dans du tampon TBS. La révélation est effectuée avec une solution d'ECL (ECL, Amersham) suivi d'une analyse par le phosphoimager Chemistart 5000 de chez Vilber-Lourmat.

❖ **Coloration au bleu**

Après l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide est rincé trois fois 5 minutes dans l'eau, puis incubé 1 heure dans la solution de Coomassie de Biorad puis décoloré 1 heure dans de l'eau.

❖ **Coloration à l'argent**

Une coloration à l'argent est beaucoup plus sensible qu'une coloration au bleu.

Après l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide subit différents traitements suivant les indications du kit de chez Roche.

❖ **Identification des protéines par spectrométrie de masse**

Les bandes intéressantes révélées sur les gels colorés à l'argent et au bleu sont découpées puis digérées dans un gel tryptique comme décrit (Shevchenko et al., 1996). L'analyse et l'interprétation furent réalisées par Innova Proteomics (Rennes, France).

II.6 Méthodes peu communes et originales m'ayant suivies tout au long de cette thèse

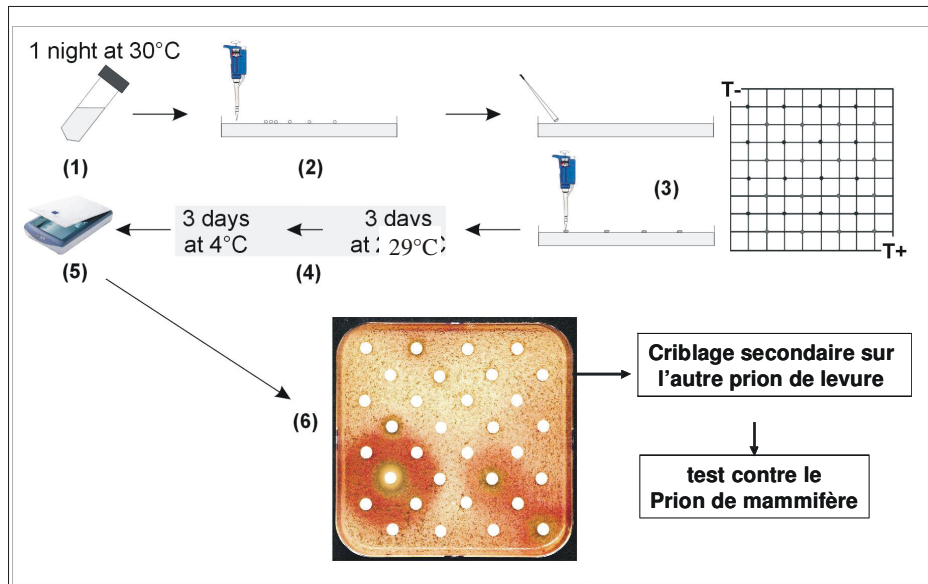
II.6.1 Test de sensibilité

II.6.1.1 Principe (figure 55)

Le principe est détaillé dans les articles 1 et 2 de ce manuscrit : Des souches de levures contenant un prion sont étalées sur un milieu riche YPD. Sur ce milieu sont déposés des filtres à antibiogrammes et sur ces filtres sont déposées les drogues à tester. Le composé pourra diffuser dans le milieu et ainsi créer un gradient de concentration. Proche de la pastille, la concentration du composé sera élevée, et plus nous nous en éloignerons plus la concentration diminuera. Après incubation à 25°C, le temps que les levures se développent, si un composé est actif, c'est-à-dire s'il possède une activité antiprion, nous pourrions voir apparaître un halo rouge autour de la pastille où le composé a été déposé. Le fait que ce soit visuel par un système colorimétrique blanc-rouge est un énorme avantage. De plus, nous pouvons déterminer la toxicité d'un composé par une inhibition de croissance qui se traduit par une coloration verte autour de la pastille ainsi que l'efficacité d'un composé par la taille de son halo rouge.

II.6.1.2 Souches de levure utilisées

- Souche de levures 74-D694 contenant un prion de levures [*PSI+*], de variant « strong » car avec ce type de souche il est plus facile de discriminer une souche [*psi-*] d'une souche [*PSI+*].
- Souche de levures NT34 (*Mata, ade2-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, pDAL5 ::ADE2, [URE3]*) contenant un autre prion de levure [*URE3*].



D'après Bach et al., 2003

Figure 55 : Criblage haut-débit en système levure, d'inhibiteurs des prions.

Des cellules de levures contenant un prion sont étalées sur un milieu riche, puis des filtres à antibiogramme sont déposés à la surface du milieu afin de déposer dessus les différentes drogues à tester. Les boîtes sont mises à incuber 3 jours à 29°C puis 3 jours à 4°C. Les drogues déposées diffusent dans le milieu, autour du filtre et si une molécule se révèle avoir une activité antiprion, un halo de colonies rouges apparaît autour du filtre. En effet, les colonies qui étaient blanches au départ car contenant un prion deviennent rouges après l'effet de cure de la protéine prion par la molécule. Cette molécule est ensuite testée contre un deuxième prion de levure et si elle se révèle toujours active, elle est testée contre le prion de mammifère en système mammifère. Le DMSO, solvant, des drogues testées est utilisé comme contrôle négatif (en haut à gauche) et le chlorure de guanidium comme contrôle positif (en bas à droite).

Chacun possède un système rapporteur différent pour discriminer les souches curées des souches non curées (figure 56) :

Souches [*PSI+*] : La forme normale du prion est la protéine Sup35p, un facteur de terminaison de la traduction. Ainsi, le système rapporteur est basé sur la fidélité de la synthèse protéique *via* l'utilisation de l'allèle *ade1-14* qui possède un codon stop (UGA) à la place du codon UGG (Trp) en position 240 du cadre de lecture (ORF) du gène *ADE1*. Lorsque les cellules contiennent la protéine sous forme anormale, non fonctionnelle [*PSI+*], le ribosome ne peut pas lire le codon stop, ainsi les cellules peuvent produire l'enzyme Ade1p et sont

capables de croître sur un milieu dépourvu en adénine (SD-Ade) et forment des colonies blanches sur un milieu riche. Au contraire, lorsque les cellules ne contiennent pas la protéine sous forme prion mais sous forme normale, fonctionnelle, la traduction de l'allèle *ade1-14* se termine au codon stop empêchant ainsi la synthèse de l'adénine et ne pourront donc pas se développer sur un milieu dépourvu d'adénine. Elles formeront des colonies rouges sur un milieu riche dû à l'accumulation d'un intermédiaire de la chaîne de synthèse de l'adénine qui s'oxyde, formant ainsi un pigment rouge.

Ainsi, partant d'une colonie [*PSI+*] blanche sur milieu riche YPD, le critère pour la recherche de composés antiprion est leur capacité à transformer les colonies blanches en colonies rouges.

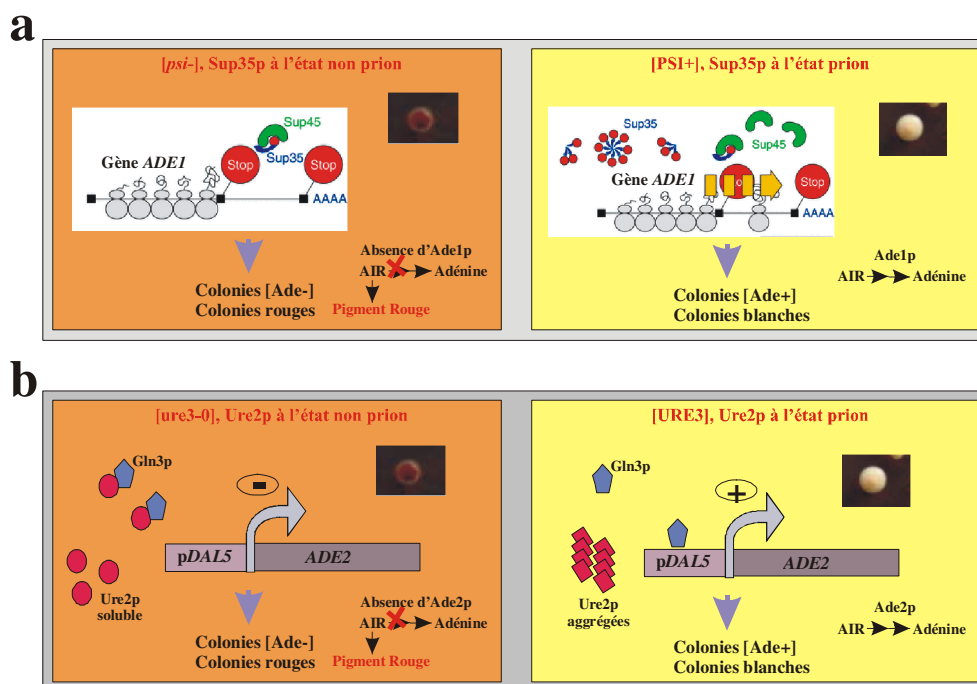


Figure 56: Systèmes rapporteurs des deux prions de levure utilisés pour nos cribles.

a. Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction; Lorsque dans une cellule ayant un codon stop dans son gène *ADE1*, Sup35p est sous conformation normale, non agrégée, la protéine liera le codon stop et la protéine Ade1p ne sera pas produite. Cette protéine étant nécessaire dans la chaîne de synthèse de l'adénine, son absence provoquera un arrêt dans la chaîne et l'accumulation d'un pigment rouge. La souche [*psi-*] formera des colonies rouges et ne pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine. Au contraire, lorsque Sup35p est sous conformation prion, c'est-à-dire agrégée, la protéine ne peut donc accomplir sa fonction et il y aura translecture. Le gène *ADE1* pourra être traduit. La souche [*PSI+*] formera des colonies blanches et pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine.

b. Ure2p est, dans un milieu riche, un répresseur du facteur de transcription Gln3p qui lui-même active la transcription du gène *DAL5*; Lorsque dans une cellule ayant le gène *ADE2* sous le contrôle du promoteur *DAL5*, Ure2p est sous conformation normale, non agrégée, la protéine se liera à la protéine Gln3p qui ne pourra donc activer la transcription du gène *ADE2*. Comme dans le cas de [*psi-*], la souche [*URE3*] formera des colonies rouges et ne pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine. Au contraire, lorsqu'Ure2p est sous conformation prion, la protéine ne pourra se lier à Gln3p, qui pourra ainsi aller activer la transcription de *ADE2*. La souche [*URE3*] formera des colonies blanches et pourra croître sur un milieu dépourvu d'adénine.

Souches [URE3] : La forme normale du prion est la protéine Ure2p, un régulateur du métabolisme azoté. Sur un milieu contenant une source riche en azote (ammonium, glutamine) cette protéine bloque le facteur de transcription Gln3p dans le cytoplasme en se fixant directement à lui. Ceci inhibe toute transcription du gène *DAL5*, la perméase nécessaire à l'entrée de l'allantoate et de l'ureïdosuccinate (USA) impliqués dans la synthèse de l'uracile. Le système rapporteur est basé sur le fait que le cadre de lecture de *DAL5* est remplacé par le gène *ADE2* dans une souche où le gène *ADE2* est délété. Le gène *DAL5* n'est pas transcrit lorsqu'Ure2p est active. Ainsi lorsque les cellules contiennent le prion [URE3], la protéine n'est pas active et *ADE2* peut être transcrit. Les levures formeront des colonies blanches sur milieu riche YPD et pourront croître sur un milieu dépourvu en adénine alors que les levures ne contenant pas le prion [*ure3-0*] formeront des colonies rouges et ne pourront pas se développer sur un milieu dépourvu en adénine.

Les levures, en plus d'avoir une membrane, ont une paroi ; ce qui rend la perméabilité à de nombreux composés, limitée. Pour contourner ce problème, le gène *ERG6*, codant pour une stérol méthyl transférase intervenant dans la synthèse de l'ergostérol, impliqué dans la composition de la membrane a été inactivé dans le variant 74-D694. Cette souche est auxotrophique pour le tryptophane (elle contient l'allèle *trp1-289*). L'inactivation du gène *TRP1* est synthétique létal avec l'inactivation du gène *ERG6*. Pour cette raison le cadre de lecture du gène *ERG6* a été remplacé par celui du gène *TRP1* (marqueur génétique). Ainsi le génotype obtenu est : *Mata, ade1-14, trp1-289, his3Δ200, ura3-52, leu2-3,112, erg6::TRP1, [PSI+]*. Et la souche obtenue nommée STRg6 est beaucoup plus perméable aux différents composés testés.

II.6.1.3 Approche pratique

La quantité de cellules STRg6 à étaler a été optimisée : environ 340 µl d'une culture en milieu liquide riche YPD à 30°C, de densité optique 0.5. Les cellules sont étalées sur des boîtes de pétri carrées de 144 cm² (12 cm X 12 cm).

Une dose de chlorure de guanidium est nécessaire pour augmenter la sensibilité du test. Le GuHCl est un inhibiteur chimique de Hsp104p, un chaperon de protéine essentiel à la propagation des prions de levure. Cependant une inhibition de Hsp104p ou bien une surexpression telle un traitement avec 2 à 5 mM de GuHCl cure les cellules du prion. En additionnant une dose sub-efficace de GuHCl (200 µM, environ 5 à 10% de la dose active pour l'inhibition de Hsp104p), nous trouvons que l'activité de tous les composés est

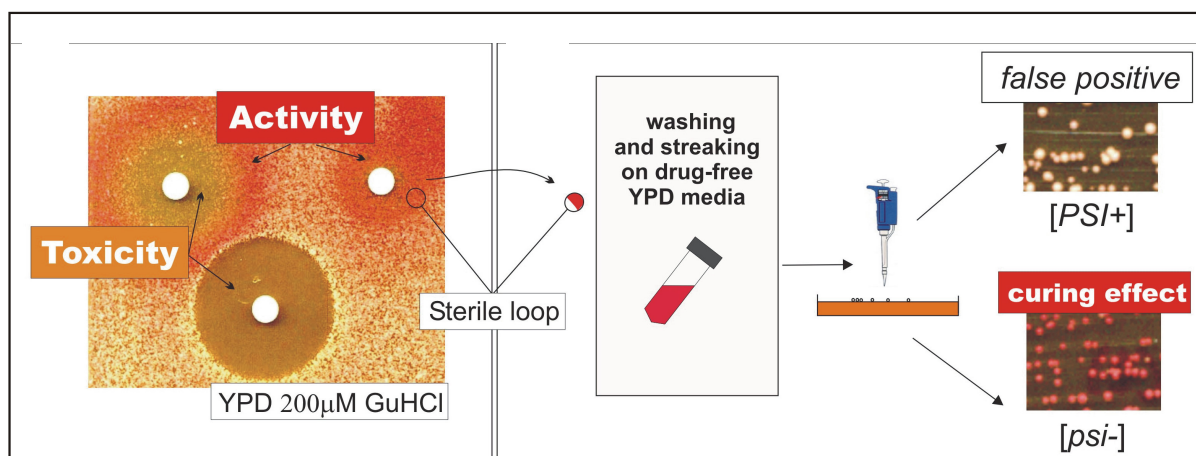
augmentée ce traduisant par un effet de synergie avec le GuHCl suggérant que tous ces composés agissent dans des voies distinctes que celle du GuHCl.

En plus des composés à tester, nous déposons deux contrôles : un négatif en haut à gauche, le DMSO qui est le solvant dans lequel sont repris les composés et un positif en bas à droite, le GuHCl, 5 μ l d'un stock 300 mM.

Les boîtes de pétri sont mises à incuber trois jours à 25°C puis trois jours à 4°C pour permettre l'intensification de la coloration. Après incubation à 4°C, les boîtes peuvent être observées et scannées.

II.6.1.4 Elimination des faux-positifs

Les faux positifs sont en particulier ceux qui interfèrent avec le système rapporteur blanc-rouge. Par exemple les drogues qui inhibent l'activité enzymatique ou l'expression des enzymes Ade1p et Ade2p mèneront à la formation de colonies rouges. Ces faux positifs sont assez faciles à éliminer puisque leur effet sur la coloration des colonies devrait être réversé sur un milieu vierge de drogues. Ainsi, il suffit juste de repiquer les colonies provenant du halo rouge, de les laver dans de l'eau stérile et de les restrier sur un milieu riche YPD dépourvu de drogue. Si les cellules deviennent blanches, c'est que le composé interférait avec le système colorimétrique. Au contraire, si les cellules forment toujours des colonies rouges, c'est que le composé est probablement une drogue antiprion (figure 57, d'après l'article 2).



D'après Bach et al., 2006

Figure 57: Elimination des faux positifs interférant avec le test colorimétrique.

Les cellules situées dans le halo rouge sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile, lavées dans de l'eau stérile et restriées sur un milieu riche dépourvu de drogues. Si elles forment des colonies blanches, c'est que la molécule testée agit sur le système rapporteur (par exemple en inhibant Ade1p ou Ade2p). Au contraire, si elles forment des colonies rouges, c'est que la molécule testée est bien active contre les prions de levures.

II.6.2 Tests cellulaires en cellules de mammifères

II.6.2.1 Criblage de composés actifs contre le prion de mammifère

Le criblage a été effectué en incubant, les cellules ROV ou MOV infectées, pendant une semaine dans des plaques 6 puits en présence de doses croissantes de nos drogues. Les gammes allaient de 0 à 30 μM pour les cellules ROV et de 0 à 15 μM pour les cellules MOV. A la fin de la semaine d'incubation les cellules sont lavées dans le PBS, lysées comme décrit ci-dessous puis les protéines sont dosées avec le « *Bicinchoninic acid assay* » (BCA, Pierce). Les extraits protéiques sont ensuite digérés à la protéinase K pour réaliser le test d'activité de nos drogues contre le prion de mammifère (figure 58).

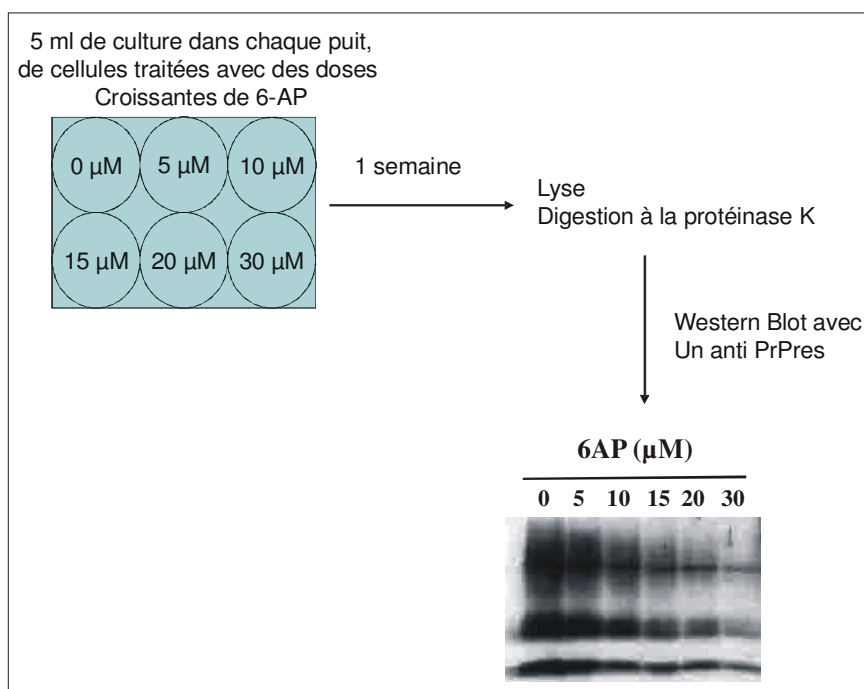


Figure 58 : Tests cellulaires.

Le test consiste à mettre en culture des cellules MOV (cellules de souris infectées par l'agent du scrapie) avec ou non la drogue antiprion, pendant une semaine. Les cellules sont ensuite lysées et l'extrait protéique est digéré à la protéinase K (PK). La présence de PrP après digestion est révélée par immuno-marquage à l'aide d'un anticorps anti PrP. Si la drogue testée a une activité antiprion en système mammifère, PrP devient sensible à la PK, au contraire si la molécule est inefficace, PrP peut être visualisée après immuno-marquage. Dans l'exemple donné, on peut voir que 30 μM de 6AP curent quasi totalement le prion.

II.6.2.2 Test : Résistance à la protéinase K

Afin de détecter la PrP^{tes}, 500 μg d'extraits protéiques sont digérés par 2 μg de protéinase K puis 3 μl de bleu de bromophénol sont ajoutés permettant de mieux visualiser le culot. Le tout

est incubé deux heures à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 4 mM de péfabloc 100 mM. Les tubes sont mis à centrifugés 30 minutes à 13 000 rpm à température ambiante puis le surnageant est enlevé. Une deuxième centrifugation de 1 minute permettra de retirer totalement le surnageant. Enfin 20 µl de bleu de charge 2X sont ajoutés puis les échantillons sont dénaturés 10 minutes à 100°C et prêts à être déposés sur un gel SDS-PAGE pour une analyse par western-blot avec un anticorps anti PrP^{res}, le ICSM18. Lorsque les cellules sont non infectées et que c'est l'effet des drogues sur la PrP normale qui veut être visualisé, l'anticorps utilisé est le 4F2 à une dilution de 1/5000. La quantification de la PrP restante (PrP^{res}) comparé au contrôle est réalisée à l'aide du phosphoimager Chemistart 5000 de chez Vilber-Lourmat.

II.6.3 Chromatographie d'affinité sur drogues immobilisées

Figure 59. Cette méthode est décrite dans les articles 3 et 4 de ce manuscrit.

II.6.3.1 Tampons

Tampons d'homogénéisations (de lyse) :

Extraits de Levures : Le tampon d'homogénéisation est composé de 25 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.2 % Triton x100 et PMSF 1 mM final.

Extraits de Porc et de cellules humaines : Le tampon d'homogénéisation est composé de 60 mM de β-glycerophosphate, 15 mM de *p*-nitrophénylphosphate, 25 mM de MOPS (pH 7.2), 15 mM d'EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM de sodium vanadate, 1 mM de NaF, 1 mM de phenylphosphate, 10 µg de Leupeptin à 10 mg/ml, 10 µg de Aprotinin à 10 mg/ml, 10 µg de Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) à 10 mg/ml et 100 µM de Benzamidine.

Extraits de cellules de lapins et de souris : Le tampon d'homogénéisation est composé de Déoxycholate de sodium 0.5%, de Triton X-100 0.5% et de Tris-HCl 50 mM pH 7.4.

Extraits totaux d'ARN : Le tampon final est constitué d'eau traitée au Di Ethyl Pyro Carbonate (DEPC).

Tampon de lavage des billes :

Le tampon de lavage est composé de 50 mM tris (pH 7.4), 5 mM de NaF, 250 mM de NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% de Nonidet P-40, 10 µg/ml de leupeptine, aprotinine, et de Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI), et 100 µM de benzamidine.

II.6.3.2 Préparation des extraits

De levures : 2 méthodes :

- Lyse par les billes de verre : Une culture de 50 ml, de DO située entre 0.5 et 1 est centrifugée 5 minutes à 3000 rpm puis le surnageant est retiré. Pour un volume de cellules, un volume de tampon (300 µl) est ajouté, afin de resuspendre puis environ deux volumes de billes de lyse sont ajoutés. Six séries de vortex de 30 secondes entrecoupées de 30 secondes dans la glace sont réalisées. Puis un volume de tampon (300 µl) est rajouté. Le tout est centrifugé 3 minutes à 13 000 rpm à 4°C pour éliminer les billes ainsi que les débris cellulaires. Récupérer le surnageant et doser les protéines par un Bradford et charger immédiatement sur la matrice d'affinité.

- Presse de French : Elle permet d'extraire les protéines grâce à de fortes pressions qui broient les levures. Une culture de levure de 50 ml est centrifugée 5 minutes à basse vitesse, 3000 rpm puis le culot est repris dans 1 ml de PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases (Mini complete de roche). Le liquide est ensuite placé dans la presse de French puis une pression de 2,8 bars est exercée. Les protéines peuvent être récupérées puis dosées et enfin chargées sur la matrice d'affinité.

De porc : Le cerveau est découpé en fins morceaux à l'aide d'une lame de scalpel propre puis mis dans un tube à centrifuger de 50 ml. Le tampon d'homogénéisation est ajouté suivant un rapport de 2 ml pour 1 g de cerveau. Le tout est broyé dans le potter puis soniqué à une amplitude de 30, 6 pulses de 10 secondes. Après une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm à 4 °C le surnageant est récupéré et les protéines dosées par un Bradford et chargées immédiatement sur la matrice d'affinité.

De cellules de lapin et de souris : Si on part de cultures en flasques T25 (25 cm²) : Le milieu de culture est enlevé puis les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS 1X puis lysées avec 1 ml de tampon d'homogénéisation. Le flasque est incubé 10 minutes à 4°C, le lysat est ensuite collecté dans un tube de 1.5 ml puis centrifugé 1 minute à 2000 rpm. Les protéines peuvent être dosées par le système Micro BCA, Pierce puis immédiatement chargées sur la matrice d'affinité.

D'ARN totaux de levures : cf plus haut

II.6.3.3 Chromatographie d'affinité

Juste avant utilisation, 10 µl de billes couplées à la drogue sont lavées 4 fois avec 1 ml de tampon de lavage puis resuspendues dans 100 µl de ce tampon. 200 µg d'extraits de levures ou 2 mg d'extraits de cellules mammifères ou encore 5 µg d'extrait d'ARN totaux sont ajoutés puis le tampon de lavage est immédiatement ajouté afin d'atteindre un volume final de 600 µl. Les tubes sont mis à incuber 30 minutes sur une roue à 4°C.

Des compétitions avec des drogues actives ou inactives furent également réalisées avec des composés libres (ou bien le volume correspondant de DMSO) à une concentration finale de 1 mM. Ces derniers sont incubés avec les extraits pendant 3 minutes avant d'être ajoutés sur la matrice d'affinité puis le tampon de lavage des billes contenant la même concentration de composés libres (1 mM) est immédiatement ajouté pour atteindre un volume final de 600 µl. Des traitements RNases furent également réalisés par ajout de RNases A à la concentration finale de 100 µg/ml dans les divers extraits cellulaires puis incubés 20 minutes à température ambiante avant d'être ajoutés sur la matrice d'affinité.

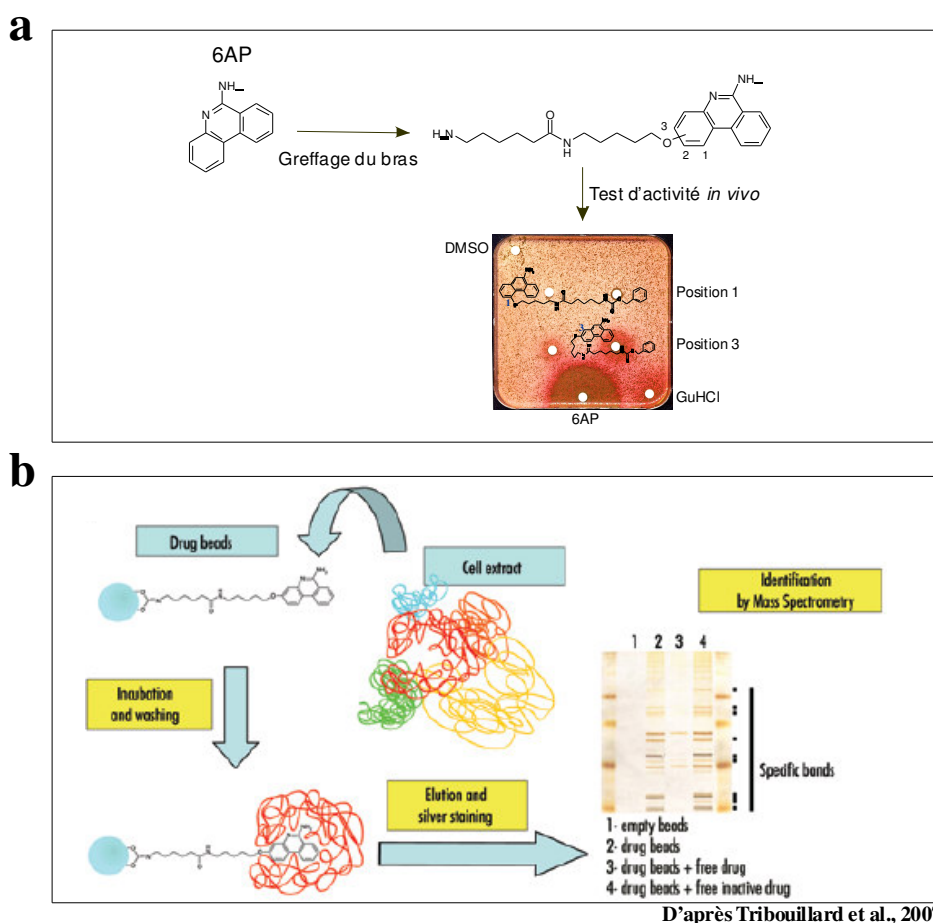


Figure 59 : approche biochimique pour l'identification des cibles de molécules à activité anti-prion.

a. Un bras amino caproylaminopentyloxy est greffé à notre molécule antiprion 6AP afin de fixer au bout de ce bras une bille sépharose. L'activité antiprion de notre molécule avec son bras est testée en système levure. Nous pouvons observer que la fixation en position 1 inhibe l'activité de la molécule mais pas lorsque le bras est greffé en position 3 de la molécule. Cette dernière sera donc utilisée pour les expériences de chromatographie d'affinité.

b. Des extraits cellulaires (de diverses origines) sont mis en contact avec notre matrice. Après des lavages intensifs, les protéines restant fixées à la matrice sont mises à migrer sur gel SDS puis colorées via une coloration à l'argent. Les protéines se liant spécifiquement sont analysées par spectrométrie de masse. Différents contrôles sont réalisés pour identifier les fixations spécifiques: 1. les extraits cellulaires sont passés sur une matrice sans drogue, 3. une compétition est réalisée avec la drogue antiprion libre, cette dernière empêchera les protéines de se fixer sur la matrice drogue-bille et enfin 4. une compétition est réalisée avec la drogue inactive libre, cette dernière ne devrait pas empêcher la fixation des protéines sur notre matrice. Ainsi, les protéines se liant spécifiquement sont absentes sur la matrice sans drogue, compétées par la drogue active libre et non compétées par la drogue inactive libre.

Après de brèves centrifugations à 10 000 X g puis aspiration du surnageant, les billes sont lavées 4 fois dans le tampon de lavage puis reprises dans 40 µl de bleu de charge, Laemmli 2X. Après une dénaturation 3 min à 95°C, les protéines liées aux billes sont déposées sur un gel SDS-PAGE et analysées par western-blot ou coloration à l'argent.

Pour les expériences réalisées avec les ARN totaux, de nombreuses précautions doivent être prises : utilisation d'une eau DEPC (DiEthyl Pyro Carbonate), traitement à la RNAsine des billes et de toutes les solutions. Les échantillons sont repris dans du tampon SB 2X (10 % de tampon TBE 10X, 90 % de formamylde et une pincée de Cyanol Xylène et de bromophénol) et le gel polyacrylamide est un peu différent puisqu'il ne contient pas de gel de concentration ; il s'agit d'un gel dénaturant contenant de l'urée 8 % (200 g d'urée, 40 ml de TBE 10X, 80 ml d'Acryl 40 %, 80 ml de Bis 2 % et 56 ml d'H₂O) chauffé, filtré et ayant subi un pré-run. La révélation se fait sous Ultra-Violet après coloration de 15 minutes dans du TBE 1X + BET (6 µl pour 100 ml) suivie d'une décoloration de 15 minutes dans un bain de TBE 1X.

II.6.4 Crible génétique

II.6.4.1 Principe

Recherche chez la levure, d'ADNc (aussi bien de levure que de mammifères) dont la surexpression empêche ou perturbe l'effet antiprion de nos produits mais également recherche de mutants de levure résistants ou hypersensibles à ces mêmes molécules (figure 60). Cette méthode est décrite dans l'article 4.

II.6.4.2 Criblage de molécules « pro-prion »

Des souches de levures contenant le prion [*PSI*⁺] sont transformées par une banque de cDNA CMB102 (80 ng/µl) portant le marqueur de sélection URA pour Uracile. Cette banque permet une surexpression des cDNA de façon inductible par le galactose.

Rendre les cellules compétentes

Centrifuger 50 ml d'une culture de levure en phase exponentielle (DO située entre 0.5 et 1) pendant 4 minutes à température ambiante. Ajouter 1 ml de LiAc-mix (10% de LiAc 1M, 10% de TE 10X et 80% d'H₂O) et resuspendre afin de perméabiliser les cellules. Mettre le tout dans un eppendorf et centrifuger à basse vitesse, 3 000 rpm pendant 1 minute. Enlever le surnageant et reprendre le culot avec 600 µl de LiAc-mix. Les cellules sont prêtes à être transformées ou bien à être stockées dans 7% final de DMSO à -80°C.

Transformation par la banque de cDNA CMB102

Transformation des cellules compétentes par la banque : A 250 µl de cellules compétentes sont ajoutés 1 µl de la banque, 20 µl d'ADN entraîneur (ADN de sperme de saumon) et 1200 µl de PEG-MIX (pour 100 ml : Mélanger 40 g de Polyethylene Glycol 4000 avec 100 ml de LiAc-mix).

Transformation des cellules compétentes par un vecteur vide : A 30 µl de cellules compétentes sont ajoutés 1 µl de vecteur vide portant le marqueur de sélection *URA3*, 5 µl d'ADN entraîneur (ADN de sperme de saumon) et 300 µl de PEG-MIX.

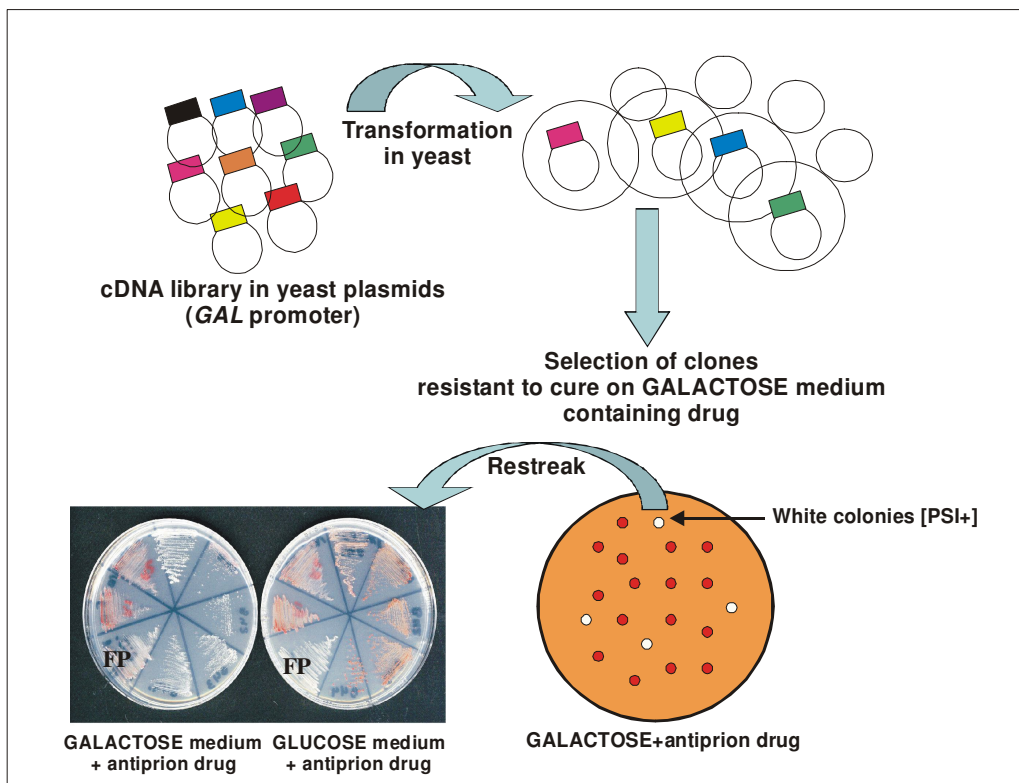
Le mélange est incubé 30 minutes en agitation sur une roue à température ambiante puis 15 minutes à 42°C dans un bain-marie. Le mélange est ensuite centrifugé 1 minute et le culot est repris dans 1 ml de milieu riche YPD pendant deux heures à 29°C afin de laisser les levures se régénérer. Centrifuger et reprendre le culot avec 150 µl de milieu riche YPD puis étaler 40 µl sur un milieu riche curatif contenant 400 µM de GuHCl et 50 µM de 6AP ainsi que 2% de galactose et de raffinose afin d'induire l'expression des cDNA mais dépourvu d'uracile afin de sélectionner les cellules qui contiennent bien la banque. Enfin, incuber les boîtes à 30°C.

Sélection des clones « positifs »

Théoriquement sur un milieu contenant des drogues, les levures contenant le prion, de couleurs blanches, deviennent rouges. Néanmoins il se peut que la surexpression d'un cDNA empêche l'effet de cure et dans ce cas, les levures restent blanches. Il est donc intéressant d'isoler toutes les colonies blanches et de vérifier s'il s'agit de vrais « positifs ». Pour cela on restrie chaque colonie blanche sur un milieu avec galactose et sur un milieu avec glucose. Dans le cas du milieu avec galactose, les cDNA sont surexprimés et les colonies doivent rester blanches, par contre sur un milieu avec glucose, l'expression des cDNA est réprimée et les levures doivent redevenir rouges.

Identification des cDNA

Une fois les vrais « positifs » identifiés, il ne reste plus qu'à identifier le cDNA qui code pour la protéine qui une fois surexprimée empêche la cure des prions par nos drogues. Pour cela une extraction rapide de l'ADN génomique est réalisée suivie d'une réaction d'amplification à l'aide d'un couple d'amorces : OBM1083 qui correspond à l'amorce M13 et OBM1082 qui correspond à l'amorce T3, séquences présentes dans le plasmide de part et d'autre du gène inséré. Ensuite, les produits de PCR sont purifiés puis envoyés à séquencer à la société Millegen.



D'après Tribouillard et al., 2007

Figure 60 : schématisation du criblage génétique pour l'identification de protéines "pro-prion".

Une banque de cDNA (de diverses origines) exprimée sous un promoteur inductible au galactose dans un plasmide de levure est transformée dans une souche de levure [*PSI+*] (formant des colonies blanches) et les cellules sont étalées sur un milieu contenant du galactose (condition où l'expression des cDNA est fortement induite) et les drogues antiprion. L'effet de cure rend les colonies rouges. Les colonies qui restent blanches malgré la présence des drogues antiprion expriment un cDNA dont la surexpression empêche la cure par nos drogues. Ces colonies blanches sont restreintes sur le même milieu et aussi en parallèle sur un milieu contenant du glucose à la place du galactose; afin de contrôler que les colonies isolées restent blanches sur le milieu inductible mais redeviennent rouges sur le milieu où l'expression du cDNA est réprimée. Dans l'exemple montré, un clone apparaît être un faux positif (FP) puisqu'il reste blanc sur le milieu contenant le glucose; la résistance n'est donc pas causée par l'expression du cDNA.

II.6.4.3 Criblage de molécules « antiprion »

Préambule : YD1 est une souche qui après traitement avec une drogue antiprion donne un profil de « cible », c'est à dire que autour de la pastille où a été déposée la drogue nous pouvons visualiser un halo rouge (cure du prion) suivi d'un halo blanc (absence de cure) qui

est lui même suivi d'un halo rouge (récupération de la cure). L'idée du crible est de se mettre dans les conditions où une absence de cure est observée (diverses expériences ont déterminé que 50 μ M de 6AP satisfaisaient ces conditions d'absence de cure) et de transformer cette souche YD1 par une banque d'ADN génomique pFL44 (voir les résultats non publiés).

Au niveau pratique, la méthode reste le même que celle du criblage « pro-prion » sauf qu'ici, les cellules sont différentes ainsi que la banque.

Le système d'identification est inversé par rapport à la méthode précédente : Normalement, les colonies sont résistantes à la cure sur un milieu contenant 50 μ M de 6AP, et sont donc blanches. Ce qui nous intéresse sont les colonies qui après transformation par la banque expriment une protéine qui restaure la cure, ce qui est facilement visualisable par la coloration rouge des colonies. Ainsi, dans ce crible, contrairement au précédent, nous recherchons les colonies rouges. Une fois identifiés, les clones rouges sont restreints sur le même milieu : SD-URA+ 2% Glucose+ 50 μ M 6AP+ 200 μ M GuHCl. Une extraction de leur ADN plasmidique est réalisée afin d'amplifier les morceaux d'ADN du plasmide de la banque à l'aide des amorces OBM 1167 et OBM 1168. Les produits de PCR sont purifiés puis envoyés à séquencer. Nous avons réalisé la réaction de séquence et le reste de l'analyse s'est fait à la plate forme génomique de la station biologique de Roscoff.

Réaction de séquence : 0,5 μ l de Big Dye V.3.1 ; 0,75 μ l de tampon 5X ; 1 μ l d'amorce (soit OBM 1167 SOIT OBM 1168) ; 2 μ l d'ADN et 0,75 μ l d'H₂O stérile.

L'amplification est réalisée dans un thermocycler en utilisant le programme suivant :

5 min à 96°C		durant 1 cycle
30 sec à 96°C		
30 sec à 50°C		durant 50 cycles
4 min à 60°C		
4°C		

ARTICLES

C. Articles : Développement/Résultats

Les six articles de cette thèse suivent un même fil conducteur : les molécules antiprion isolées au laboratoire, notamment la 6AP et le GA.

Le criblage en système mammifère de molécules à activité antiprion est très difficile, de par sa lourdeur (par exemple, les manipulations doivent être effectuées dans un laboratoire de type P2/P3) et de par son coût élevé. Pour contrer ces inconvénients une méthode de criblage basée sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été développée au laboratoire et a permis d'isoler des molécules à activité antiprion. Ce crible est détaillé dans les articles 1 et 2. Après avoir isolé ces molécules antiprion, il était intéressant de revenir à la recherche fondamentale afin d'élucider les mécanismes d'action de ces molécules et ainsi éventuellement d'appréhender des mécanismes d'apparition, encore largement inconnus, de ces maladies à prions. Une approche biochimique permettant de déterminer les cibles intracellulaires des molécules antiprion a ainsi été utilisée: la chromatographie d'affinité sur matrice de drogues immobilisées, qui est décrite dans le troisième article. La limite de cette technique est la présence d'un bras « chimique » qui est greffé à la drogue pouvant éventuellement empêcher la fixation de certaines cibles liées ou non à son activité biologique. Pour pallier à cet inconvénient, des approches génétiques basées sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisant la drogue libre sans bras chimique ont été développées. Ces approches sont décrites dans l'article 4. La méthode de chromatographie d'affinité ainsi que les approches génétiques en levure sont tout à fait complémentaires pour effectuer du criblage inverse afin d'élucider des mécanismes fondamentaux. Les deux derniers articles décrivent les principaux résultats de la thèse. L'article cinq concerne une molécule isolée grâce à la méthode de criblage en levure, à partir d'une chimiothèque de molécules au moins en phase 2 de tests cliniques. Cette molécule est le Guanabenz (GA), une molécule déjà en clinique pour le traitement de l'hypertension. Le GA semble actif également *ex vivo*, dans un modèle cellulaire mammifère et *in vivo* dans des modèles murins de maladies à prions. L'article 6 décrit les mécanismes d'actions possibles de deux drogues antiprion isolées au laboratoire : la 6-amino phénathridine (6AP) et le Guanabenz (GA). Ces résultats qu'il contient nous permettent de proposer un mécanisme original et inattendu contrôlant la prionisation impliquant le ribosome et sa fonction d'assistance au repliement des protéines.

Liste des articles

Article 1

Tribouillard D., Bach S., Gug F., Desban N., Beringue V., Andrieu T., Dormont D., Galons H., Laude H., Vilette D., and Blondel M., 2006. Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnology Journal*.

Article 2

Bach S., **Tribouillard D.**, Talarek N., Desban N. and Blondel M., 2006. A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods*.

Article 3

Tribouillard D., Guiffant D., Gug F., Galons H., Meijer L., Blondel M. and Bach S. 2007. Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnology Journal*.

Article 4

Tribouillard D., Gug F., Galons H., Bach S., Saupe S.J. and Blondel M., 2007. Antiprion drugs as chemical tools to uncover mechanisms of prion propagation. *Prion*.

Article 5

Tribouillard-Tanvier D., Beringue V., Desban N., Gug F., Bach S., Galons H., Laude H., Vilette D., and Blondel M., 2007. Antihypertensive drug Guanabenz is active *in vivo* against mammalian prions. Soumis.

Article 6

Tribouillard-Tanvier D., Dos Reis S., Gug F., Beringue V., Huang C., Talarek N., Bach S., Desban N., Saupe S.J., Thuret JY., Chedin S., Vilette D., Galons H., Sanyal S.C., and Blondel M., 2007. Protein folding activity of rRNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs. Soumis.

I. Mise au point d'un crible haut-débit en levure dans le but d'isoler des drogues antiprion.

Articles 1 et 2

Présentation/Résumé

L'objectif que l'on s'était donné dans un premier temps était d'isoler des molécules ayant une activité antiprion. Nous sommes partis de **deux constats** :

1. les méthodes de criblage existantes en système mammifère sont lourdes, coûteuses et peu efficaces (le haut-débit est donc très difficile)
2. l'existence de prions chez la levure, inoffensifs tant pour la levure que pour le manipulateur,

et une hypothèse : les mécanismes d'apparition et de propagation des prions sont conservés de la levure à l'homme.

Nous avons donc mis au point une méthode de criblage *in vivo* en levure. Celle-ci a fait l'objet d'un dépôt de brevet. Les deux premiers articles de ce manuscrit, décrivent en détail la méthode de criblage en levure que nous avons mise au point au laboratoire pour cribler des molécules à activité antiprion.

Cette méthode de criblage est constituée de deux étapes : une première qui consiste à tester les molécules contre un premier prion de levure, [PSI+] et une deuxième qui consiste à tester les molécules efficaces contre le premier prion contre un deuxième prion de levure, [URE3]. L'idée était que des molécules efficaces contre deux protéines prion très différentes, tant par leur structure que par leur fonction, devaient être efficaces contre tous les prions en général et non pas spécifiquement contre un prion donné. Ces molécules actives contre les prions de levure devaient être celles qui ont le plus de chance d'être actives contre le prion de mammifère.

Le crible est basé sur un système colorimétrique blanc-rouge : les levures qui contiennent la protéine sous forme prion, agrégée et insoluble, forment des colonies blanches alors que les levures qui contiennent la protéine sous conformation non prion, non agrégée et soluble, forment des colonies rouges. Nous cherchons donc parmi des collections de molécules chimiques, des composés capables de conduire à la formation de colonies rouges, donc potentiellement capables de curer le prion de levure considéré. Il est par ailleurs important de repérer les faux-positifs : les molécules qui interfèrent avec le système rapporteur rendant

ainsi les colonies rouges sans pour autant avoir d'activité antiprion. Pour cela, nous prélevons les colonies devenues rouges en contact de la drogue puis nous les lavons avec de l'eau avant de les strier sur un milieu riche en absence de drogues. Si les colonies formées sont blanches alors cela signifie que la drogue isolée interfère probablement avec le système rapporteur. En revanche, si les colonies restent rouges alors les drogues sont très certainement capables de curer le prion considéré.

De ces premiers cribles, six molécules ont pu être isolées à partir d'une chimiothèque de 2500 molécules : cinq appartiennent à une nouvelle classe de molécules appelées kastellaolines (en référence au nom breton de Saint-Pol-de-Léon près de Roscoff) et la sixième est la phénanthridine, molécule bien connue et commercialisée comme base de synthèse de nombreuses molécules polycycliques. Grâce à une approche structure-activité effectuée en collaboration avec l'équipe du chimiste Hervé Galons (Université René Descartes, Paris 6), l'activité de la phénanthridine a été optimisée pour donner par exemple la 6-amino-phénanthridine (6AP).

Les molécules actives isolées de ces cribles ont ensuite été testées *ex vivo* dans trois systèmes cellulaires mammifères différents : 1- des cellules murines N2a infectées par la souche de prion RML ou 22L, 2- les cellules de lapin ROV exprimant la PrP ovine et infectée par le prion ovin, 3- les cellules murines MOV exprimant la PrP ovine et infectée par le prion ovin. La plupart de ces molécules actives *in vivo* contre les prions de levure [*PSI+*] et [*URE3*] se sont avérées actives contre le prion de mammifère. Inversement, des molécules actives isolées contre le prion de mammifère, comme par exemple la Quinacrine ou la Chlorpromazine se sont également avérées actives dans notre système de criblage en levure contre [*PSI+*] et [*URE3*].

Tous ces résultats suggèrent que les mécanismes de « prionisation » sont bien conservés de la levure à l'homme, validant ainsi notre méthode de criblage pour isoler des molécules à activité antiprion mais aussi la levure comme modèle pour l'étude des mécanismes d'apparition et de maintien des prions.

Il serait maintenant intéressant de tester ces molécules actives contre les prions dans des modèles pour d'autres maladies neurodégénératives comme par exemple, les maladies d'Alzheimer ou de Huntington dont on pense qu'elles peuvent avoir des mécanismes d'apparition communs avec les maladies à prions.

L'objectif suivant a alors été d'essayer de comprendre les mécanismes d'action, au niveau cellulaire, de ces molécules. Les articles 3 et 4 décrivent des techniques permettant d'atteindre cet objectif.

Article 1

Technical Report

Using budding yeast to screen for anti-prion drugs

Déborah Tribouillard¹, Stéphane Bach^{1,2}, Fabienne Gug³, Nathalie Desban¹, Vincent Beringue⁴, Thibault Andrieu⁵, Dominique Dormont⁵, Hervé Galons³, Hubert Laude⁴, Didier Vilette⁴ and Marc Blondel^{1*}

¹ C.N.R.S. UMR7150, Amyloids and Cell Division Cycle Laboratory, Station Biologique, Roscoff, Bretagne, France

² C.N.R.S. UPS2682, Molecules and Therapeutic Targets, Station Biologique, Roscoff, Bretagne, France

³ Laboratoire de Chimie Organique 2, Université René Descartes, INSERM U648, Paris, France

⁴ I.N.R.A. Virologie et Immunologie Moléculaires, Domaine de Vilvert, Jouy en Josas, France

⁵ Service de Neurovirologie, CEA/CRSSA/EPHE, Fontenay aux Roses, France

Prions are misfolded proteins capable of propagating their altered conformation which are commonly considered as the causative agent of transmissible spongiform encephalopathies, a class of fatal neurodegenerative diseases. Currently, no treatment for prion-based diseases is available. Recently we have developed a rapid, yeast-based, two-step assay to screen for anti-prion drugs [1]. This new method allowed us to identify several compounds that are effective *in vivo* against budding yeast [PSI⁺] and [URE3] prions but also able to promote mammalian prion clearance in three different cell culture-based assays. Taken together, these results validate our method as an economic and efficient high-throughput screening approach to identify novel prion inhibitors or to carry on comprehensive structure-activity studies for already isolated anti-mammalian prion drugs. These results suggest furthermore that biochemical pathways controlling prion formation and/or maintenance are conserved from yeast to human and thus amenable to pharmacological and genetic analysis. Finally, it would be very interesting to test active drugs isolated using the yeast-based assay in models for other diseases (neurodegenerative or not) involving amyloid fibers like Huntington's, Parkinson's or Alzheimer's diseases.

Received 8 July 2005
Accepted 11 September 2005

Keywords: 6-aminophenanthridine (6AP) · Drug screening · Neurodegenerative diseases · Prions · Yeast-based assays

1 Introduction

Since the outbreak of the mad cow disease, prions stand in the crossfire of general public attention, animated scientific debate and major political and economical decisions. Stanley Prusiner's hypothesis that a protein on its own, *i.e.* without the informational support of a specific nucleic acid, can become a devastating infectious ele-

ment [2, 3] has been received initially with skepticism. Scientific evidence gathered over several decades now leaves little room for an alternative explanation.

According to the "protein only" hypothesis prions are infectious proteins. This concept of a protein-based infectious element is now commonly admitted and even considered by many as proven in various model systems as filamentous fungus *Podospora anserina* [4] or budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [5, 6] and also very recently, in mammals [7]. Prion-based diseases include scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. All these yet incurable neurodegenerative disorders are thus thought to be due to non-conventional infectious agents mainly constituted of a single protein, PrP, a GPI anchored protein expressed at the surface of numerous cell types including neurons. Indeed PrP exists as two forms, a "normal" form (PrP^C) and a pathological, misfold-

Correspondence: Marc Blondel, C.N.R.S. UMR7150, Station Biologique, Amyloids and Cell Cycle Laboratory, place G. Teissier, F-29680 Roscoff, Bretagne, France

E-mail: blondel@sb-roscoff.fr

Fax: + 33 2 98 29 23 42

Abbreviations: BSE, bovine spongiform encephalopathy; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; GuHCl, guanidine hydrochloride; SD-Ade; adenine-deficient synthetic; 6AP, 6-aminophenanthridine

ed and protease resistant form (PrP^{Sc}). PrP^C mainly consists of α -helices and does not form aggregates. During the course of the disease, PrP^{Sc} accumulates and is capable of converting the normal form PrP^C to this altered conformation and is therefore infectious [3]. This pathological form, PrP^{Sc}, is rich in β -strand secondary structure, forms large aggregates [8] and is proposed to be folded into β -helical structure [9].

Prions have been identified in mammals [3], in the filamentous fungus *P. anserina* [10] and in budding yeast *S. cerevisiae* [11]. Although prion proteins present in all these organisms do not show obvious sequence similarity, they share a number of properties: formation of amyloids, proteinase K resistance *etc.*

While mammalian PrP represents the “real” prion (the disease causative agent), prions in fungi ([Het-s] in *P. anserina* and [PSI⁺] or [URE3] in *S. cerevisiae*), are safe for human and propagate in micro-organisms that are easily tractable genetically, especially in the case of *S. cerevisiae*. In addition, prion infectivity can be generated *in vitro* from recombinant material and assayed relatively easily in these two fungal systems [4–6]).

To date, there is no efficient treatment for prion-based diseases [12, 13]. Several approaches towards the development of prion disease therapies are currently explored [14], in particular pharmacological drugs promoting PrP^{Sc} clearance in various mammalian cell culture assays [15–20]. These assays are based on the fact that PrP^{Sc}, but not PrP^C, is markedly resistant to proteinase K: after proteinase K treatment, the absence or presence of PrP (as detected by immunological analysis) indicates whether the protein was in its normal form (PrP^C) or in its insoluble, protease-resistant and pathogenic form (PrP^{Sc}). Because of the technical complexity of this screening method (for example, all the manipulations have to be done in highly secure laboratories), investigations have been first limited to clinically-used compounds that are known to cross the blood brain barrier. Nevertheless a few active molecules have been identified using this approach. The two most efficient were initially quinacrine (an anti-malaria agent) and chlorpromazine (an antipsychotic drug). Later on, bis-acridines, chemical dimers of quinacrine analogs tethered by a linker, have been found to be about ten fold more active than quinacrine [21]. However, neither quinacrine nor chlorpromazine turned out to be active *in vivo* in various mouse models for prion-based diseases [22, 23]. Recently an automated version of the murine neuroblastoma-based assay has been developed in a 96-well plates format for cell culture assays [24]. Using this automated version of the mammalian assay, a collection of 2000 FDA-approved drugs has been tested and among the most active molecules, in addition to some polyphenols, quinacrine and chlorpromazine were again found but none of the isolated compounds were active *in vivo* in mouse models [25] highlighting the need to assess *in vivo* in mammalian models molecules active *ex vivo* in

cell-based assays. These methods, although useful, are difficult to adapt to high-throughput screening. For this reason we have set up a yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions [1, 26].

The most intensively studied yeast prions, [URE3] and [PSI⁺], correspond respectively to the prion form of the Ure2p and Sup35p proteins (for a review see [27]). Ure2p protein is involved in the regulation of nitrogen metabolism and is dispensable for viability. In contrast, Sup35p, the ortholog of mammalian eRF3, is a translation termination factor and is absolutely essential for cell viability. In yeast, prions are detected by the loss of function of the corresponding proteins; the [PSI⁺] prion, for instance, is detected as a partial loss of function of the Sup35p protein. In its prion state, Sup35p becomes insoluble and is thus inactivated [28, 29]. Since, Sup35p is part of the translation termination complex, transition to the prion state leads to an increased translational readthrough of stop codons. Beyond the conceptual identity, yeast prions exhibit major differences when compared to mammalian prions. First, yeast prions do not kill cells, they even do not cause “disease” [30]. Prion-infected yeast strains grow nearly as well as wild-type, and even better under certain growth conditions [31] suggesting that in yeast these prions may play a role in evolution and contribute to adaptation. In addition, unlike to the membrane-bound PrP, fungal prion proteins are cytosolic. PrP and fungal prion proteins share no primary sequence homology but only a similar domain organization with a poorly structured domain appended to a well folded globular domain. Like mammalian prion, fungal prion propagation is intimately connected with amyloid aggregation [32, 33].

It has been known for a long time that millimolar concentrations of guanidine hydrochloride (GuHCl) lead to loss (cure) of both [URE3] and [PSI⁺] [34]. Following GuHCl treatment, Sup35p no longer aggregates. However, this curing effect is reversible as Sup35p maintains its ability to be reconverted into the insoluble infectious form. This curing effect most certainly results from inactivation of the Hsp104p chaperone protein [35–37] whose function is to resolubilize protein aggregates notably after heat denaturation. Knock-out of the *HSP104* gene [38] like treatment of yeast cells with 3–5 mM of GuHCl (for at least 6 generation times) leads to elimination (cure) of the [PSI⁺] phenotype. All known budding yeast prions need Hsp104p to ensure their own auto-catalytic inactivation [39]. However pharmacological targeting of Hsp104p is not an option to inhibit prion replication in mammals since, although it is conserved in bacteria, fungi and plants, Hsp104p homologs appear to be absent in animals. Thus Hsp104p clearly does not constitute a good screening target for isolation of molecules active against mammalian prions. For this reason, we have developed an *in vivo* yeast-based assay to screen for molecules active against yeast prions in condition where the Hsp104p pathway is partially inactivated by using sub-effective

concentrations of GuHCl, thus optimizing our chances to target Hsp104p independent pathways [1] (see below). The initial hypothesis assumed the existence of conserved pathways controlling prions in budding yeast and man. The use of yeast allowed us to design a very simple, economic, safe and rapid method to screen for anti-prion drugs. The few active molecules rapidly isolated from large chemical libraries using the yeast-based assay could subsequently be tested *ex vivo* against mammalian prion using the more complex mammalian cell culture procedures. Finally *in vivo* anti-prion activity of compounds efficient in both cell culture-based assays could be evaluated using murine models for prion-based diseases.

In a first study, we screened several chemically diverse libraries of compounds (consisting of either synthetic molecules or natural products purified from various sources by academic laboratories) for the ability to cure the *[PSI+]* phenotype in a primary screen using a simple colorimetric reporter system. Drugs active against the *[PSI+]* phenotype were then tested for their activity against the *[URE3]* phenotype using a similar simple screen. Because of the structural and functional divergence of Sup35p and Ure2p proteins, molecules also active in this secondary screen were considered likely to be active against yeast prions in general. Using this two step assay, we isolated six active compounds from the first library of 2500 molecules [1]. Five belong to a new class of molecules (kastellpaolitines), whilst the sixth is an already known molecule (phenanthridine). In addition, using a structure-activity approach, we synthesized several phenanthridine derivatives, in particular 6-aminophenanthridine (6AP), which were even more potent than the molecules identified in the screen. Very interestingly, quinacrine and chlorpromazine, two pharmacological compounds known to promote mammalian prion clearance *ex vivo*, were also active in our yeast-based method. Conversely all the molecules which we found positive in our assays were also found to be active against mammalian prion in various cellular systems [18–20]. We could thus continue to rapidly and efficiently screen large and very diverse chemical libraries (more than 15 000 molecules screened to date, one person can manually test up to 500 compounds per day) to isolate a number of new molecules active against both yeast prions. As expected, most of them turned out to be also active against mammalian prion (N. Desban and M. Blondel, unpublished results). Taken together, all these results validate our method for finding new anti-prion drugs and furthermore suggest that, although mammalian prions and yeast prions exhibit clear differences, the biochemical pathways controlling their formation and/or maintenance are conserved from yeast to human.

2 Methodology

2.1 Development of a yeast-based assay to screen for anti-prion compounds

Our screening method is based on the fact that in *[PSI+]* cells, most of the Sup35p protein, which is a subunit (eRF3) of the eukaryotic release factor, is sequestered into protein aggregates and is thus unavailable to function in translation termination. As a result, *[PSI+]* causes a heritable change in the fidelity of protein synthesis due to ribosomes having an increased tendency to readthrough stop codons. The *ade1-14* allele, which contains an opal stop codon in the beginning of the ORF of the *ADE1* auxotrophic marker encoding gene, provides a convenient colorimetric method of monitoring the Sup35p state [38]. When Sup35p is in its aggregated prion conformation (in *[PSI+]* cells), increased readthrough this opal codon allows cells to grow on adenine-deficient synthetic medium (SD-Ade) and prevents the accumulation of metabolic by-products that cause colonies to appear red on rich medium (YPD). *[PSI+]* cells thus form white colonies on YPD. When Sup35p is in its normal soluble form (in *[psi-]* cells), translation of the *ade1-14* allele terminates at the opal codon, preventing cells from growing on SD-Ade and leading to the formation of red colonies on YPD. We made use of this color change to screen chemical libraries for anti-prion molecules. As for mammalian prions, several *[PSI+]* “strains” exist, some are termed “weak” because they exhibit a weak non sense suppression phenotype leading to a pink coloration on rich medium. In contrast, “strong” *[PSI+]* strains give white colonies on rich medium. We choose to use strong *[PSI+]* strains because the red coloration, an indication of curing efficiency, is easier to follow. In addition, yeast cells are naturally poorly permeable for most chemical compounds, probably due to the fact that, in addition to a plasma membrane, they also have a cell wall. To increase yeast cell permeability, we constructed a strong *[PSI+]* strain (STRg6) from the 74-D694 strain [38] in which the *ERG6* gene was replaced by the *TRP1* auxotrophic marker [40]. *ERG6* encodes an enzyme involved in ergosterol metabolism thus *erg6Δ* cells have an altered lipid composition probably explaining their increased permeability to a growing list of chemical compounds. This STRg6 strain is then spread on YPD solid medium in a square Petri plate and small filters (similar to those used for antibiograms) are placed on the agar surface. On these filters, compounds to be tested are deposited. They then diffuse into the surrounding medium establishing a concentration gradient. Thus this simple method allows, in one experiment, to test a full concentration gradient.

To set up the method, GuHCl was first deposited on a cell layer of either STRg6 or the isogenic wild type strain (74-D694 strain). This allowed us to demonstrate that *erg6Δ* cells are also more permeable to GuHCl (Fig. 1A). To

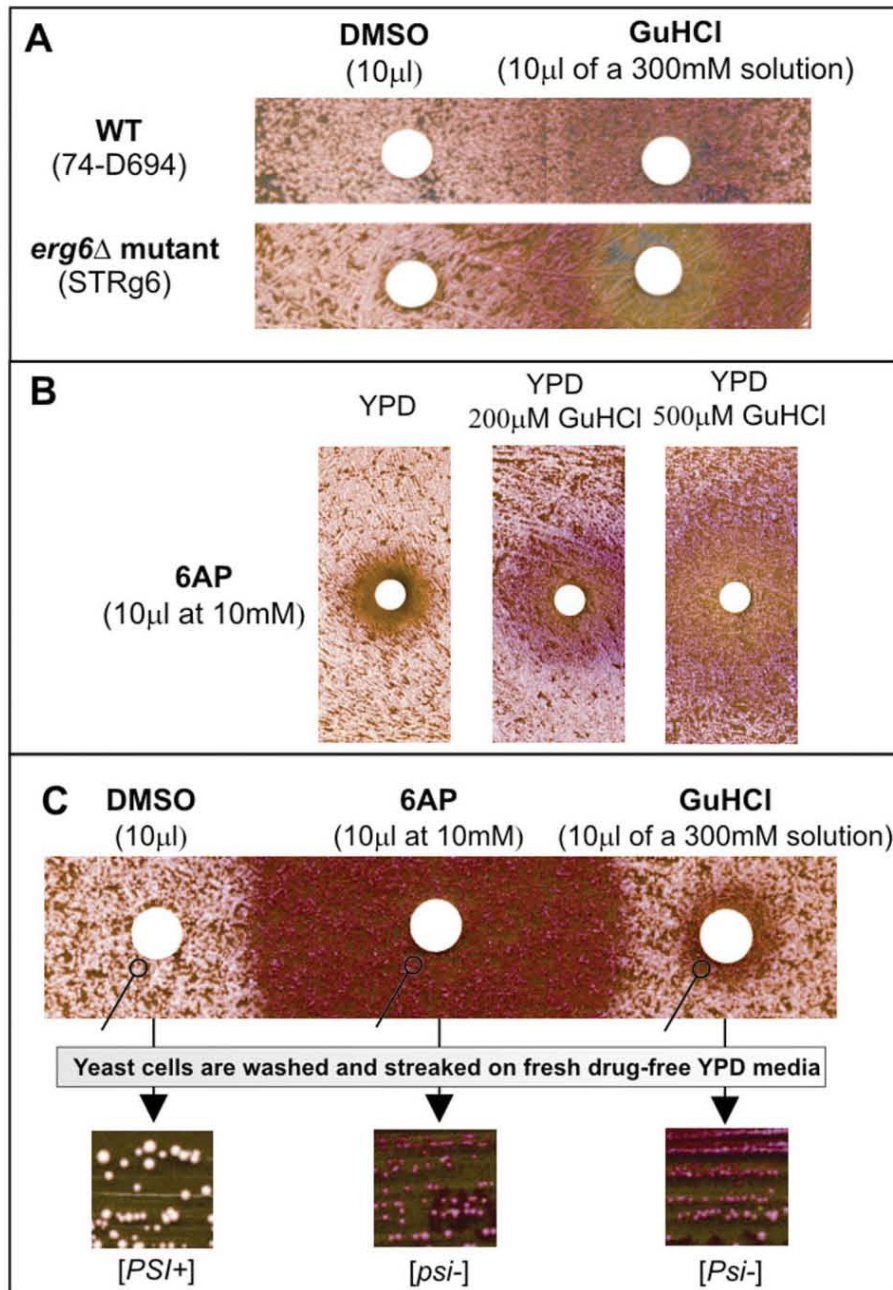


Figure 1. Development of the yeast-based assay: use of antibiogram filters and of *erg6 Δ* mutants, adjustment of the assay sensitivity and the simplest method to detect false positive interfering with the colorimetric detection system.

- A-** *ERG6wt* (upper panel) and *erg6 Δ* strains (lower panel) is spread on a rich (YPD) medium and small filters similar to the ones used for antibiograms are placed on the agar surface. DMSO, the compound vehicle, is deposited on the left filters and the same quantity of GuHCl is applied on the right filters. Note that a halo of red colonies appears around filters where GuHCl was spotted and that this halo is much bigger when an *erg6 Δ* strain was used instead of the *ERG6wt* strain.
- B-** The same quantity of 6AP is filter-spotted on YPD medium not supplemented (left panel), or supplemented with 200 (middle panel) or 500 μ M GuHCl (right panel). Note that increasing the quantity of GuHCl in the medium increases both the activity of 6AP (thus sensitivity of the method) but also the background coloration.
- C-** Cells from red colonies (sampled around filters containing either active compounds or the positive control GuHCl) form red colonies after extensive washing and streaking on compound-free YPD. In contrast, in the case of a false positive, cells sampled around filters surrounded by a red halo, would form white colonies. As a negative control, cells sampled from around the DMSO-spotted filter still formed white colonies

screen the chemical library, a different drug should be applied on each filter (Fig. 2), except for the top left filter where DMSO, the compounds vehicle, is deposited (negative control: -) and for the bottom right filter where GuHCl is added (positive control: +). As previously mentioned, all known budding yeast prions need Hsp104p to ensure their propagation and this chaperone protein was reported to be inhibited by 3–5 mM of GuHCl [34, 36]. To increase the sensitivity of our screening method, a sub-effective dose of GuHCl was added to the YPD medium. We choose a concentration of 200 μM which represents about one twentieth of the effective curing concentration. The rationale behind this was that this might allow identification of compounds that act synergistically with GuHCl and thus affect a different target than Hsp104p. When a drug is active in curing the [PSI⁺] prion, a halo of red colonies appears around the filter where the drug was applied. In the example shown in Fig. 2, one molecule gives a strong positive signal, in addition to the positive control. We next evaluated the effect of adding a sub-effective amount of GuHCl to the YPD medium by comparing both the halo diameter and the intensity of red coloration obtained for one of our active molecules, 6AP, using YPD medium not supplemented or supplemented with either, 200 μM or 500 μM GuHCl (Fig. 1B). 6AP is much less active on medium without GuHCl and much more active on medium containing 500 μM GuHCl, as compared to cells grown on YPD supplemented with 200 μM GuHCl, the current assay conditions. This result was also observed for all other active compounds we isolated [1]. The synergy between these molecules and GuHCl suggests that they act on a pathway distinct from the GuHCl-sensitive Hsp104p pathway. To date we only obtained drugs exhibiting strong synergy with GuHCl but, in principle, it should also be possible to obtain drugs exhibiting just an additive effect or no interference. We also note that the basal coloration of colonies shifted from white to pink when the sub-effective concentration of GuHCl was increased (Fig. 1B). A small quantity of GuHCl in the medium thus considerably enhances the sensitivity of the method, but at the same time also increases the background coloration. The situation looks like the one observed with argentic photography where the more sensitive the emulsion, the less contrast is obtained. We also tested all the positive hits on *ERG6*^{wt} [PSI⁺] cells and found that they were also active, although to a significantly lower extent than on the *erg6* Δ [PSI⁺] strain used for the primary screen [1]. This indicates that the activity of our compounds is independent from the *ERG6* gene deletion but that inactivation of this gene clearly increased the sensitivity of our method.

2.2 Implementation of a [URE3] based secondary screen

To define whether compounds isolated in this primary [PSI⁺]-based screen could also be active against another

yeast prion, a secondary screen based on the [URE3] prion was designed. An *ade2* Δ strain (in which the *ADE2* gene was replaced by the *KanMX* gene) was constructed in which the ORF of the *DAL5* gene was replaced by that of the *ADE2* gene. This strain is similar to the one already described [41] except that in our case the coding sequence of the *ADE2* gene replaces that of *DAL5*. In order to increase cell permeability, the coding sequence of *ERG6* gene was also replaced by that of the *TRP1* gene. In this strain, DT10, transcription of *ADE2* thus depends on the state of Ure2p: if Ure2p is inactivated by a prion mechanism ([URE3] cells), *DAL5* gene is actively transcribed whereas in [*ure3-0*] cells, it is not. As a result, [URE3] cells of the DT10 strain will form white colonies whereas [*ure3-0*] cells will form red colonies. This secondary screen is thus based on the same colorimetric assay as our primary test. Phenanthridine, 6AP, 6A-8CP and 6A-8tFP were found to be also active against [URE3] prion [1]. The same results were obtained for KPs which was expected given the structural similarities between all these molecules. Because of the structural and functional divergence of Sup35p and Ure2p proteins, compounds active against both [PSI⁺] and [URE3] prions are likely to be active against yeast prions in general.

2.3 Identification of false positives interfering with the colorimetric detection system

A classical artifact which can be encountered using the red coloration-based yeast assay is to isolate compounds not active against yeast prions but rather interfering with the adenine biosynthesis pathway, responsible for the red coloration when interrupted. For example, drugs active against the Ade1p or Ade2p enzymes should also, in principle, lead to accumulation of metabolic byproducts leading to formation of red colonies without any effect against [PSI⁺] or [URE3]. Detection of such compounds can be easily achieved using various methods all based on the fact that cells treated with drugs active against yeast prion still give rise to red colonies after extensive washing and subsequent plating on compound free YPD. Indeed, once [PSI⁺] prion is cured, the [*psi*⁻] status remains stable, even after removal of the active drug. In contrast, if a compound interfering with adenine biosynthesis pathway is removed, cells, after rinsing, will give rise to white colonies thus allowing easy detection of such false positives. The simplest method (Fig. 1 panel C) is, after rinsing in sterile water the cells from red colonies (around filters containing either active compounds or the positive control GuHCl), to inoculate these on drug free medium and to check whether they still form red colonies, thus indicating that [PSI⁺] or [URE3] prions had been cured in cells of the red colonies as a result of the chemical treatment. In the same experiment, cells from the negative control should also be tested to check that they continue to form white colonies.

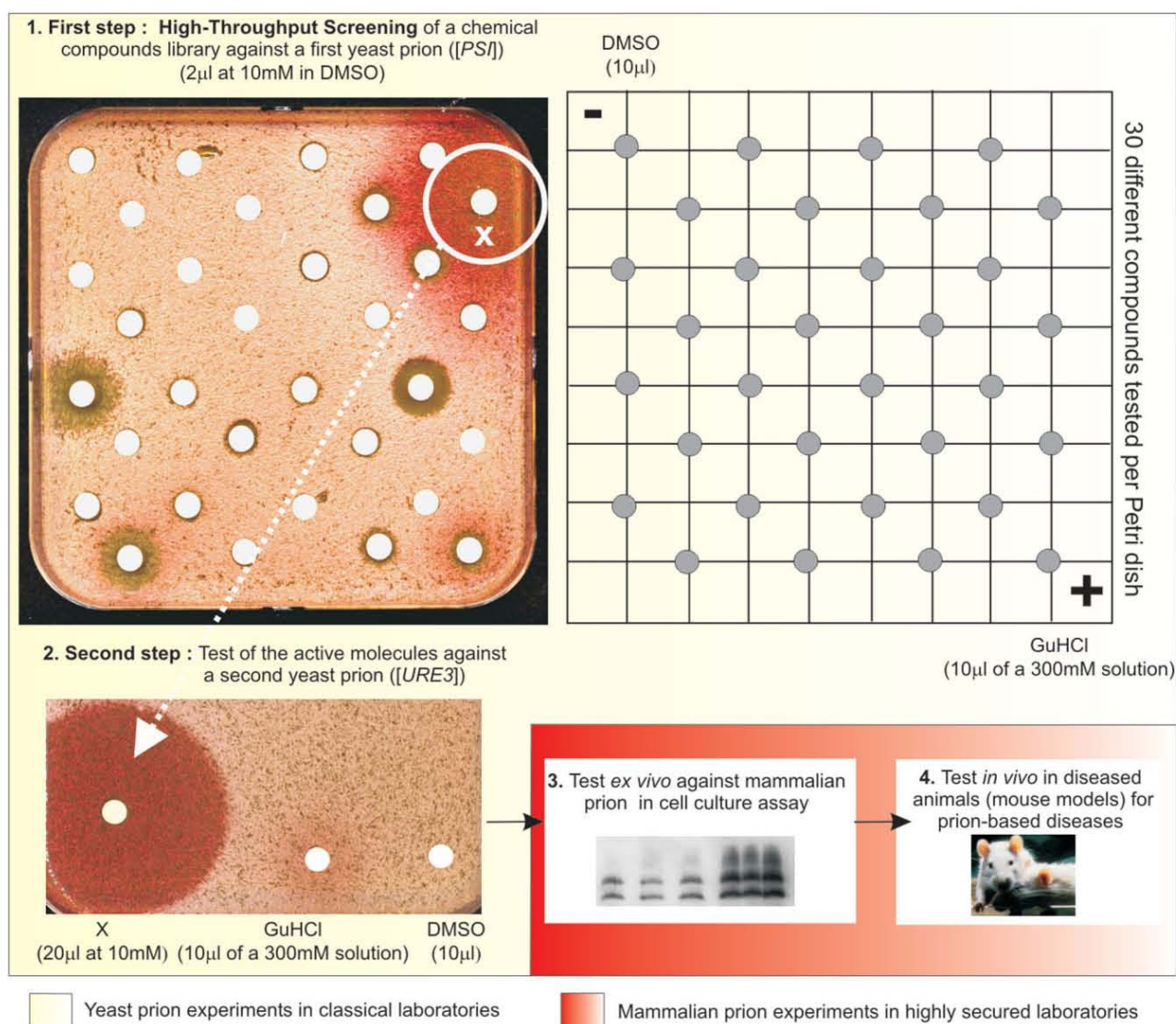


Figure 2. Schematic representation of the complete procedure: from yeast to mouse.

1- The STRg6 strain (see text) is spread on a Petri dish containing rich YPD medium supplemented with 200 µM GuHCl, antibiogram filters are placed on the agar surface and individual compounds are applied onto each filter, except on the top left filter where only DMSO is added (the compound vehicle, negative control, -) and on the bottom right filter where GuHCl (300 mM in solution in DMSO) is spotted (positive control, +). A halo of red colonies around a filter indicates that a compound active against the *[PSI+]* prion was applied. In the example shown, one molecule is strongly active (compound X, surrounded by the white circle).

2- compound X is then tested against the *[URE3]* prion using a similar colorimetric assay.

3- If active, it is then tested *ex vivo* for its ability to promote mammalian prion clearance using the various mammalian cell-based assays.

4- If active in the previous assay, it is then evaluated *in vivo* using a murine model for prion-based diseases.

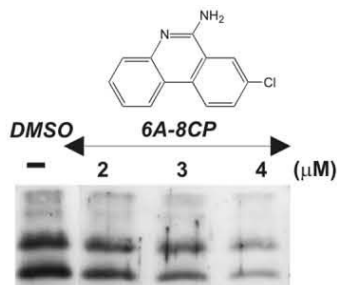
Note that the first two steps, which are yeast-based, allow high-throughput screening because they are simple, economic and safe (no need for highly secured laboratory).

2.4 Further confirmation of prion-curing activity of isolated molecules

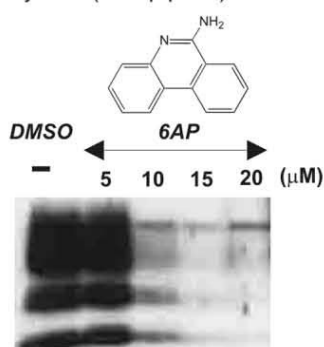
Anti-prion activity of isolated compounds should be further corroborated by curing experiments carried out in liquid medium. For this approach, *ERG6wt* *[PSI+]* rather

than *erg6Δ* *[PSI+]* cells should be used because the latter grow poorly in liquid culture. In addition, the *[psi-]* status of cured cells could be checked by performing biochemical experiments to look at the aggregation state of Sup35p using differential centrifugation followed by Western blot analysis as classically described [42]. Finally, efficient

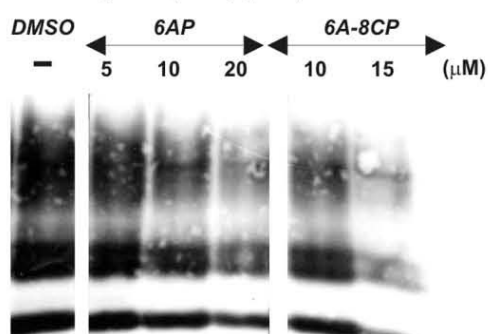
A. N2A system (murine prion)



B. Mov system (sheep prion)



C. Rov system (sheep prion)



cure of *[URE3]* can also be evaluated using another reporter system: *[URE3]* cells grow on USA medium, whereas *[ure3-0]* cells do not. By comparing the number of colonies in a synthetic medium supplemented with uracil (SD+Ura) where both *[URE3]* and *[ure3-0]* cells grow and on USA medium where only *[URE3]* cells grow an estimation of the curing effect of the isolated molecules could be achieved.

2.5 Evaluation of anti-mammalian prion activity of the most active compounds

Molecules active against both yeast prions are subsequently evaluated against mammalian prion. The active compounds are first tested for their ability to promote prion clearance in mammalian cell culture assays [18–20].

Figure 3. *Ex vivo* evaluation of anti-mammalian prion activity of the most active compounds.

- A.** Evaluation of 6A-8CP activity against the RML murine prion strain in murine neuroblastoma infected cells. Cells were treated during seven days with the indicated concentrations of 6A-8CP and then lysed. After proteinase K digestion, cell lysates were subjected to Western blot analysis to evaluate the level of remaining PrP (PrP^{Sc}). Note that 6A-8CP significantly promotes PrP^{Sc} clearance in a dose dependent manner as compared to DMSO-treated control cells.
- B.** Evaluation of 6AP activity against the 127S sheep prion strain in infected Mov cells (murine neuroglial cells expressing ovine PrP). Cells were treated during six days with the indicated concentrations of 6AP. The level of remaining PrP^{Sc} (an indication of curing efficiency) was evaluated by Western blot analysis after proteinase K digestion. 6AP is able to induce a substantial decrease in PrP^{Sc} accumulation in a dose dependent manner as compared to DMSO-treated control cells.
- C.** Evaluation of 6AP and 6A-8CP activity against the 127S sheep prion strain in infected Rov cells (rabbit kidney epithelial RK13 cells expressing ovine PrP). Cells were treated during six days with the indicated concentrations of 6AP or 6A-8CP. The level of remaining PrP^{Sc} (an indication of curing efficiency) was evaluated by Western blot analysis after proteinase K digestion. Both 6AP and 6A-8CP are able to induce a substantial decrease in PrP^{Sc} accumulation in a dose dependent manner as compared to DMSO-treated control cells.

As drugs active against one strain of prion may not be active against other strains [24], the possibility to test the selected compounds in three different infected cellular models should be considered. Indeed, molecules active in all these mammalian cell-based assays could be considered with a high degree of confidence as active against mammalian prion, at least *ex vivo*. Briefly, the first system [18, 19] is based on murine neuroblastoma chronically infected with the RML murine prion strain. The second system [20] is distinct at several levels. First, it is not based on neuroblastoma cells but rather on RK13 kidney epithelial cells; second, these cells are not from mouse but from rabbit (Rov cells); third, these cells replicate a sheep prion strain (scrapie strain 127S). An additional system based on murine peripheral neuroglial cells has been very recently described [15] and could also be used in further trials. Figure 3 shows that 6AP and 6A-8CP, in addition to efficiently promote PrP^{Sc} clearance in murine neuroblastoma system [1] (Fig. 3A), are also active in a dose-dependent manner in the rabbit epithelial based system (Rov) (Fig. 3B) and in the Mov system (Fig. 3C) described above. The next step will be to evaluate *in vivo* potency of these compounds by testing their activity against the progression of the disease in murine models of prion-based disorders [43].

2.6 Comparison of anti-prion activity of a set of compounds in both mammalian and yeast systems

To validate our yeast-based assay as an efficient high-throughput screening method for the isolation of molecules active against mammalian prion, we wanted to determine if drugs active against PrP^{Sc} in the mammalian *ex vivo* systems described above could also be active in our yeast-based assay. We found, for instance, that quinacrine and chlorpromazine, two drugs active in the mammalian systems, were also active in our *[PSI+]* and

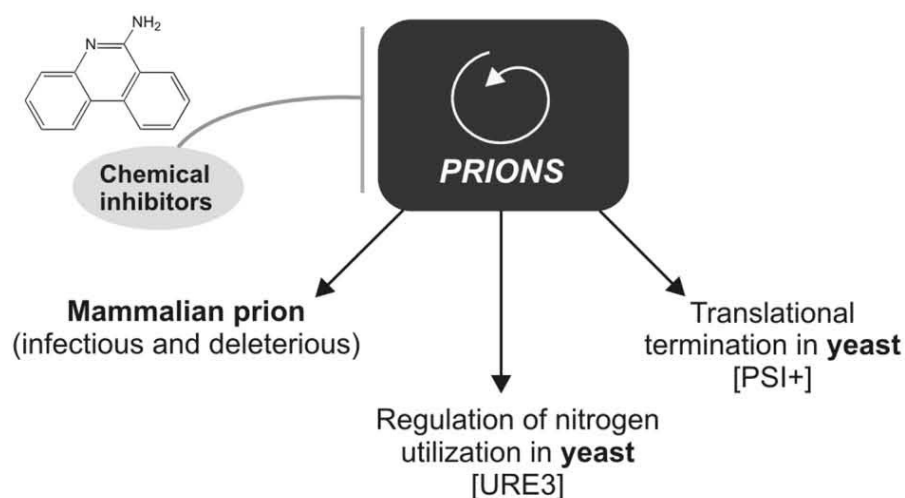


Figure 4. Model of conservation of biochemical pathways controlling prion formation and/or maintenance from yeast to mammals: a challenging black box!

[URE3] cells based assays [1]. Furthermore, a good correlation was found between results obtained in both systems: acepromazine which was shown to be slightly active in the mammalian system also exhibited a weak activity in our yeast-based assay and molecules inactive in the mammalian assay like carbamazepine, imipramine, haloperidol, chlorprothixene or methylene blue were also inactive in our assay [1]. These results underline the similarity between yeast and mammalian prion propagation and/or maintenance mechanisms (Fig. 4).

3 Discussion

Our data strongly suggest that the biochemical mechanisms controlling formation and/or maintenance of prions in mammals and in budding yeast share common features which may have been conserved throughout the evolution. Budding yeast thus constitutes an appropriate model to study the prion world and to screen for pharmacological inhibitors able to counteract the deleterious effects of mammalian prion. Such molecules should be of great utility in combatting prion-based diseases, not only in human, but maybe also in animals (for livestock as well as for wild animals as some of these diseases also affect deer, bison, lynxes and elks in North America [44]). Moreover, the potential interest of these molecules may not be limited to prion-based diseases but could probably be extended to a variety of other amyloid-based pathologies like Alzheimer's ($A\beta$ and tau), Parkinson's (α -synuclein) and Huntington's (huntingtin) diseases. Indeed, these pathologies display a number of features common with prion-based diseases: they all can be considered as "protein folding diseases" and thus could share a number of similar characteristics [45] and mechanisms of control [46]. As an example it has been recently shown that huntingtin aggregation and prions are linked in a budding

yeast model for Huntington disease [47–49]. Huntingtin aggregates have been obtained in budding yeast. These aggregates were toxic for yeast, but toxicity and aggregate formation occurred only in cells where another protein is under its prion conformation ([RNQ+] phenotype) showing that, at least in this rather artificial system, a variety of distinct amyloid fibers-based diseases appears to share some common control mechanisms [50]. Very recently, a yeast-based assay has been developed to screen for small molecules able to inhibit polyglutamine aggregation and neurodegeneration in Huntington's disease neurons [51]. It would be very interesting to test, in our various assays compounds isolated using this method and *vice versa*.

What is the mechanism of action of quinacrine, chlorpromazine and of our active compounds? We noticed that, in both murine neuroblastoma- and yeast-based systems, cells need to be treated for at least about six generation times in order to observe prion clearance. These observations contrast with those made with multicyclic anionic compounds like Congo red that directly binds to the β -sheet structures of amyloidogenic proteins and therefore promotes prion clearance presumably by quenching the build-up of PrP^{Sc} [52]. The latter compounds only require a few hours of treatment in murine neuroblastoma chronically infected with the RML murine prion strain [53]. This difference suggests that quinacrine, chlorpromazine and our active molecules do not act directly (*in cis*) on prion aggregates but rather on the biochemical pathway(s) required for prion formation and/or maintenance (*in trans*). However, using various yeast prion- or mammalian prion-based *in vitro* systems, it is possible to test the potential ability of isolated molecules to act directly on amyloid fibers by promoting their resolubilization and/or by preventing their assembly. The difference in treatment duration also suggests the possibility that quinacrine, chlorpromazine and our active molecules could be active

only in growing cells. At this stage, it remains unclear whether the same drugs can work on non-growing cells (like neurons). For this reason we also developed the use of a rabbit cell-based assay (Rov cells) described above. Indeed, in this system when drugs are applied to cell culture, cells already reached confluency (thus these are not growing cells). In addition, to clarify this point, we are now testing our best compounds *in vivo* on animal models for prion-based diseases.

We are also currently focusing our work on the identification of the intracellular biochemical targets of our drugs which we expect to be conserved in mammals, using both genetic and biochemical approaches. Beside the obvious fundamental interest to identify biochemical mechanisms involved in prion appearance and/or propagation, these cell components, once identified, could become molecular targets for the development of a highly selective, mechanism-based, cell-free screening assays.

To finish, our system represents an additional example of the screening methods successfully using yeast as a pharmacological tool to screen for drugs active for the treatment of human diseases [54]. We anticipate that "humanized yeast models" for human diseases will be more and more commonly used in the next future in the drug screening field.

This work was carried out in the laboratory of Dr. Laurent Meijer who is warmly acknowledged for his continuing support. We also thank S.J. Saupe and M. Koken for critical reading of the manuscript and members of our laboratories for helpful discussions. This article is dedicated to the memory of Pr. Dominique DORMONT, with whom some of the work presented here was carried out. This research was supported by the GIS "Infections à prions" from the French "Ministère de la Recherche", a PRIR from the "Conseil Régional de Bretagne", an ACI "Jeune Chercheur" from the french "Ministère de la Recherche", a grant from "CRITT Santé Bretagne" and an "Ingénieur de valorisation" fellowship from the CNRS

4 References

- [1] Bach, S.; Talarek, N.; Andrieu, T.; Vierfond, J. M.; *et al.*, Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay, *Nat. Biotechnol.* 2003, *21*, 1075–1081.
- [2] Prusiner, S. B.; Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science* 1982, *216*, 136–144.
- [3] Prusiner, S. B.; Prions, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, *95*, 13363–13383.
- [4] Madslein, M. L.; Dos Reis, S.; Duvezin-Caubet, S.; Coulyar-Salin, B.; *et al.*, Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, *99*, 7402–7407.



Marc Blondel is Senior Research Investigator in the Amyloids and Cell Division Cycle Group of the CNRS in Roscoff, France. After his education at the Swiss Institute of Cancer Research, Epalinges, Switzerland and the Cell Cycle Lab, SBGM, Gif sur Yvette in France, he completed his "Habilitation à Diriger des Recherches" in 2004 at the University of Occidental Brittany.

He has published numerous papers in major journals and holds 3 patents with 2 further patents in preparation.

Areas of expertise: drug screening, cell cycle/cancer, prion-based diseases, neurodegenerative diseases, budding yeast

- [5] King, C. Y.; Diaz-Avalos, R.; Protein-only transmission of three yeast prion strains, *Nature* 2004, *428*, 319–323.
- [6] Tanaka, M.; Chien, P.; Naber, N.; Cooke, R.; *et al.*, Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences, *Nature* 2004, *428*, 323–328.
- [7] Castilla, J.; Saa, P.; Hetz, C.; Soto, C.; In vitro generation of infectious scrapie prions, *Cell* 2005, *121*, 195–206.
- [8] Cohen, F. E.; Pan, K. M.; Huang, Z.; Baldwin, M.; *et al.*, Structural clues to prion replication, *Science* 1994, *264*, 530–531.
- [9] Wille, H.; Michelitsch, M. D.; Guenebaut, V.; Supattapone, S.; *et al.*, Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, *99*, 3563–3568.
- [10] Coustou, V.; Deleu, C.; Saupe, S.; Begueret, J.; The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, *94*, 9773–9778.
- [11] Wickner, R. B.; [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science* 1994, *264*, 566–569.
- [12] Aguzzi, A.; Miele, G.; Recent advances in prion biology, *Curr Opin Neurol* 2004, *17*, 337–342.
- [13] Weissmann, C.; Aguzzi, A.; Approaches to therapy of prion diseases, *Annu Rev Med* 2005, *56*, 321–344.
- [14] Cashman, N. R.; Caughey, B.; Prion diseases—close to effective therapy?, *Nat Rev Drug Discov* 2004, *3*, 874–884.
- [15] Archer, F.; Bachelm, C.; Andreoletti, O.; Besnard, N.; *et al.*, Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection, *J Virol* 2004, *78*, 482–490.
- [16] Bertsch, U.; Winkhofer, K. F.; Hirschberger, T.; Bieschke, J.; *et al.*, Systematic identification of anti-prion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets, *J Virol* 2005, *79*, 7785–7791.
- [17] Doh-Ura, K.; Iwaki, T.; Caughey, B.; Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation, *J Virol* 2000, *74*, 4894–4897.
- [18] Korh, C.; May, B. C.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, *98*, 9836–9841.
- [19] Nishida, N.; Harris, D. A.; Vilette, D.; Laude, H.; *et al.*, Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein, *J Virol* 2000, *74*, 320–325.
- [20] Vilette, D.; Andreoletti, O.; Archer, F.; Madelaine, M. F.; *et al.*, Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous

- epithelial cells expressing ovine prion protein, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, *98*, 4055–4059.
- [21] May, B. C.; Fafarman, A. T.; Hong, S. B.; Rogers, M.; *et al.*, Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines, *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, *100*, 3416–3421.
- [22] Collins, S. J.; Lewis, V.; Brazier, M.; Hill, A. F.; *et al.*, Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model, *Ann. Neurol.* 2002, *52*, 503–506.
- [23] Barret, A.; Tagliavini, F.; Forloni, G.; Bate, C.; *et al.*, Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases, *J Virol* 2003, *77*, 8462–8469.
- [24] Kocisko, D. A.; Baron, G. S.; Rubenstein, R.; Chen, J.; *et al.*, New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products, *J Virol* 2003, *77*, 10288–10294.
- [25] Kocisko, D. A.; Morrey, J. D.; Race, R. E.; Chen, J.; *et al.*, Evaluation of new cell culture inhibitors of protease-resistant prion protein against scrapie infection in mice, *J Gen Virol* 2004, *85*, 2479–2483.
- [26] Bach, S.; Talarek, N.; Vierfond, J.-M.; Mettey, Y.; *et al.*, Criblage de molécules à activité anti-prion : kits, méthodes et molécules criblées, *Demande de Brevet international PCT/FR03/03101* 2003.
- [27] Uptain, S. M.; Lindquist, S.; Prions as protein-based genetic elements, *Annu Rev Microbiol* 2002, *56*, 703–741.
- [28] Paushkin, S. V.; Kushnirov, V. V.; Smirnov, V. N.; Ter-Avanesyan, M. D.; Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor, *EMBO J.* 1996, *15*, 3127–3134.
- [29] Patino, M. M.; Liu, J. J.; Glover, J. R.; Lindquist, S.; Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast, *Science* 1996, *273*, 622–626.
- [30] Couzin, J.; Molecular biology. In yeast, prions' killer image doesn't apply, *Science* 2002, *297*, 758–761.
- [31] True, H. L.; Lindquist, S. L.; A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity, *Nature* 2000, *407*, 477–483.
- [32] Masison, D. C.; Wickner, R. B.; Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells, *Science* 1995, *270*, 93–95.
- [33] Glover, J. R.; Kowal, A. S.; Schirmer, E. C.; Patino, M. M.; *et al.*, Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI+], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*, *Cell* 1997, *89*, 811–819.
- [34] Tuite, M. F.; Mundy, C. R.; Cox, B. S.; Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 1981, *98*, 691–711.
- [35] Eaglestone, S. S.; Ruddock, L. W.; Cox, B. S.; Tuite, M. F.; Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, *97*, 240–244.
- [36] Ferreira, P. C.; Ness, F.; Edwards, S. R.; Cox, B. S.; *et al.*, The elimination of the yeast [PSI+] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation, *Mol Microbiol* 2001, *40*, 1357–1369.
- [37] Jung, G.; Masison, D. C.; Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: a possible explanation for its effect in curing yeast prions, *Curr Microbiol* 2001, *43*, 7–10.
- [38] Chernoff, Y. O.; Lindquist, S. L.; Ono, B.; Inge-Vechtomov, S. G.; *et al.*, Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+], *Science* 1995, *268*, 880–884.
- [39] Tuite, M. F.; Cox, B. S.; Propagation of yeast prions, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, *4*, 878–890.
- [40] Blondel, M.; Galan, J. M.; Chi, Y.; Lafourcade, C.; *et al.*, Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4, *EMBO J.* 2000, *19*, 6085–6097.
- [41] Schlumpberger, M.; Prusiner, S. B.; Herskowitz, I.; Induction of distinct [URE3] yeast prion strains, *Mol Cell Biol* 2001, *21*, 7035–7046.
- [42] Chernoff, Y. O.; Uptain, S. M.; Lindquist, S. L.; Analysis of prion factors in yeast, *Methods Enzymol* 2002, *351*, 499–538.
- [43] Brown, P.; Drug therapy in human and experimental transmissible spongiform encephalopathy, *Neurology* 2002, *58*, 1720–1725.
- [44] Haigh, J. C.; Mackintosh, C.; Griffin, F.; Viral, parasitic and prion diseases of farmed deer and bison, *Rev Sci Tech* 2002, *21*, 219–248.
- [45] Jarrett, J. T.; Lansbury, Jr., P. T.; Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell* 1993, *73*, 1055–1058.
- [46] Buxbaum, J. N.; Diseases of protein conformation: what do in vitro experiments tell us about in vivo diseases?, *Trends Biochem. Sci.* 2003, *28*, 585–592.
- [47] Krobitsch, S.; Lindquist, S.; Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, *97*, 1589–1594.
- [48] Osherovich, L. Z.; Weissman, J. S.; Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI(+)] prion, *Cell* 2001, *106*, 183–194.
- [49] Meriin, A. B.; Zhang, X.; He, X.; Newnam, G. P.; *et al.*, Huntingtin toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1, *J. Cell Biol.* 2002, *157*, 997–1004.
- [50] Derkatch, I. L.; Bradley, M. E.; Hong, J. Y.; Liebman, S. W.; Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)], *Cell* 2001, *106*, 171–182.
- [51] Zhang, X.; Smith, D. L.; Meriin, A. B.; Engemann, S.; *et al.*, A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, *102*, 892–897.
- [52] Caughey, B.; Race, R. E.; Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red, *J Neurochem* 1992, *59*, 768–771.
- [53] Supattapone, S.; Nguyen, H. O.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; *et al.*, Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, *96*, 14529–14534.
- [54] Mager, W. H.; Winderickx, J.; Yeast as a model for medical and medicinal research, *Trends Pharmacol Sci* 2005, *26*, 265–273.

Article 2



A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions

Stéphane Bach^a, Déborah Tribouillard^b, Nicolas Talarek^c, Nathalie Desban^b,
Fabienne Gug^d, Hervé Galons^d, Marc Blondel^{b,*}

^a CNRS, Station Biologique, UPS2682, Place G. Teissier, 29680 Roscoff, Bretagne, France

^b CNRS, Station Biologique, UMR7150, Place G. Teissier, 29680 Roscoff, Bretagne, France

^c Department of Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

^d Laboratoire de Chimie Organique 2, INSERM U648, Université René Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Accepted 24 April 2006

Abstract

Recently, we have developed a yeast-based (*Saccharomyces cerevisiae*) assay to isolate drugs active against mammalian prions. The initial assumption was that mechanisms controlling prion appearance and/or propagation could be conserved from yeast to human, as it is the case for most of the major cell biology regulatory mechanisms. Indeed, the vast majority of drugs we isolated as active against both [PSI⁺] and [URE3] budding yeast prions turned out to be also active against mammalian prion in three different mammalian cell-based assays. These results strongly argue in favor of common prion controlling mechanisms conserved in eukaryotes, thus validating our yeast-based assay and also the use of budding yeast to identify anti-prion compounds and to study the prion world.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Prion; Screening assay; Budding yeast; [PSI⁺]; [URE3]; ERG6

1. Introduction

To date, there is no efficient treatment for prion-based diseases [1,2]. Designing efficient therapeutic approaches is made difficult by a number of problems. First, the nature of the infectious agent (the prion) is not fully and unambiguously identified. Second, the mechanisms of prion-mediated toxicity are still poorly understood. Third, the diagnosis is very difficult to establish firmly and can be made usually only at later stages, after the onset of severe clinical symptoms. This point raises the important question whether the neurodegenerative process can still be reversed efficiently at this stage and even if so, whether it is not already too late to provide a real therapeutic benefit to the patient. Interestingly, a partial but significant answer to this last question has been obtained using mice where the *PRNP* gene (encoding for PrP protein) can be turned off. The depletion

of PrP^C from neurons of prion-infected mice not only prevented progression of clinical disease, but also reversed spongiosis [3]. Thus, therapy aimed at reducing endogenous PrP^C or PrP^{Sc} levels may well be effective after the appearance of symptoms.

Based on the assumption that PrP^{Sc} corresponds to (or is part of) the pathogenic entity, or at least the infectious agent, various avenues for finding therapies for prion-based diseases, aiming at reducing PrP^C or PrP^{Sc} levels, are currently explored. Among these approaches are active or passive vaccinations. These are based on the observations that anti-PrP antibodies inhibit formation of PrP^{Sc} in a cell-free system [4] and also that anti-PrP antiserum reduces the infectious titer of hamster brain homogenates about a hundredfold [5]. Other approaches aim at the identification of compounds able to stabilize PrP^C, destabilize PrP^{Sc}, or prevent conversion from PrP^C to PrP^{Sc} and thereby decrease the level of PrP^{Sc}. Some of these approaches are based on the use of cell-free systems [6–9], whereas other are based on the use of mammalian cells chronically infected with

* Corresponding author. Fax: +33 0 2 98 29 25 26.

E-mail address: blondel@sb-roscoff.fr (M. Blondel).

PrP^{Sc} [10–13]. In these last assays, the presence of PrP^{Sc} is monitored by the proteinase K sensitivity assay. Although clearly useful, these various cell-based assays are not easily amenable to high-throughput screening, in particular because experiments have to be done in highly secured laboratories. The possibility to screen large chemical libraries appears to be important. For these reasons, we developed a rapid and economical budding yeast-based two step assay to screen for antiprion drugs [14]. Our initial assumption was that mechanisms controlling prion appearance and/or propagation could be conserved from yeast to human. Indeed, most of the drugs we isolated as active against budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) prions turned out to be also active to promote PrP^{Sc} clearance in three different mammalian cell-based assays [10–13]. In addition, most of the compounds isolated as active in mammalian cell-based assays that we tested were also found to be active in the yeast-based assay [14]. Taken together, these results strongly suggest the existence of prion controlling mechanism(s) conserved from yeast to human, thus validating yeast as an appropriate model to study prion appearance and propagation but also the yeast-based approach to efficiently detect compounds active against mammalian prion from large chemical libraries. Furthermore the yeast-based method can also be used to rapidly make comprehensive structure–activity relationship (SAR) studies for already identified active molecules.

The general principles of our two steps yeast-based method have been already described elsewhere [14]. Briefly the two steps are based on the use of a white or red colonies coloration system. Yeast cells, when unable to synthesize adenine due to inactivation of the *ADE1* or *ADE2* genes (two genes encoding for enzymes involved in the adenine biosynthesis pathway), produce red colonies on rich (YPD) medium because of the accumulation of metabolic by-products of the adenine biosynthesis pathway (these metabolic by-products, after oxidation, appear red). The first step of the screening is based on the [*PSI*⁺] phenotype that corresponds to the prion state of Sup35p, a subunit (also called eRF3) of the eukaryotic release factor. In [*PSI*⁺] cells, Sup35p is mainly sequestered into protein aggregates and thus unavailable to function in translation termination. As a result, ribosomes have an increased tendency to read through stop codons. A convenient reporter system to monitor this heritable change in protein synthesis fidelity is the use of *ade1-14* allele in which an opal stop codon (UGA) replaces the UGG (Trp) codon at position 240 in the open reading frame (ORF) of the *ADE1* gene [15]. Because of the ability of ribosomes to read through stop codons in [*PSI*⁺] cells, these cells produce functional Ade1p enzyme and thus are able to grow on adenine-deficient medium (SD-Ade) and to form white colonies on rich medium, in spite of being genetically auxotrophic for adenine. In contrast, in [*psi*⁻] cells where Sup35p is in its normal soluble form, translation of the *ade1-14* allele terminates at the opal codon hence preventing cells from growing on SD-Ade and leading to red colonies on YPD

medium. Thus, starting from [*PSI*⁺] cells forming white colonies on YPD, the criteria used for drug libraries screening is the ability of the tested molecules, to shift colonies coloration from white to red. A secondary screen based on the [*URE3*] prion, which correspond to the prion state of Ure2p protein, was implemented by adapting a previously designed strain [16] (see the article by Brachman et al. in this issue). Briefly, the ORF of the *DAL5* gene was replaced by that of the *ADE2* gene in an *ade2Δ* [*URE3*] strain. The *DAL5* gene is not transcribed when Ure2p is active. Hence, if Ure2p is inactivated by a prion mechanism ([*URE3*] cells), *ADE2* is actively transcribed, resulting in the formation of white colonies on YPD medium whereas [*ure-o*] cells form red colonies.

2. Description of method

2.1. Yeast strains

Convenient strains for the primary [*PSI*⁺]-based screen are “weak” and “strong” variants of the 74-D694 strain [17]. A strong 74-D694 strain usually gives better results than a weak 74-D694 strain because of the clearer difference in coloration between [*psi*⁻] and [*PSI*⁺] colonies due to the strength of the prion strain. Conversely, the use of a weak variant can be considered, as the prion may be less stable and thus easier to eliminate (Sup35p is less intensively aggregated). Standard yeast growth conditions and genetic manipulations are as described [18,19]. The cornerstone of the method is the use of small sterile filters similar to those used for antibiograms. [*PSI*⁺] cells (forming white colonies) are spread on a YPD solid medium (12 cm × 12 cm Petri plates are the most convenient to test many different drugs on the same plate and to have an easy square grid that allows testing of 30 different compounds together with controls—see Fig. 1). These small (6 mm of diameter) filters (Schleicher and Schuell, references: 10321260—for volumes up to 20 μl, or 10321860—for volumes up to 8 μl) are deposited on the top of the agar surface. A different compound from the chemical library to screen is spotted on each filter. This compound then diffuses in the surrounding medium, establishing a full concentration gradient. The size of the halo of red colonies should thus be proportional to the activity of the corresponding compound, as long as the compounds have the same ability to diffuse into the agar medium. In addition, drugs active against yeast prions but toxic at high concentration will result in a halo of non-growing cells surrounded by a crown of red colonies (Fig. 1B). Thus, in a simple experiment, semi-quantitative information on activity and toxicity can be obtained. The quantity of [*PRION*⁺] cells to spread on Petri plates has been optimized for each strain as indicated below.

Budding yeast cells exhibit a limited permeability to a number of chemical compounds, probably because, in addition to a plasma membrane, they are also surrounded by a cell wall. In addition, compared to higher eukaryotic cells, yeast cell membrane has a special lipid composition. Sev-

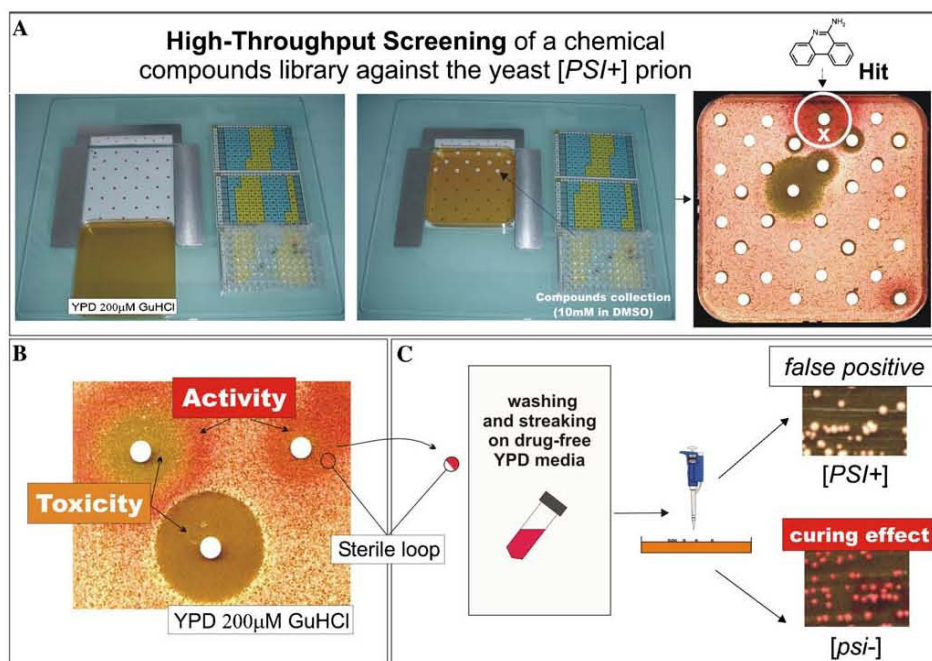


Fig. 1. (A) Screening system: a square Petri plate (12 cm × 12 cm) containing YPD solid medium supplemented with GuHCl to a final concentration of 200 µM is positioned onto a 32 position grid. Small filters (similar to the one used for antibiograms) are added on the top of agar surface according to the grid. Compounds from a 96-well plate organized chemical library are deposited (2–5 µl of a 5–10 mM solution in DMSO) one on each filter except on the top left filter where the negative control (DMSO, the compounds vehicle) and on the bottom right filter where the positive control (GuHCl, 5 µl of a 300 mM solution in DMSO) are added. Plates are then incubated for three days at 25 °C, followed by 1–3 days at 4 °C and then photographed. On the example shown, in addition to the positive control (bottom right filter), one compound (X) is active (a halo of red colonies appears around the filter) whereas several others are toxic (halos of non-growing cells that appear brown/orange—the color of the YPD medium—around the filter). (B) In one simple experiment a compound toxic at high concentration but active at lower concentration can be visualized. The molecules deposited on the top left and the bottom filters are toxic at high concentration but, in contrast to the last one, the first one is active against yeast prions at sub-toxic concentration: a crown of red colonies appears around a halo of non-growing cells (which reveals the orange/brown color of the medium). Note that the compound deposited on the top right filter is active and not toxic, even at the higher concentration (in the immediate vicinity of the filter). (C) A simple assay to eliminate false positive compounds interfering with the colorimetric assay. Cells from the red halo are picked up with a sterile loop, washed in sterile water and then streaked on drug-free YPD medium. If they form white colonies (top panel), it means that the corresponding drug was acting on the colorimetric reporter system (e.g., by inhibiting Ade1p or Ade2p enzymes). In contrast, if these cells form red colonies, the corresponding molecule is a good candidate for being active against yeast prions.

eral genetic tricks allow circumventing this permeability problem. One example is the inactivation of one or several of the *PDR* genes encoding ATP-binding cassette (ABC) transporters (or transcription factors controlling their expression) which in yeast, by mediating drug efflux as in higher eukaryotes, are involved in multi-drug resistance (MDR) [20]. Other ways to increase the limited permeability of yeast cells aim to alter membrane and/or cell wall composition thereby directly affecting cell permeability. In this category lies the inactivation of the *ERG6* gene. The *ERG6* gene encodes for a sterol methyltransferase, which acts in the last steps of ergosterol biosynthesis. Limited permeability of yeast cells to small molecules is thought to be related, at least in part, to the unique sterol composition of fungal membranes, which are enriched in the steroid ergosterol. *erg6Δ* cells thus have an altered membrane composition and, as a result, exhibit increased permeability to a growing list of chemical compounds, in particular to small lipophilic drugs [21]. For example, the 26S proteasome inhibitor MG132 or the vesicular traffic inhibitor Brefeldin

A are not active in wild-type (WT) cells whereas they are very active when applied to *erg6Δ* cells [22,23]. For this reason, we decided to delete the ORF of the *ERG6* gene in a strong variant of 74-D694. This strain is auxotrophic for tryptophan (it contains the *trp1-289* allele of the *TRP1* gene, Table 1). Inactivation of the *TRP1* gene is synthetically lethal (or at least synthetically sick) with inactivation of the *ERG6* gene ([24] and our personal observations), most probably because ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane [25]. For these reason, we replaced the ORF of the *ERG6* gene by the *TRP1* genetic marker therefore ensuring that *erg6Δ* transformants are able to synthesize their own tryptophan. In addition, the absolute genetic link between the *ERG6* gene inactivation and the *TRP1* genetic marker allows easier genetic crosses with *trp1Δ* strains as all *erg6Δ* segregants obtained are also *TRP1*^{wt}. Hence, the genotype of the *erg6Δ* [*PSI*⁺] “strong” strain (STRg6) we created is as follows: *Mata, ade1-14, trp1-289, his3Δ200, ura3-52, leu2-3,112, erg6::TRP1, [PSI*⁺].

Table 1
Strain list

Strain name	Relevant genotype	Source
74-D694	<i>Mata, ade1-14, trp1-289, his3 Δ 200, ura3-52, leu2-3,112, [PSI⁺]</i>	[17]
STRg6	<i>Mata, ade1-14, trp1-289, his3 Δ 200, ura3-52, leu2-3,112, erg6::TRP1, [PSI⁺]</i>	[14]
CC34	<i>Mata, ade2-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, [URE3]</i>	[26]
NT34	<i>Mata, ade2-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, dal5::ADE2, [URE3]</i>	[14]
SB35	<i>Mata, ade2-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, dal5::ADE2, erg6::TRP1, [URE3]</i>	[14]
NT35	<i>Mata, ade2-1::KanMX, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, dal5::ADE2, erg6::TRP1, [URE3]</i>	[14]

For the secondary screen, we adapted a rationale previously used [16] in a CC34 strain (*Mata, ade2-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, [URE3]* strain [26]). In this strain, the ORF of the *DAL5* gene was replaced by that of the *ADE2* gene. In addition, the *ade2-1* gene was replaced by the *KanMX* marker to avoid possible interference of a putative [*PSI⁺*] appearance on red/white colony coloration in this strain. Finally, the ORF of the *ERG6* gene was replaced by the *TRP1* marker in order to increase cell permeability. In this NT35 strain (*Mata, ade2-1::KanMX, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, dal5::ADE2, erg6::TRP1, [URE3]*), if *Ure2p* is inactivated by a prion mechanism ([*URE3*] cells), *ADE2* is actively transcribed, resulting in the formation of white colonies on YPD medium whereas [*ure-o*] cells form red colonies.

Concerning the storage and the use of the *erg6Δ* strains generated, it is important to note that, probably due to their altered plasma membrane lipid composition, they exhibit a number of pleiotropic phenotypes, including low transformation efficiency, reduced growth rate and low ability to recover from stationary phase [24]. These phenotypes are largely dependent on the genetic background. For example, the NT35 strain grows nearly like isogenic WT cells, whereas the STRg6 strain exhibits a significantly reduced growth rate and, in addition, recovers very poorly from even a very short passage in stationary phase. For this reason, the STRg6 strain should be kept in exponential phase of growth by restreaking it every two days on a fresh synthetic medium lacking tryptophan (SD-Trp) and incubated at 25 °C.

2.2. Practical approach of the screening assay

The quantity of STRg6 (primary [*PSI⁺*]-based screen) and NT35 (secondary [*URE3*]-based screen) cells to spread have been optimized in order to have a nice layer of colonies: an excessive number of colonies reduces the possible number of generations for the cells which are spread (therefore potentially reducing the chance to have an efficient cure) whereas an insufficient number of cells decreases the possibility to obtain a nice, clear and sharp red halo. About 350–400 μl of a STRg6 liquid YPD culture grown at 25 °C ($OD_{600\text{nm}} = 0.5$) should be spread on a 144 cm² (12 cm × 12 cm) square Petri plate (CML, reference: BP124S14) whereas, in the case of NT35, 150–200 μl of a liquid YPD culture grown at 25 °C ($OD_{600\text{nm}} = 0.5$) should be used.

The medium used is classical YPD medium (see below). It appears that the type of yeast extract used for medium preparation can have some effect on the intensity of the red coloration of [*prion⁻*] colonies. The optimal coloration was obtained with Fisher Scientific Labosi yeast extract (reference: A8080540). Another modification to the YPD medium recipe is the addition of sub-efficient dose of guanidine hydrochloride (GuHCl). GuHCl is a chemical inhibitor of Hsp104p [27–29], a protein chaperone essential for propagation of prions in budding yeast [17] by leading to prion aggregates shearing, therefore allowing seed “replication”. Inhibition of Hsp104p and curing effect requires treatment with 2–5 mM of GuHCl for cells maintained in exponential phase of growth for at least six generation times. Hsp104p is not a good screening target for antiprion assays, as it does not seem to be conserved in vertebrates. For this reason, we tested the effect of adding sub-effective doses of GuHCl in the YPD medium [14]. We found that the activity of all the compounds we isolated so far is strongly synergized by such a sub-effective dose of GuHCl. This synergy suggests that all these active molecules act on pathway(s) distinct from the GuHCl-sensitive Hsp104p pathway. As most of these drugs also turned out to be active to promote mammalian prion clearance in the three mammalian cell-based assays described above, we believe these pathways to be conserved from yeast to human (see Concluding remarks). A GuHCl dose of 200 μM (about 5–10% of the active dose for inhibition of Hsp104p) was determined as optimal screening conditions (enhanced sensitivity and good white/red contrast). Higher doses, although increasing the activity of compounds, also enhances the background coloration (which turns from white to pink). Thus the recipe we use for YPD medium is as follows (for one liter): 10 g Bacto Yeast Extract (Fisher Labosi Scientific, reference: A8080540), 20 g Bacto Peptone (Difco, reference: 211677), 20 g D-glucose monohydrate (Fluka, reference: 49160), 20 g Bacto Agar (Difco, reference: 214010)—for solid medium, completed to 1 L with distilled water. The media are sterilized by autoclaving for 20 min at 120 °C. After autoclaving, agar containing media are cooled down to about 50–60 °C, GuHCl (650 μl of a 300 mM stock solution in DMSO to reach a final concentration of 200 μM) is added and the plates are poured.

A grid with 32 positions for positioning the small filters was also optimized: it allows testing of 30 different compounds (2–5 μl of a 10 mM solution—or 1 mg/ml for natural extracts—in DMSO) unambiguously, in addition to one

negative control (DMSO, the vehicle of most of the chemical libraries compounds, top left filter) and one positive control (GuHCl, 5 μ l of a 300 mM solution, bottom right filter) per Petri plate.

A very convenient and popular way to organize chemical compound collection is to use 96-well plates where compounds (80 per plate) are displayed one in each position, except in the first and last column (dedicated to controls in automatized screening assays). Usually, the compounds are at a concentration of 10 mM (sometimes 5 mM) and dissolved in DMSO. It is convenient to organize a conversion grid between the 96-wells plate (80 different compounds) and the Petri plate (30 different positions). Using these various adaptations of the system, a single person can manually test up to 500 molecules a day.

The Petri plates are then incubated at 25 °C for three days and then incubated for one to three days at 4 °C to allow reinforcement of the red coloration. Indeed, AIR, a metabolic byproduct that is accumulated when the adenine biosynthesis pathway is interrupted at the level of the Ade1p or Ade2p enzymes, needs to be oxidized in order to appear red. This oxidation occurs mainly in stationary phase which occurs more rapidly at 4 °C. After incubation at 4 °C, Petri plates can be observed and directly digitalized on a scanner.

A picture of a convenient system as currently used in the laboratory is shown in Fig. 1A.

2.3. Elimination of false positives

A number of false positives including, in particular, compounds interfering with the white/red reporter system, could potentially be picked up. For example, in principle, all drugs able to inhibit the enzymatic activity or expression of the Ade1p or Ade2p enzymes should also lead to the formation of red colonies. These false positives are easy to eliminate, as their effect on colony coloration should be reversed when drugs are removed. Indeed, by just picking cells from colonies in the red halos (using a sterile loop), washing them in drug-free sterile water or YPD medium and then streaking them on a fresh, drug-free, YPD medium, it is possible to observe whether the tested compounds act directly on the reporter system (Fig. 1C). If cells from the initial red colonies now form white colonies, the corresponding chemical compound is interfering with the colorimetric system. In contrast, if they (all, most of them or at least a large fraction) still form red colonies, the corresponding drug probably acted on yeast prions. To confirm this, the curing effect should also be checked directly, for example, in the $[PSI^+]$ -based primary screen by determining the aggregation state of the prion protein using ultracentrifugation [15]. Whereas, in extracts of $[PSI^+]$ cells, most of the Sup35p protein is found in the pellet fraction, it should be largely found in the soluble fraction in $[psi^-]$ cell extracts. In addition, to confirm the curing effect, other reporter systems can be used to monitor the prion state including the ureidosuccinic acid (USA) reporter system for

$[URE3]$ [15]. Indeed, as the $[URE3]$ prion enables *ura2* cells, which are normally unable to grow on medium lacking uracil, to import USA (via the Dal5p transporter) and make uracil, $[URE3]$ strains (like CC34, Table 1) grow on USA-containing medium (15 mg/l) whereas $[ure-o]$ cells do not. By comparing the number of colonies in a minimal medium supplemented with uracil (SD+Ura) where both $[URE3]$ and $[ure-o]$ cells grow and on USA medium where only $[URE3]$ cells grow, the curing effect of the considered compound can be evaluated.

2.4. Testing active compounds against mammalian prion

Once isolated from the chemical libraries, the few compounds active against both yeast prions have to be tested against mammalian prion. This can be done using first the three *ex vivo* mammalian cell-based assays mentioned in the introduction. The use of all the three different systems should be considered as they exhibit significant differences (murine vs. sheep-based prions, epithelial vs. neuroglial cells, and murine vs. rabbit cells), which make them attractive. Hence, an activity in each these three different systems provides a lot of confidence concerning the activity of the corresponding compound against mammalian prion. Indeed, by comparing activity of various compounds able to lead to PrP^{Sc} clearance in both murine N2a cells infected by murine prion (RML or 22L prion strains) and rabbit Rov9 cells infected with sheep scrapie, it has been shown very recently that the mouse N2A cell-based system is both clearly the most sensitive system, but also, at the same time, the less stringent [30]. Among 41 drugs active in the N2a cell-based assays tested, only three turned out to be also clearly active in the Rov9 cell-based system. An activity in the Rov9-based system thus appears to be a good indicator. In addition, in the Rov9-based system, when drugs are applied to cell culture, cells already reached confluency, thus these are not growing cells which could appear as a better model for non-growing cells like neurons.

The few molecules active both against yeast prions and in mammalian cell-based assays should then be tested *in vivo* in murine- (or generally rodent) based models for prion-based diseases. A number of different models exist in which the nature of the infecting prion (ovine scrapie, murine scrapie, human PrP^{Sc}...) the mode of infection (intraperitoneal or intracerebellar injection) or the level of PrP expression (constitutively or inducibly expressed) vary [31]. Interestingly, by varying the time of the beginning of the treatment (before, during or after the infection or even after the beginning of the first clinical symptoms), various effects can be tested (activity in prophylaxis, to promote reversion of the clinical signs and eventually on the survival).

3. Concluding remarks

Most of the compounds isolated so far using the yeast-based method turned out to be also active against mamma-

lian prion, at least in the various cell-based assays described before ([14] and N. Desban, D. Vilette and M. Blondel, unpublished results). Conversely, most molecules already known as active to promote mammalian PrP^{Sc} clearance and that were tested were also found to be active against both [PSI⁺] and [URE3] yeast prions [14]. Hence, the yeast method clearly allows high-throughput approaches, as it is fast, efficient and cheap. Furthermore, the turnover of the method can be increased significantly by automating various steps like sterile filters deposition and drugs distribution. Taken together, these results validate the use of this yeast system to screen large chemical libraries for compounds potentially active for the treatment of prion-based diseases in mammals.

The fact that most of the molecules isolated in the yeast-based assay are also active against mammalian prion provides a strong support to the hypothesis that they probably act on common prion controlling mechanisms, which are conserved from yeast to human. These observations clearly validate the use of budding yeast to study mechanisms controlling prion appearance, propagation, and transmission. The drugs could thus serve as bait to purify the conserved target(s), for example, by affinity chromatography on immobilized drugs or by using three-hybrid approaches.

To conclude, it would be very interesting to test some of these compounds in models of other, neurodegenerative or not, amyloid fiber-based diseases as it is well possible that common control mechanisms exist.

Acknowledgments

This work was carried out in the laboratory of Laurent Meijer who is warmly acknowledged for his continuing support and helpful discussions. Laurent Meijer and Sven J. Saupé are acknowledged for critical proofreading of the manuscript. We thank members of our laboratories for helpful discussions. This research was supported by the following grants: a GIS “Infections à prion”, a PRIR from the “Conseil Régional de Bretagne”, an ACI “Jeune Chercheur” from the French “Ministère de la Recherche”, from “CRITT Santé Bretagne”, and an “Ingénieur de valorisation” fellowship from the CNRS.

References

- [1] C. Weissmann, A. Aguzzi, *Annu. Rev. Med.* 56 (2005) 321–344.
- [2] G. Mallucci, J. Collinge, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005) 23–34.
- [3] G. Mallucci, A. Dickinson, J. Linehan, P.C. Kohn, S. Brandner, J. Collinge, *Science* 302 (2003) 871–874.
- [4] M. Horiuchi, B. Caughey, *EMBO J.* 18 (1999) 3193–3203.
- [5] R. Gabizon, M.P. McKinley, D. Groth, S.B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6617–6621.
- [6] S. Supattapone, H.O. Nguyen, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14529–14534.
- [7] C. Soto, R.J. Kascsak, G.P. Saborio, P. Aucouturier, T. Wisniewski, F. Prelli, R. Kascsak, E. Mendez, D.A. Harris, J. Ironside, F. Tagliavini, R.I. Carp, B. Frangione, *Lancet* 355 (2000) 192–197.
- [8] Y. Cordeiro, L.M. Lima, M.P. Gomes, D. Foguel, J.L. Silva, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5346–5352.
- [9] U. Bertsch, K.F. Winklhofer, T. Hirschberger, J. Bieschke, P. Weber, F.U. Hartl, P. Tavan, J. Tatzelt, H.A. Kretschmar, A. Giese, *J. Virol.* 79 (2005) 7785–7791.
- [10] K. Doh-Ura, T. Iwaki, B. Caughey, *J. Virol.* 74 (2000) 4894–4897.
- [11] C. Korth, B.C. May, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 9836–9841.
- [12] D. Vilette, O. Andreoletti, F. Archer, M.F. Madelaine, J.L. Vilotte, S. Lehmann, H. Laude, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 4055–4059.
- [13] F. Archer, C. Bachelin, O. Andreoletti, N. Besnard, G. Perrot, C. Langevin, A. Le Dur, D. Vilette, A. Baron-Van Evercooren, J.L. Vilotte, H. Laude, *J. Virol.* 78 (2004) 482–490.
- [14] S. Bach, N. Talarek, T. Andrieu, J.M. Vierfond, Y. Mettey, H. Galons, D. Dormont, L. Meijer, C. Cullin, M. Blondel, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1075–1081.
- [15] Y.O. Chernoff, S.M. Uptain, S.L. Lindquist, *Methods Enzymol.* 351 (2002) 499–538.
- [16] M. Schlumpberger, S.B. Prusiner, I. Herskowitz, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 7035–7046.
- [17] Y.O. Chernoff, S.L. Lindquist, B. Ono, S.G. Inge-Vechtomov, S.W. Liebman, *Science* 268 (1995) 880–884.
- [18] F. Sherman, *Methods Enzymol.* 350 (2002) 3–41.
- [19] C. Guthrie, G.R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, 1991.
- [20] B.E. Bauer, H. Wolfger, K. Kuchler, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (1999) 217–236.
- [21] R. Emter, A. Heese-Peck, A. Kralli, *FEBS Lett.* 521 (2002) 57–61.
- [22] D.H. Lee, A.L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27280–27284.
- [23] T.R. Graham, P.A. Scott, S.D. Emr, *EMBO J.* 12 (1993) 869–877.
- [24] R.F. Gaber, D.M. Copple, B.K. Kennedy, M. Vidal, M. Bard, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 3447–3456.
- [25] K. Umebayashi, A. Nakano, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 1117–1131.
- [26] E. Fernandez-Bellot, E. Guillemet, C. Cullin, *EMBO J.* 19 (2000) 3215–3222.
- [27] S.S. Eaglestone, L.W. Ruddock, B.S. Cox, M.F. Tuite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 240–244.
- [28] P.C. Ferreira, F. Ness, S.R. Edwards, B.S. Cox, M.F. Tuite, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 1357–1369.
- [29] G. Jung, D.C. Masison, *Curr. Microbiol.* 43 (2001) 7–10.
- [30] D.A. Kocisko, A.L. Engel, K. Harbuck, K.M. Arnold, E.A. Olsen, L.D. Raymond, D. Vilette, B. Caughey, *Neurosci. Lett.* 388 (2005) 106–111.
- [31] T. Baron, *Trends Mol. Med.* 8 (2002) 495–500.

II. Utilisation de la chromatographie d'affinité pour identifier des cibles intracellulaires de diverses drogues antiprion

Article 3

Présentation/Résumé

Après avoir isolé une molécule potentiellement active pour le traitement d'une maladie, il est important de connaître ses cibles intracellulaires afin d'élucider son mode d'action (donc souvent des mécanismes impliqués dans l'apparition de la pathologie) mais aussi afin d'appréhender d'éventuels effets secondaires de cette molécule dans le cadre de développements cliniques ultérieurs. Pour cela, nous avons mis au point au laboratoire la méthode de chromatographie d'affinité sur drogues immobilisées.

Le principe peut être apparenté à celui de la pêche : notre appât est la molécule d'intérêt et l'hameçon est une matrice constituée d'une bille de sépharose sur laquelle est accroché un bras au bout duquel est lié de façon covalente la drogue d'intérêt.

Il faut dans un premier temps synthétiser la matrice complexée à la molécule. Pour cela, il est important de choisir 1- le bon type de bras, une taille du bras optimale afin d'éviter des problèmes éventuels d'encombrements stériques et une hydrophobicité maîtrisée afin d'éviter son agrégation ainsi que des interactions hydrophobes non spécifiques et 2- une position du bras sur la molécule qui n'affecte pas l'activité de celle-ci. Si on prend l'exemple de la méthode de criblage en levure de molécules à activité antiprion, les drogues antiprion avec des bras fixés en différentes positions sont d'abord testées *in vivo* chez la levure afin de déterminer leur niveau d'activité antiprion. Ces expériences permettent de définir la meilleure position pour le bras et ainsi de réaliser des matrices d'affinité respectant l'activité de la drogue d'intérêt.

La chromatographie d'affinité peut ensuite être réalisée : des extraits protéiques de diverses origines sont mis en contact avec la matrice d'affinité, incubés pendant 30 minutes puis des lavages intensifs de la matrice sont réalisés. Les protéines se liant spécifiquement avec la drogue sont ensuite éluées puis analysées en SDS-PAGE. Des contrôles doivent être réalisés afin de mettre en évidence les liaisons spécifiques. Pour cela, des compétitions sont effectuées avec les drogues libres. Celles-ci iront compéter la fixation des cibles sur la matrice. Une fois les protéines se liant spécifiquement clairement déterminées, elles sont ensuite identifiées par

spectrométrie de masse. Lorsque les cibles identifiées sont connues et cristallisées, des expériences de co-cristallisation peuvent être réalisées. Des expériences *in vitro* permettant de confirmer ou non si la drogue a un effet sur l'activité biologique de la cible sont également envisageables dans le cas où des tests *in vitro* existent. Prenons le cas où la cible est une kinase, des tests enzymatiques *in vitro* montrent si la drogue inhibe ou non l'activité de l'enzyme cible.

Ainsi, grâce à cette technique, il est possible d'identifier des cibles potentielles de drogues afin d'appréhender leurs mécanismes d'action, et ceci, de façon assez simple et rapide. Il est toutefois important de noter que cette technique présente certains biais du fait notamment de la présence du bras entre la matrice et la drogue. Pour pallier à cela, des approches génétiques basées sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être envisagées comme celles détaillées dans l'article 4 de ce manuscrit. L'approche par chromatographie d'affinité ainsi que les approches génétiques en levure sont donc complémentaires pour l'étude des petites molécules et la détermination de leurs cibles potentielles, aspects importants à déterminer avant la mise sur le marché d'une molécule thérapeutique.

Article 3

Technical Report

Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography

Damien Guiffant^{1,2*}, Déborah Tribouillard^{1,2*}, Fabienne Gug³, Hervé Galons³, Laurent Meijer¹, Marc Blondel^{1,2} and Stéphane Bach¹

¹CNRS, Molecules and Therapeutic Targets Laboratory, Station Biologique, Roscoff, France

²INSERM U613, CHU de Brest, Faculté de Médecine de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

³Laboratoire de Chimie Organique 2, Université René Descartes, Paris, France

Efforts to characterize small molecular weight chemical inhibitors of pharmacological interest tend to identify molecules with high efficiency and selectivity, to meet the two criteria required for the clinical development of a drug: efficacy and harmlessness. Drug candidates are expected to inhibit efficiently the target they have been optimized against (for example, a particular type of protein kinase). These hits are also designed to not interfere (or as little as possible) with the activity of other cellular enzymes/proteins to reduce undesired side effects. Here we discuss the use of immobilized drugs as affinity chromatography matrices to purify and identify their *bona fide* intracellular targets. This method not only allows the systematic investigation of the selectivity of pharmacological compounds but also the anticipation of their putative adverse effects.

Received 2 November 2006
Revised 13 November 2006
Accepted 6 December 2006

Keywords: Affinity chromatography · Competition assays · Selectivity

1 Introduction

Determining the mode of action of small molecular weight chemical compounds is a central problem in chemical biology. Although the therapeutic potential of the most promising compounds is being evaluated in preclinical and clinical trials, their exact mechanism of action and the real spectrum of their intracellular targets usually remain largely unknown. Determination of the *in vivo* selectivity of the compounds and identification of their intracellular targets constitute a prerequisite and a crucial step in understanding their cellular effects and to improve their efficiency on a rational basis. A classical method for the determination of a compound's selectivity consists in testing, *in vitro*, its effects on the activity of a panel of pu-

rified enzymes selected as putative targets. For example, if a compound was originally isolated in a screen aiming at inhibiting a particular protein kinase, some commercially available protein kinase panels can be used (*e.g.*, Invitrogen SelectScreen™ Kinase Profiling panel of currently 214 kinases). However, it should be kept in mind that this panel only reflects a part of the reported 518+ kinases that constitute the human kinome (~40% for the largest one; Invitrogen). In addition, especially if the kinase inhibitory effect of the considered compound is due to its ability to compete for the binding of ATP in the active site of protein kinases, it might be able, in principle, to interact with some of the other ~1500 ATP-utilizing enzymes and with the numerous other nucleotide-binding proteins present in the human proteome. As a consequence many of the potential targets are not evaluated using panels of purified enzymes. This method, although useful to give a first idea about the selectivity of the considered molecule, is thus clearly not comprehensive. In addition, it is time and budget consuming as it requires enzyme expression,

Correspondence: Dr. Stéphane Bach, CNRS, Molecules and Therapeutic Targets Laboratory, Station Biologique, Place G. Teissier, B.P. 74, 29682 Roscoff cedex, France

E-mail: bach@sb-roscoff.fr

Fax: +33-2-9829-2526

Abbreviations: CDKs, cyclin-dependent kinases; PDXK, pyridoxal kinase

* These authors contributed equally to this work.

purification and assay set up for each individual kinase [1]. This remark is not only restricted to the study of kinase inhibitors but can be applied to other classes of enzymes (e.g., protease inhibitors). Compared to testing the activity of compounds against a panel of purified enzymes, various alternative ways allow a more comprehensive approach of the selectivity problem (reviewed in [2]), such as chemical-genetic profiling in yeast [3], yeast three-hybrid system [4], transcriptional “signature” analysis [5] or affinity chromatography on immobilized drug. In this article, we focus on this last method, which has been already successfully applied to protein kinase inhibitors like flavopiridol [6], purvalanol [7], (R)-roscovitine (CYC202, Seliciclib) [8], Gefitinib (ZD1839, Iressa) [9] and geldanamycin, an Hsp90p chaperone inhibitor [10]. Enzyme or protein purification using affinity chromatography based on immobilized specific substrate, cofactor or inhibitor has been used for several decades [11–14]. In contrast, the use of this technique to comprehensively purify and identify the cellular factors that interact with a specific drug is relatively recent, and undoubtedly linked to the emergence and availability of various global proteomic analysis methods such as peptide microsequencing and MS. It should be noted that the affinity chromatography approach to investigating the selectivity of a compound should be considered only as a first step of the analysis, as it only shows a specific interaction between a drug of interest and a cellular factor (protein or nucleic acid). Whether or not this interaction affects the biological activity of the interactor (inhibition or activation) needs to be determined later on. In addition, if the interaction is shown to affect the targeted cellular factor, the link between this effect and the biological activity of the drug still needs to be elucidated. Finally, we should keep in mind that affinity chromatography allows uncovering the mechanism of action of a drug on a protein target (or on nucleic acids) but potentially misses other kinds of targets (e.g., lipids).

2 Description of the affinity chromatography technology

Selectivity analysis using immobilized drug can be separated in three different steps depicted in Figs. 1 and 2: (i) Design and synthesis of a compound derivative suitable for affinity chromatography, (ii) affinity chromatography and identification of protein(s) interacting with the compound, and (iii) testing the effect of the compound on the biological activity of the interacting protein(s).

Two examples of selectivity analysis are shown here: (i) the case of a purine compound, (R)-roscovitine (for review see [15]), and (ii) the case of anti-prion drugs [16]. In the first case, the molecule was designed to selectively inhibit different cyclin-dependent kinases (CDKs) and several indirect arguments support the idea that (R)-roscovitine acts intracellularly by inhibiting CDKs [17]. Like most

other protein kinase inhibitors, roscovitine acts by competing with ATP at the ATP-binding site of the kinases [18], and thus, given the large number of ATP-binding proteins present in cells, its *in vivo* selectivity remains an open question. In the second case, anti-prion drugs were originally isolated using a phenotypic screen on living yeast cells (screening method reviewed in [19]). Remarkably, most of the molecules isolated using this yeast-based assay turned out to be active against mammalian prion *ex vivo* in various mammalian cell-based assays [20], suggesting that prion controlling mechanisms are conserved from yeast to mammals. The anti-prion drugs could potentially directly target the prion proteins or, alternatively, the cellular machinery involved in prion propagation. Before the study, the targets of these drugs were unknown and their identification was of importance (i) to understand their mechanism of action, (ii) to characterize new pathway(s) important for prion appearance and/or propagation, and (iii) to provide new screening targets for the isolation of new anti-prion drugs (Tribouillard *et al.*, submitted).

2.1 Preparation of the drug-linked affinity matrix

This first step is of the uppermost importance (Fig. 1A). Indeed, to avoid possible steric hindrance between target(s) and the matrix, it was necessary to introduce a spacer between the drug of interest [(R)-roscovitine or an anti-prion drug in the examples provided] and the Sepharose beads. Different possible linkers have been described in the literature. Polyethylene glycol (PEG) linker [8, 21–23] divalent epoxide linker (ethyleneglycol diglycidylether, EGDE, [24]) or an aminocaproylaminopentylxy (ACAP) linker were chosen because of their optimal length.

In the case of (R)-roscovitine, a PEG linker was chosen, whereas the ACAP linker was chosen for the immobilization of anti-prion drugs. We believe the ACAP linker is an interesting choice because, in addition to its optimal length, its internal peptidic bond lowers its hydrophobicity, therefore reducing potential auto-aggregation (depicted in Fig. 1A) or unspecific hydrophobic interactions with macromolecules from the cell lysate. Furthermore, the amide function increases the rigidity of the linker (F. Gug and H. Galons, in preparation).

An important point is also to check that introduction of the linker does not interfere with the biological activity of the considered drug (or that at least some of its activity is retained). The position where the linker can be introduced, while maintaining the biological activity of the drugs, can be determined in two different ways. In the case of roscovitine, the choice of the appropriate position on the compound for attachment of the PEG linker largely benefits from the 3-D structures of CDKs co-crystallized with the inhibitor. For example, the crystal structures of roscovitine in complex with CDK2 [25] and CDK5 [26]

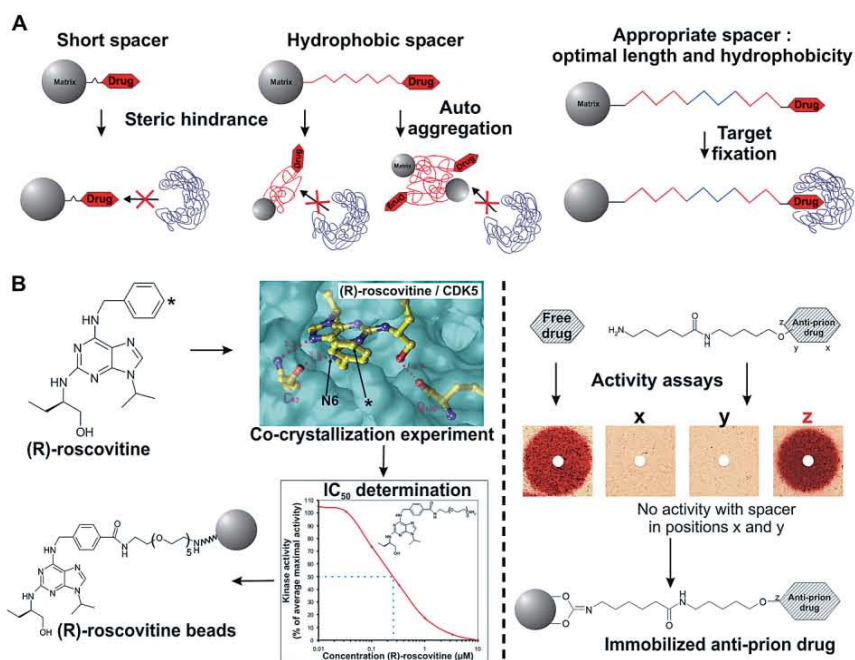


Figure 1. Preparation of the affinity matrix: choice and positioning of the chemical linker. (A) The structure of the chemical linker that connects the drug to the matrix is crucial. Indeed, a short spacer can generate a steric hindrance, which will prevent the drug/target interaction. If the spacer is too hydrophobic (depicted in red), the same event can happen as different linker can interact with each other (auto-aggregation), thus also preventing target binding. In addition, a hydrophobic linker can generate unspecific hydrophobic interactions with macromolecules from the cell lysates. For all these reasons, an optimal chemical spacer must have a mild hydrophobicity and be long enough to avoid steric hindrance. (B) When the appropriate linker is chosen, it is necessary to define the position at which the linker can be introduced without major alteration of the biological activity of the resulting molecule. Two different methods can be used. (i) in the case of (R)-roscovitine (left panel), the drug was isolated by *in vitro* screening using purified enzyme (CDK) [17], and co-crystallization experiments were used to determine the atoms involved in the interaction and also those facing the outside of the ATP binding pocket (annotated with “*”). The benzyl ring of this molecule was used for the attachment to the PEG-based linker. To validate the choice of this position, an *in vitro* kinase assay was performed and showed that the drug with a linker is still able to inhibit the enzymatic activity. (ii) in the case of anti-prion drugs (right panel), the molecules were isolated using an *in vivo* phenotypic screening. The mode of action of these drugs, and thus the nature of their cellular targets, are completely unknown. In this case, the optimal position of the linker was determined by comparing the biological activities of free drug with those of drug + linker at various positions (x, y or z). Finally the most active branched molecule with a linker (in position z in the example) is bound to the matrix.

show that the benzyl ring substitution faces the outside of the ATP-binding pocket of the kinases. This is where a PEG extension is attached (Fig. 1B). The results of *in vitro* kinase assays indicate that the addition of a linker on this site does not significantly modify the protein kinase inhibition properties, as expected [8]. However, it should be kept in mind, as a limit of the method, that some other potential and unknown intracellular targets might be missed due to the position chosen for the linker. The approach is quite different for anti-prion drugs, which were isolated on the basis of their activity in living cells. The orientation of the linker was thus chosen by testing the biological activity of anti-prion drug derivatives with the linker in various positions (x, y or z in the example depicted in Fig. 1B, right panel). Only introduction of the ACAP linker in position z led to a reasonably active derivative of anti-prion drug, resulting in the presence of red yeast colonies around the filter where the chemical com-

pound was added, while the two other substitutions led to completely inactive compounds (white colonies). The modified roscovitine and anti-prion drugs were then covalently bound to Sepharose beads to yield the affinity chromatography matrix depicted in Fig. 1B. Sepharose beads are the most frequently used matrix, but the utilization of other matrices has also been reported (*e.g.*, latex beads [24]). These matrices were then used for affinity chromatography experiments to purify biological targets of (R)-roscovitine and anti-prion drugs.

2.2 Screening of cellular or tissue extracts for inhibitor-binding proteins

As an example, the results of (R)-roscovitine selectivity analysis are shown on Fig. 2 (complete data available in [8] and [27]). Crude extracts of porcine brain were incubated for 30 min with (R)-roscovitine beads. As controls,

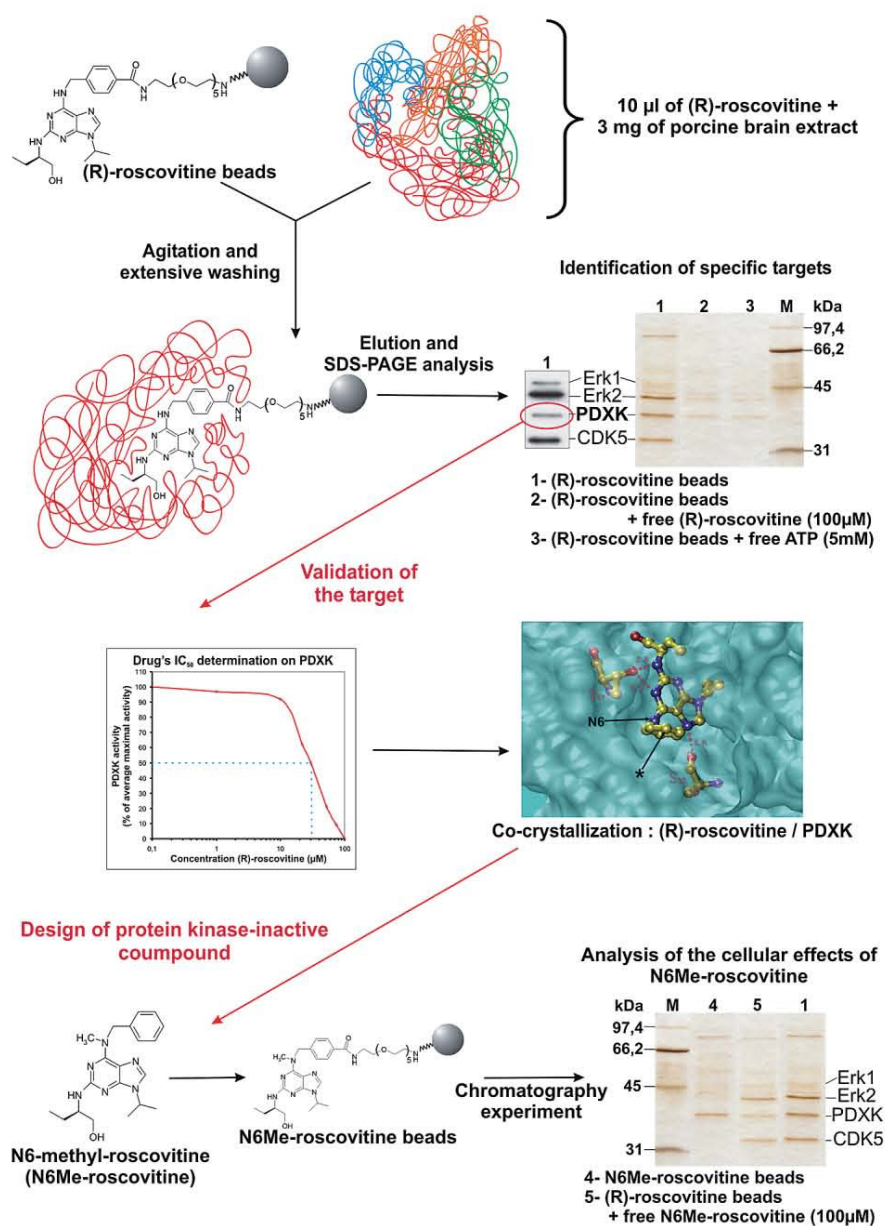


Figure 2. Affinity chromatography purification of the drug's targets (adapted from [8, 34]). The CDK inhibitor, (R)-roscovitrine in this example, was covalently linked to Sepharose beads via a PEG linker. Protein extracts were then incubated with this matrix. After extensive washing, the affinity matrix-bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. In the example shown, SDS-PAGE was followed by Western blot and silver staining analysis. The interacting proteins were identified using specific antibodies and by MS. From porcine brain extracts, p44MAPK/Erk1, p42MAPK/Erk2, PDXK and CDK5 (lane 1) were identified as specific targets of (R)-roscovitrine. Note that, free (R)-roscovitrine (lane 2) and free ATP (lane 3) are both able to compete with the matrix for the binding of the putative targets of (R)-roscovitrine. After identification of the putative targets, the effect of (R)-roscovitrine on their activity was tested using *in vitro* assays. Finally, the validated targets were co-crystallized with the chemical inhibitor to define precisely which atoms of both molecules are involved in the interaction. In the example shown here, (R)-roscovitrine was first shown to interact with PDXK. Then the ability of (R)-roscovitrine to inhibit the *in vitro* enzymatic activity of PDXK was demonstrated. Finally, precise interactions of (R)-roscovitrine with PDXK were deciphered by a structural analysis. The co-crystallization (R)-roscovitrine/PDXK showed that the N6 atom of the drug does not interact with the enzyme, while previous studies have shown a direct hydrogen bond between the N6 atom and the amino acid residues surrounding the ATP-binding pocket of CDK [26, 25]. Using this observation, the mere addition of a methyl group on N6 to yield N6-methyl-roscovitrine was performed. As expected, N6-methyl-roscovitrine was still able to interact with PDXK, whereas it was unable to interact with CDKs (lane 4). This was verified by a competition assay with free N6-methyl-roscovitrine that showed a decrease in the level of matrix-bound PDXK (lane 5 compared to lane 1), and demonstrated by a direct co-crystallization of N6-methyl-roscovitrine with PDXK [27].

Box 1. Protocols for matrix preparation**A) Standard protocol (according to recommendations of the manufacturers)**

The drug attached to the linker (e.g. PEG or ACAP, Fig. 1B) is coupled in 0.2 M NaHCO₃, 0.2 M NaCl, pH 8.5 on Fast flow CNBr-activated Sepharose 4B® (GE Healthcare) under agitation at 20°C for 1 h. The final calculated concentration should be in the range 1–15 µmol/mL resin. It is crucial to test different concentrations of drug. Indeed, depending on the size of the chemical compound and also on the size of the putative target(s), it is very important to avoid overloading of drug on the beads and as a consequence, steric hindrance between the putative targets. In general, 3 µmol drug/mL resin is found as an optimal concentration. After the coupling process, the remaining active groups are blocked in pH 8.0 buffer containing 1 M ethanolamine, under agitation for 2 h at 20°C. This last operation is repeated once. The beads are then washed three times with PBS and stored in PBS (supplemented with 0.05% NaN₃ to avoid microbial growth) at 4°C until use.

B) Protocol used for compounds of poor solubility in water

This protocol is taken from [21]. Affi-Gel® 10 Gel (Bio-Rad Laboratories; 1 mL bed volume) is rinsed with anhydrous dimethylsulfoxide (DMSO) (4 mL, three times) and transferred into a vial containing a solution of linker tethered compound in DMSO (3 mM, 1 mL, final concentration of 3 µmol/mL resin). The mixture is agitated overnight at room temperature in the presence of 10 µL triethylamine (the progress of the coupling reaction can be monitored by LC-MS). After coupling is completed, an excess amount of ethanolamine (16 M pure solution, 50 µL) is added to block any unreacted groups. The mixture is agitated for 5 h at room temperature. The resulting beads are washed with DMSO (4 mL, three times), PBS (4 mL, three times) and stored in PBS (1 mL, with 0.05% NaN₃) at 4°C until use.

competitions with an excess of free (R)-roscovitine or ATP were performed to verify the specificity of the interaction but also to characterize the ability of the putative (R)-roscovitine targets to bind ATP. After extensive washing of the resin, the bound proteins were eluted with electrophoresis sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE. The protein specifically bound to (R)-roscovitine were identified using various approaches (Western blotting, peptide microsequencing or MALDI-TOF peptide mapping on protein bands excised from the gel). As expected, using a panel of kinases, porcine CDK5 but also p42MAPK/Erk1 and p42MAPK/Erk2, were found to interact with the (R)-roscovitine matrix. In addition, roscovitine was found to interact with an unexpected non-protein kinase target, pyridoxal kinase (PDXK) (Fig. 2) [8, 27]. PDXK is responsible for the phosphorylation and activation of vitamin B6.

Henrik Daub's group at KINAXO Biotechnologies GmbH (Martinsried, Germany) has used the same strategy to analyze the selectivity of different protein kinases inhibitors, e.g., SB203580, a p38 kinase inhibitor [23]; PP58, an inhibitor of cellular Bcr-Abl tyrosine kinase activity [28]; and Gefitinib, an inhibitor of the EGFR tyrosine kinase [9]. The ATP-competitive kinase inhibitor Gefitinib (marketed as Iressa) has received approval for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) in May 2003 [29]. The affinity chromatography approach has led to the identification of more than 20 other kinase targets, in particular RICK and GAK serine/threonine kinases with IC₅₀ values of about 50 and 90 nM, respectively. These results provide new insight into the potential cellular mode of action of Gefitinib and will be used for the optimization of Gefitinib-derived drugs [9].

2.3 Characterization of the drug/protein target interaction

After the affinity chromatography experiment, it is crucial to check that the identified protein target is indeed affected by binding of the drug, but also to describe precisely the molecular mechanism of drug/target interaction. Interestingly, as observed during the purification and identification of the cellular targets of purvalanol (another purine inhibitor of CDKs), drugs interact with targets for which they have a strong affinity but which are not very abundant (e.g., purvalanol interacts with CDKs, and the IC₅₀ for purvalanol on CDK1/cyclin B is ~6 nM) but also with targets for which they have a moderate affinity, but which are much more abundant (e.g., purvalanol also interacts with p42MAPK/Erk2, and the IC₅₀ for purvalanol on p42MAPK/Erk2 is ~1000 nM) [7]. As described in Fig. 2, if the putative target is an enzyme, it is possible not only to test the inhibition of its activity by the compound but also to verify a direct interaction between the drug and the protein target. To characterize the interaction precisely, the drug can be co-crystallized with its target. To test the contribution of this inhibition [e.g., inhibition of the PDXK by (R)-roscovitine, Fig. 2] in the cellular effect of the drug, derivatives can be designed: e.g., N6-methyl-roscovitine [27]. The CDK inactive N6-methyl-(R)-roscovitine, which still interacts with PDXK, has a much reduced anti-proliferative or pro-apoptotic activity compared to (R)-roscovitine. This argument supports the view that interaction of (R)-roscovitine with PDXK does not significantly contribute to its anti-proliferative and pro-apoptotic effects [8]. RNA interference in mammalian cells or gene mutagenesis or deletion in yeast can also be used to selectively inhibit one putative cellular target, and thus to

observe the contribution of this inhibition to the global phenotype obtained by treatment with the considered compound. As an example of this method, MacKeigan and colleagues [32] have created a functional genetic screen using RNA interference to identify kinases and phosphatases involved in programmed cell death. Functional annotation of cellular enzymes is a prerequisite for selection of new drug targets, and exploring the selectiv-

ity of biologically active compounds will probably lay the foundation for the next generation of anticancer drugs.

3 Concluding remarks

The proteomic approach based on the affinity purification using immobilized drug is being increasingly used to

Box 2. Example of a protocol for target purification on immobilized drug

A) Preparation of protein extracts

The protocol for this target purification on immobilized drug is taken from [8]. The homogenization buffer for mammalian cells or tissue extracts is 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS (pH 7.2), 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM sodium vanadate, 1 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM phenyl phosphate, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL soybean trypsin inhibitor and 100 μ M benzamide. This homogenization buffer is different for yeast cell extracts: 25 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.2% Triton X-100 and 1 mM PMSF. The yeast extracts are prepared using a French press. The mammalian cells are washed in PBS before their homogenization and sonication in homogenization buffer (15 mL/10⁹ cells). The tissues are weighed, homogenized and sonicated (2 mL homogenization buffer/g material). Homogenates are centrifuged for 15 min at 14 000 \times g at 4°C. The supernatants are recovered, assayed for protein content (*e.g.*, using Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories) and immediately loaded batchwise on the affinity matrix.

B) Affinity chromatography experiments

Just before use, 10 μ L packed inhibitor beads are washed with 1 mL bead buffer. For protein extracts, 3 mg tissue or mammalian cell protein extract, or 250 μ g yeast protein extract are added to 40 μ L diluted beads (10 μ L packed beads). In a first step and to optimize the chromatography conditions, it is better to test various protein concentrations (*e.g.*, 1, 2 and 3 mg of tissue extract). The volume is then adjusted to 600 μ L by adding bead buffer, and the tubes are rotated at 4°C for 30 min. After a brief spin at 10 000 \times g and removal of the supernatant, the beads are washed four times with bead buffer before addition of 45 μ L 2 \times Laemmli sample buffer. Following heat denaturation at

95°C for 3 min, the bound proteins are analyzed by SDS-PAGE revealed by silver or blue Coomassie blue staining. To identify the nature of the putative drug targets, MALDI-TOF peptide mapping protein identification can be used. For this purpose, the protein bands are excised from a 1-D SDS-PAGE and digested in gel with trypsin as described previously [30]. To increase the sensitivity of the analysis, larger amounts of proteins (*e.g.*, extract from 2.5 \times 10⁹ HeLa cells) and matrix (*e.g.*, 600 μ L) can be used (as described in [23]). In this case, the protein targets are eluted using an excess of the free inhibitor (*e.g.*, 1 mM), separated by 2-D benzylidimethyl-*n*-hexadecylammonium chloride/SDS/PAGE and identified by MS [23]. Using this technology, 44 different targets of bisindolylmaleimide compound GF109203X (protein kinase C inhibitor) have been separated, and 38 proteins have been identified by MS [31].

C) Drug competition

Appropriate specificity controls for affinity chromatography experiments are competition experiments, where an excess of free active drugs or inactive chemically related derivatives is added, the rationale being that targets specifically involved in the considered biological activity of the drug should be competed away by the active compound but not by its inactive derivative [see example for PDXK, Fig. 2, compare lanes 2–5: PDXK inactivation is not crucial for the biological activity of (R)-roscovitine]. To perform competition experiments, the corresponding molecules (or the same volume of DMSO) at a high final concentration (100 μ M in Fig. 2) are incubated with cell extracts for 3 min before addition of the mixture to the affinity matrix. Then, bead buffer containing the same concentration of free drugs is immediately added (as described previously) to reach a final volume of 600 μ L. After an incubation of 30 min at 4°C, the beads are treated as described previously.

Box 3. Example of validation test: the case of a protein kinase

This example is taken from [8]. Kinase activities are assayed in kinase buffer (*e.g.*, buffer C: 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenylphosphate, 25 mM Mops pH 7.2, 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenylphosphate; *e.g.*, for CDK1/cyclin B and CDK5/p25) at 30°C for 30 min, at a final ATP concentration of 15 μ M. Blank values are subtracted and activities calculated as pmoles of phosphate incorporated during a 10-min incubation. The activities were expressed in % of the maximal activity, *i.e.*, in the absence of in-

hibitors. Controls were performed with appropriate dilutions of dimethylsulfoxide. The P81 phosphocellulose assay is used [17]. After 30-min incubation at 30°C, 25- μ L aliquots of supernatant are spotted onto 2.5 \times 3 cm pieces of Whatman P81 phosphocellulose paper, and, 20 s later, the filters are washed five times (for at least 5 min each time) in a solution of 10 mL phosphoric acid/L water. The wet filters are counted in the presence of ACS (GE Healthcare) scintillation fluid.

identify cellular targets of therapeutic molecules, in particular in the case of drugs designed to be, in principle, kinase selective [33, 34]. As an example, the family of purine-based compounds has found new applications, e.g., inhibitors of Hsp90p, Src kinase, p38alpha MAP kinase, sulfotransferases, phosphodiesterases, and CDKs [35]. In a therapeutic perspective, performing thorough evaluation of the cellular mode of action of drugs provides essential information. In addition, several other factors are likely to interfere with the effects of the considered compound: cell permeability, intracellular metabolism of the compound, intracellular distribution, competition with high intracellular concentration of ATP, and interaction with other targets (nucleotide-binding enzymes). (R)-Roscovitine is a well-studied purine derivative (currently in phase 2b clinical trials against NSCLC), and its selectivity has been explored using affinity chromatography. In addition, to confirm the interaction of the drug with various CDKs, this method has led to the identification of an additional unexpected target (PDXK) [8, 27]. The data obtained are valuable for the design of new generations of drugs with improved pharmacological properties (greater biological activity, better selectivity and fewer side effects). As clearly observed for protein kinase inhibitors, the use of different techniques provides a better understanding of the drug's selectivity. Indeed, affinity chromatography, phage display-based methods [36] and yeast three-hybrid [4], which were used to study the selectivity of the same compounds, exhibited different limits and bias. It was thus not very surprising that, if the majority of the identified cellular targets were the same, some differences were observed [2]. One of the major limits of the affinity chromatography approach is the introduction of the PEG-spacer/linker, which is necessary to avoid steric hindrance. This modifies the structure of the tested compound. As discussed above, it is necessary to check that this modification does not interfere with the biological activity of the original "free" compound, but it is impossible to anticipate whether or not this change can have any effect on other unexpected activities of the drug (e.g., on those responsible for its putative side effects). *Saccharomyces cerevisiae*-based genetics approaches can be used in parallel to circumvent the chemical linker problem [2, 3]. In accordance with the impressive progress in MS technology but also in genomic and structural analysis of enzymes, the use of this affinity chromatography method combined to chemical genomic strategies should be considered a natural reflex before bringing a drug to the market.

Karima Bettayeb, Nathalie Desban and the other members of our laboratories are acknowledged for discussion. D.G. and D.T. are doctoral research fellows financed by the "Ligue Contre le Cancer (Comité des Côtes d'Armor)" and the "Ministère de la Recherche", respectively. M.B. is sup-

ported by "Association pour la Recherche contre le Cancer" (contract ARC 3698), by a PRIR from the "Conseil Régional de Bretagne", by an ACI "Jeunes Chercheurs" from the french "Ministère de la Recherche" and by ANR "Blanche" from the french "Ministère de la Recherche"; L.M. is supported by the Ministère de la Recherche/INSERM/CNRS "Molécules et Cibles Thérapeutiques" Program, a grant from the EEC (FP6-2002-Life Sciences & Health, PRO-KINASE Research Project) and the Cancero-pole Grand-Ouest.

4 References

- [1] Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P., Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 2000, 351, 95–105.
- [2] Bach, S., Blondel, M. and Meijer, L., Evaluation of CDK inhibitor selectivity: from affinity chromatography to yeast genetics, in: Yue, E. and Smith, P. J. (Ed.), *Monographs on enzyme inhibitors*, Vol. 2: *CDK inhibitors and their potential as anti-tumor agents*. CRC Press, Boca Raton 2006, pp. 103–119.
- [3] Parsons, A. B., Lopez, A., Givoni, I. E., Williams, D. E. *et al.*, Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell* 2006, 126, 611–625.
- [4] Becker, F., Murthi, K., Smith, C., Come, J. *et al.*, A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. *Chem Biol* 2004, 11, 211–223.
- [5] Kung, C., Kenski, D. M., Dickerson, S. H., Howson, R. W. *et al.*, Chemical genomic profiling to identify intracellular targets of a multiplex kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 3587–3592.
- [6] Schnier, J. B., Kaur, G., Kaiser, A., Stinson, S. F. *et al.*, Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a flavopiridol-binding protein. *FEBS Lett.* 1999, 454, 100–104.
- [7] Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y. T. *et al.*, Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem. Biol.* 2000, 7, 411–422.
- [8] Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O. *et al.*, Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 31208–31219.
- [9] Brehmer, D., Greff, Z., Godt, K., Blencke, S. *et al.*, Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res.* 2005, 65, 379–382.
- [10] Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. *et al.*, Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 8324–8328.
- [11] Cuatrecasas, P., Wilchek, M. and Anfinsen, C. B., Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968, 61, 636–643.
- [12] Leman, L. S., A Biochemically Specific Method for Enzyme Isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1953, 39, 232–236.
- [13] Arsenis, C. and McCormick, D. B., Purification of liver flavokinase by column chromatography on flavin-cellulose compounds. *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 3093–3097.
- [14] McCormick, D. B., Specific purification of avidin by column chromatography on biotin-cellulose. *Anal. Biochem.* 1965, 13, 194–198.
- [15] Meijer, L. and Raymond, E., Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 417–425.

- [16] Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J. M. *et al.*, Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat. Biotechnol.* 2003, *21*, 1075–1081.
- [17] Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. *et al.*, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* 1997, *243*, 527–536.
- [18] Noble, M. E., Endicott, J. A. and Johnson, L. N., Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004, *303*, 1800–1805.
- [19] Bach, S., Tribouillard, D., Talarek, N., Desban, N. *et al.*, A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* 2006, *39*, 72–77.
- [20] Tribouillard, D., Bach, S., Gug, F., Desban, N. *et al.*, Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnol. J.* 2006, *1*, 58–67.
- [21] Wan, Y., Hur, W., Cho, C. Y., Liu, Y. *et al.*, Synthesis and target identification of hymenialdisine analogs. *Chem Biol.* 2004, *11*, 247–259.
- [22] Knockaert, M., Lenormand, P., Gray, N., Schultz, P. *et al.*, p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene* 2002, *21*, 6413–6424.
- [23] Godl, K., Wissing, J., Kurtenbach, A., Habenberger, P. *et al.*, An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, *100*, 15434–15439.
- [24] Shimizu, N., Sugimoto, K., Tang, J., Nishi, T. *et al.*, High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat. Biotechnol.* 2000, *18*, 877–881.
- [25] De Azevedo, W. F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlicek, L. *et al.*, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 1997, *243*, 518–526.
- [26] Mapelli, M., Massimiliano, L., Crovace, C., Seeliger, M. A. *et al.*, Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *J. Med. Chem.* 2005, *48*, 671–679.
- [27] Tang, L., Li, M. H., Cao, P., Wang, F. *et al.*, Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 31220–31229.
- [28] Wissing, J., Godl, K., Brehmer, D., Elencke, S. *et al.*, Chemical proteomic analysis reveals alternative modes of action for pyrido[2,3-d]pyrimidine kinase inhibitors. *Mol. Cell. Proteomics* 2004, *3*, 1181–1193.
- [29] Cohen, M. H., Williams, G. A., Sridhara, R., Chen, G. *et al.*, FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist* 2003, *8*, 303–306.
- [30] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, *68*, 850–858.
- [31] Brehmer, D., Godl, K., Zech, B., Wissing, J. *et al.*, Proteome-wide identification of cellular targets affected by bisindolymaleimide-type protein kinase C inhibitors. *Mol. Cell. Proteomics* 2004, *3*, 490–500.
- [32] MacKeigan, J. P., Murphy, L. O. and Blenis, J., Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat. Cell Biol.* 2005, *7*, 591–600.
- [33] Daub, H., Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, *1754*, 183–190.
- [34] Knockaert, M. and Meijer, L., Identifying *in vivo* targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. *Biochem. Pharmacol.* 2002, *64*, 819–825.
- [35] Legraverend, M. and Grierson, D. S., The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, *14*, 3987–4006.
- [36] Fabian, M. A., Biggs, W. H. 3rd, Treiber, D. K., Atteridge, C. E. *et al.*, A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 2005, *23*, 329–336.

III. Approches génétiques et biochimiques pour comprendre les mécanismes d'action de différentes drogues.

Article 4

Présentation/Résumé

L'objectif est le même que celui énoncé pour l'article 3 : une fois le criblage de différentes molécules contre une maladie réalisé, outre leurs applications thérapeutiques potentielles, il est important de revenir à la recherche fondamentale. Ceci permet de comprendre les mécanismes d'action de ces molécules afin d'optimiser leur efficacité, de comprendre les mécanismes fondamentaux de la maladie, en l'occurrence ceux des maladies à prions encore largement inconnus et anticiper les éventuels effets secondaires de ces drogues dans le cadre de développements cliniques ultérieurs. En somme, cela revient à réaliser du criblage inverse. Pour cela des approches biochimiques ainsi que des approches génétiques en levure ont été développées :

- L'approche biochimique a déjà été détaillée dans l'article 3 de ce manuscrit. Dans l'article 4 présenté ci-après, la méthode de chromatographie d'affinité est similaire, hormis le fait que deux contrôles supplémentaires pour déterminer les protéines spécifiques sont réalisés : le premier contrôle est de mettre en contact les extraits cellulaires sur des billes avec le bras mais sans drogues, ceci permet de repérer les liaisons aspécifiques sur la matrice. Le second contrôle consiste à réaliser des compétitions avec une drogue libre très proche chimiquement de la drogue active, mais dénuée d'activité antiprion. Ainsi les protéines se liant spécifiquement sont celles qui se fixent à la matrice complexée à la drogue active mais non à la matrice sans drogue et qui sont de plus compétées par la drogue active libre mais pas par la drogue inactive libre. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné dans l'article 3, bien que la chromatographie d'affinité soit d'une grande utilité, la présence du bras peut empêcher d'autres cibles de se fixer (celles par exemple liées aux effets secondaires).

- Les approches génétiques permettent de contrer cet inconvénient puisque dans ces approches, les drogues sont libres, dénuées de bras. Ces approches génétiques sont nombreuses. **1-** HIP (*HaploInsufficiency Profiling*) : une collection de souches de levures diploïdes contenant une délétion d'un des deux allèles de chaque gène est criblée avec la drogue active. Le but est d'identifier des mutants hypersensibles (ou résistants) aux drogues. **2-** SLS (*Synthetic Lethality Screens*) : une collection de souches haploïdes de levures délétées

pour chacun des gènes de levure, est criblée avec la drogue. L'idée est que si certaines souches sont sensibles à la drogue, le gène délété pourrait alors soit être une cible de la drogue soit, être impliqué dans les mêmes voies cellulaires que cette dernière. **3-** OES (*genome wide OverExpression Screens*) : le but est d'identifier des gènes dont la surexpression confère une résistance à la drogue. L'idée est que des cellules surexprimant une cible d'une drogue tolèrent de plus grandes concentrations de la drogue. Dans le cas des drogues antiprion on peut rechercher les gènes dont la surexpression empêche la cure par la drogue d'intérêt. Néanmoins, il existe une limite : les gènes dont la surexpression est toxique sont contre-sélectionnés. **4-** Y3H (triple hybride) : cette méthode découle de la méthode du double hybride, très usitée pour identifier des interactions entre protéines. La méthode du triple hybride permet d'identifier des interactions entre une petite molécule et une protéine. Pour cela, 4 composants sont nécessaires :

- un gène rapporteur avec son promoteur
- un récepteur lié au domaine de liaison au promoteur
- un hameçon constitué du ligand du récepteur lié de manière covalente à la drogue
- une proie, constituée d'une banque de cDNA fusionnée au domaine d'activation du gène rapporteur.

L'idée est que si le gène rapporteur est activé, le cDNA code pour une protéine qui interagit avec la drogue. Cependant cette méthode présente la même limite que celle déjà énoncée pour la chromatographie d'affinité : la présence d'un bras lié à la drogue.

Enfin, une fois que les cibles de ces drogues sont connues, elles peuvent être utilisées comme outils pour étudier l'importance de ces cibles *in vivo*.

Ainsi, de ces premiers travaux nous voyons parfaitement que la levure est un outil puissant : **1-** elle nous a permis de mettre au point un criblage *in vivo* afin d'isoler des molécules à activité antiprion, également actives en systèmes mammifères pour des modèles prion, validant ainsi le modèle levure et la méthode et **2-** elle nous a également permis de revenir au fondamental en effectuant du criblage inverse pour tenter de comprendre les mécanismes d'apparition de ces maladies encore largement inconnus à l'heure actuelle.

Article 4

Mini-Review

Antiprion Drugs as Chemical Tools to Uncover Mechanisms of Prion Propagation

Déborah Tribouillard^{1,2}

Fabienne Gug³

Hervé Galons³

Stéphane Bach²

Sven J. Saupé⁴

Marc Blondel^{1,2,*}

¹INSERM U613; CHU de Brest; Faculté de Médecine de l'Université de Bretagne Occidentale; 46 rue Félix Le Dantec; Brest, France

²CNRS UPS2682; Station Biologique; Amyloids and Cell Division Cycle Laboratory; Roscoff, France

³Laboratoire de Chimie Organique 2; Université René Descartes; Paris, France

⁴Laboratoire de Génétique Moléculaire des Champignons; IBGC UMR CNRS 5095; Université de Bordeaux 2; Bordeaux, France

*Correspondence to: Marc Blondel; INSERM U613; CHU de Brest; Faculté de Médecine de l'Université de Bretagne Occidentale; 46 rue Félix Le Dantec; Brest, Cedex 29220 France; Tel.: + 33.0.2.98.22.34.08; Fax: + 33.0.2.98.29.25.26; Email: marc.blondel@univ-brest.fr

Original manuscript submitted: 02/09/07

Revised manuscript submitted: 02/19/07

Manuscript accepted: 02/20/07

This manuscript has been published online, prior to printing for Prion, Volume 1, Issue 1. Definitive page numbers have not been assigned. The current citation is: Prion 2007; 1(1):

<http://www.landesbioscience.com/journals/Prion/abstract.php?id=4053>

Once the issue is complete and page numbers have been assigned, the citation will change accordingly.

KEY WORDS

prion, amyloid fibers, protein folding, protein chaperone, antiprion drugs, reverse screening

ACKNOWLEDGEMENTS

Most of our work in the prion field was carried out in the laboratory of Laurent Meijer (CNRS Roscoff) who is warmly acknowledged for his continuing support, friendship and helpful discussions. Thanks are also due to Elodie Couplan for critical proof-reading of the manuscript and for helpful suggestions. This work was supported by the following grants: GIS "Infections à prion", ACI "Jeune Chercheur" from the french government, "CRITT Santé Bretagne", "Ministère de la Recherche" and FRM grants (to Déborah Tribouillard), "Ingénieur de valorisation" fellowship from the CNRS and ANR "blanche" from the french government.

ABSTRACT

A number of drugs active against prions either in vitro, in cellular systems or in vivo in animal models have been isolated in various screening assays. In this minireview, we would like to suggest, that in addition to their direct interest as potential therapeutic agents, these molecules could be used as original research tools to understand prion propagation. The use of antiprion compounds as tool to understand fundamentals of prion propagation relies on reverse screening approaches. These global genetic and/or biochemical approaches aim to identify the intracellular target(s) and mechanism of action of the drugs. Once those are known, the biological activity of the compounds can be optimized on a rational basis, their potential side effects understood and minimized. In vitro enzyme-based screening assays can then be designed to allow discovery of new, more potent and selective molecules. Here we describe the main comprehensive biochemical and genetical approaches to realize reverse screening approaches based on antiprion drugs. We will finish by discussing the interest of using drug inactivation of specific targets as a substitute to genetic inactivation.

A number of drugs have been isolated as active against mammalian prion (reviewed in ref. 1). For most of these molecules, the mode of action and targets remain largely unknown. In principle, two main modes of action for antiprion drugs can be envisioned: either in cis directly on PrP^C/PrP^{Sc}, or in trans by interfering with the activity of cellular factors required for prion propagation. Some compounds are thought to bind directly to PrP^C or PrP^{Sc} (action in cis). Among these compounds are Congo Red (CR), Pentosan Polysulfate (PPS) or Glycosaminoglycans (GAGs). Other compounds are thought to act in trans by affecting PrP^C or PrP^{Sc} indirectly. Among these molecules are various lysosomotropic factors including the antimalarial drugs Quinacrine (QC) and Chloroquine. Indeed, the lysosome is a potential site of conversion of PrP^C to PrP^{Sc}.² In addition, a recent report,³ proposes that QC's antiprion activity is related to its ability to redistribute cholesterol from the plasma membrane to intracellular compartments, thereby destabilizing membrane domains. This conclusion was drawn from correlation experiments indicating that drugs known to display cholesterol-redistributing activity (but structurally unrelated to QC) also have antiprion potency. Finally, QC was also shown to interact directly with PrP.^{4,5} The example of QC, with these conflicting results, thus illustrates the need for unbiased and global approaches not driven by a preconceived hypothesis on the drug mode of action. To our knowledge, no such approaches were applied for any of the known antiprion drugs, with the noticeable exception of chlorpromazine for which a haploinsufficiency profiling screen (HIP, see in the later section) has been published.⁶ In this minireview, we discuss the various advantages of defining extensively intracellular targets of antiprion drugs. We then would like to present some global approaches that can be applied to uncover, in an unbiased manner, cellular mechanism(s) of action of compounds active against prions. To finish we propose that, once intracellular targets have been clearly identified, the drugs can be used to do "chemical genetics" to inactivate cellular target(s) which could be especially useful in situations where classical inactivation by mutagenesis is unpractical (for instance if redundant multigenic families are involved).

THE BENEFITS OF THE USE OF GLOBAL APPROACHES TO DETERMINE THE MODE OF ACTION OF ANTI-PRION DRUGS

Similar to classical genetic screens, global approaches allow to address the question of the drug mode of action in an unbiased manner and without any preconceived idea. As such, these approaches can lead to discovery of new prion controlling mechanisms,

especially mechanisms in trans which remain largely unknown. Once the target and drug mechanism are known, drug efficiency can be improved on a rational basis. In addition, these global approaches allow identifying and understanding potential side effects of the molecules. This point is of special importance for compounds evaluated in preclinical and clinical trials. Together, these approaches can also help to define new screening targets for the development of highly selective mechanism-based, cell-free screening assays.

ANTIPRION DRUGS AS BAITS IN AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON IMMOBILIZED COMPOUNDS

Protein purification using affinity chromatography based on immobilized substrates or cofactors has been used for several decades.⁷⁻¹⁰ In contrast, the use of affinity chromatography with immobilized drugs to comprehensively purify and identify cellular factors that interact with these compounds is relatively recent and undoubtedly linked to the improvements of proteomics and mass spectrometry (MS). Affinity chromatography experiments on immobilized drugs has been already successfully applied to protein kinase inhibitors like flavopiridol,¹¹ purvalanol,¹² (R)-roscovitine (CYC202, Seliciclib, at present in phase IIb of clinical trials)¹³ or Gefitinib (ZD1839, Iressa, already in clinic for the treatment of non small cells lung cancers)¹⁴ or to Hsp90 chaperone inhibitor geldanamycin.¹⁵ It should be noted that the affinity chromatography approach on immobilized drugs to investigate the actual antiprion mechanism of a compound of interest should be considered only as a first step of the analysis, as it only shows a specific interaction between the drug and a cellular component. Whether or not this interaction affects the biological activity of this component (inhibition or activation) needs to be determined in a second step. In a third step, the link between this biological effect and the antiprion activity of the drug also needs to be established. Finally, it should be kept in mind that affinity chromatography allows purification of protein (or nucleic acid) targets but potentially misses other types of targets (lipids for example).

The first important technical point when starting the affinity chromatography approach is the preparation of the drug-linked affinity matrix. This point is of the uppermost importance. Indeed, to avoid possible steric hindrance between target(s) and the matrix (generally Sepharose beads), it is necessary to introduce a spacer between the antiprion drug of interest and the Sepharose beads. A good linker should be long enough to avoid steric hindrance and should not be too hydrophobic to avoid auto-aggregation or unspecific hydrophobic interactions with macromolecules from the cell lysate (Fig. 1a). Different linkers have been described. Among them (Fig. 1b) are Polyethylene glycol (PEG) linkers,^{13,16-18} divalent epoxide linkers (ethyleneglycol diglycidylether, EGDE)¹⁹ and aminocaproylamino-pentyloxy (ACAP) linkers (Gug F and Galons H, in preparation). We believe the ACAP linker is an interesting choice because, in addition to its optimal length, its internal peptidic bond lowers its hydrophobicity. Furthermore, the amide function increases the rigidity of the linker. An important point is also to check that introduction of the linker does not interfere with the antiprion activity of the considered drug (or at least that some of its activity is retained). Several positions should be tested in order to determine the most appropriate.

These matrices can then be used for affinity chromatography experiments to purify biological targets of the considered antiprion drug (Fig. 1c). Crude extracts of various tissues or cell types,

prion-infected or not, should then be incubated with the immobilized drug, the matrix extensively washed and the bound proteins eluted with electrophoresis sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE.²⁰ Several specificity controls should be included (Fig. 1C, right panel). In a first control, the Sepharose beads without the drug are used. In a second control, competitions with an excess of free antiprion drug are performed. Proteins interacting specifically with the antiprion compound should be displaced by the free drug. A last important control is to realize the same type of competition with an inactive, close chemical derivative of the antiprion drug, if available. The macromolecules specifically bound to the antiprion drug are thus those which bind the drug matrix, but not the matrix alone and which are competed away by the active antiprion drug but not by its inactive derivative. However, it should be kept in mind, as a limit of this biochemical method, that some other potential biological targets (in particular those not related to the antiprion activity but rather to undesired side effects) might be missed due to the position chosen for the linker. For this reason global genetic approaches can be considered as complement to the biochemical approach with immobilized antiprion compounds.

ANTIPRION DRUGS AS BAITS IN YEAST-BASED GENETIC APPROACHES

A number of global approaches based on the use of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been developed to uncover drug targets.²¹ The main advantage of these methods compared to the biochemical approach described above is the absence of chemical linker added onto the tested compound. Among these cell-based, high-throughput screening methods are: (i) haploinsufficiency profiling (HIP), (ii) synthetic lethality screens (SLS) and (iii) genome wide overexpression screens (OES).

In the HIP approach, a library of diploid yeast strains with heterozygous deletion of each single gene is screened for drug sensitivity either in a single culture with a competitive growth assay or by screening the 6000+ strains separately in parallel. This assay is based on the observation that reducing the copy number of a gene encoding a drug target from two copies (in diploid strain) to one copy (in a diploid strain heterozygote for deletion of this gene) often results in a strain sensitized to the drug of interest. In one of these HIP assays, Chlorpromazine, a tricyclic antidepressant shown to promote PrP^{Sc} clearance in N2a cell system²² exhibited genetic interaction with integral membrane ATPase activities.⁶ It should be noted, however, that in this screen only the effect of chlorpromazine on toxicity was analyzed and not its effect on prion propagation.

In the SLS approach, the drug is screened at a concentration that is normally subefficient against a library of haploid yeast strains with individual gene deletions. Genes whose deletion results in increased drug sensitivity might be one of several direct drug targets or genes that are involved in the same cellular pathways as the drug target.²³

In the OES method (Fig. 2A), the rationale is to identify genes or cDNA whose overexpression confers resistance to a drug in yeast. This screen is based on the idea that cells overexpressing a target or a component related to the target, should tolerate higher levels of the active compound. The main interest of this approach is that overexpressed genes or cDNAs can be of any origin (from yeast but also from mouse or human). In addition, because this method can be based on yeast prions, convenient red/white colony color assays can be used in conjunction with *GAL*-inducible promoters (highly active when yeast cells are grown in galactose medium and inactive when

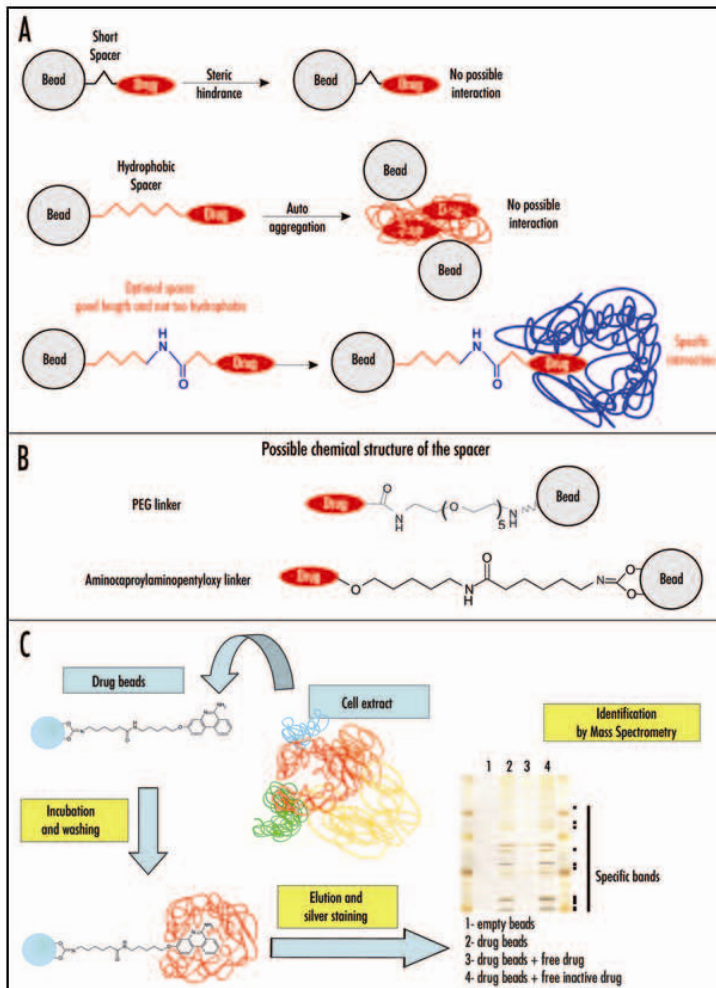


Figure 1. Antiprion drugs as baits in affinity chromatography on immobilized compounds. (A) The structure of the linker connecting the drug to the matrix (Sepharose bead) is crucial. A short spacer can prevent interaction with cellular targets because of steric hindrance (upper scheme). If the spacer is too hydrophobic (depicted in red in the middle panel), it can lead to its auto aggregation thus also preventing target binding. In addition, a hydrophobic linker can generate unspecific hydrophobic interactions with macromolecules from cell lysates. An optimal spacer (lower panel) should be only mildly hydrophobic (hydrophilic part depicted in blue) and long enough to avoid steric hindrance. In this case, specific interactions can occur, as long as the covalent link of the linker to the drug does not affect its antiprion activity too strongly. (B) Possible linker chemical structures are depicted. Polyethylene glycol (PEG) (upper panel) and amino caproylamino-pentyl linker (lower panel). (C) Affinity chromatography purification on immobilized 6AP. In the example given, the antiprion drug 6AP was covalently linked to Sepharose beads via an amino caproylamino-pentyl linker. Cell extracts were then incubated with this matrix. After extensive washing, the affinity matrix bound cellular components were analyzed by SDS PAGE followed by silver staining. The interacting proteins were identified by mass spectrometry.

cells are grown in glucose medium). The utility of this approach in the analysis of small molecules targets has been demonstrated.²⁴ Naturally, typical false positive in such approaches might correspond to proteins involved in drug import/export and stability. In addition, genes whose overexpression is toxic in yeast cells are counterslected.

Finally, another yeast-based method can be used: the yeast three-hybrid system (Y3H, Fig. 2B). This method is derived from the yeast two-hybrid system (Y2H) which has proved to be a powerful

tool for detecting protein-protein interactions.²⁵ In the Y2H system, protein-protein interaction lead to reconstitution of a transcriptional activator by close positioning in space of its DNA binding (DBD) and activation domain (AD) expressed separately as fusion proteins with the two potentially interacting proteins. Activity of the reconstituted transcriptional activator is evaluated using convenient reporter genes like LacZ or HIS3. In 1996, Licitra and Liu extended this method to small molecule target identification by dimerization of two receptor proteins via heterodimeric ligand.²⁶ As described in Figure 2B, one ligand/receptor pair (for example methotrexate/DHFR in fusion with DBD) serves as bait. The ligand (e.g., methotrexate) is covalently attached to the antiprion molecule of interest (6AP in the example given) via a linker. DHFR-DBD fusion protein is expressed in cells treated with the dimer methotrexate-6AP. In the same cells, a library of protein (here again of any origin) in fusion with the AD is expressed. If some of these fusion proteins have affinity with 6AP, an active transcriptional activator can be reconstituted, as in the case of Y2H experiments. Y3H can thus be considered as another way of scanning the proteome (of any species) to identify the targets of antiprion drugs. However, one of the limit of this method is the same than the one highlighted for affinity chromatography on immobilized drug. Because a linker is attached to the antiprion drug it is necessary to verify that the modified drug retains activity. Also, the linker can potentially prevent binding of cellular factors—not related to the antiprion mechanism—that can be important for the understanding of undesired side effects.

SCREENING FOR DRUGS INSTEAD OF MUTANTS, ANTIPRION DRUGS AS TOOLS IN GENETIC EXPERIMENTS

In this last section, we would like to present how antiprion drugs could be used as fundamental tools in model systems like yeast as substitutes to genetic inactivation.

A classical random mutagenesis screen aimed at the isolation of mutations destabilizing or exacerbating a prion phenotype can theoretically only lead to identification of non-redundant genes. In contrast, a multigenic family involved in prion propagation and/or stability would not be identified in such classical genetic screen. Conversely, all members of a family could be targeted by a single drug. Therefore, a drug screen could potentially uncover involvement of a redundant gene family in prion propagation while a classical genetic screen cannot.

In addition, drugs can be used as alternative approaches to genetic inactivation in fundamental studies. There are several advantages of using a drug rather than mutations to observe an effect on a prion phenotype. First, it is much more rapid and simple; second, it is reversible; and third, the effect can be adjusted (dose-dependent effect), which is especially important in the case of essential genes. Thus, drug induced inactivation can be considered as analogous to conditional mutations with the additional and important advantage to be able to affect multigenic families. This aspect is perfectly illustrated by the widespread use of GuHCl, as inhibitor of Hsp104 in yeast prion studies. In budding yeast, Guanidine hydrochloride (GuHCl) is known to efficiently cure all known prions. The GuHCl is a chemical inhibitor of Hsp104p,²⁷⁻³¹ a protein chaperone essential for propagation of prions in budding

yeast but not conserved in animals. GuHCl is probably the only known anti-prion molecule for which the critical biological target is clearly identified and numerous studies made use of GuHCl as a convenient tool for rapid and transient Hsp104-inactivation. It should be noted, however, that some published data tend to indicate that, in addition to Hsp104p, GuHCl might affect additional targets³²⁻³⁴ involved in prion propagation.

To finish, drugs can be used in more sophisticated genetic screens like those leading to synthetic phenotype. In such screens, classically, geneticists look for a second site mutation able to either exacerbate or suppress the effect of a first mutation. If the target of an anti-prion drug is known, this compound can be used to mimic the effect of inactivation of the corresponding gene. By looking among libraries of mutants (for example Euroscarf collection of deletion of every non essential budding yeast single gene) for those hypersensitive or resistant to the effect of the drug, it is possible to easily identify second site mutation able to exacerbate or suppress effect of inactivation of the drug target. For instance, by looking for mutations that suppress or exacerbate, the curing effect of GuHCl, when cells are treated by subefficient dose of this chemical compound, new cellular factors involved in yeast prions propagation might be identified.

CLOSING REMARKS

Recently, we have developed a rapid two-step yeast-based assay to screen for anti-prion drugs.^{35,36} The first step of the screening is based on the [PSI⁺] phenotype and then, active molecules are tested against [URE3] phenotype. Given the structural and functional divergences between the proteins responsible for these prion phenotypes (respectively Sup35p for the [PSI⁺] phenotype and Ure2p for the [URE3] phenotype), compounds active against both yeast prions can be considered as active against all yeast prions. Our initial assumption was that mechanisms controlling prion appearance and/or propagation could be conserved from yeast to human, as it is the case for most of the major cell biology regulatory mechanisms. Indeed, the vast majority of drugs we isolated as active against both [PSI⁺] and [URE3] prions turned out to be also active against mammalian prion in three different mammalian cell-based assays^{35,37} but also in vivo in animal models (Tribouillard et al in preparation). These results strongly argue in favor of common prion controlling mechanisms conserved in eukaryotes, from yeast to human, thus validating the yeast-based assay to isolate anti-prion compounds but also the yeast model to study prions in general.

In this way, in the prion field, in addition to be an appropriate model system, yeast is also a nice tool not only for drug screening but also for reverse screening

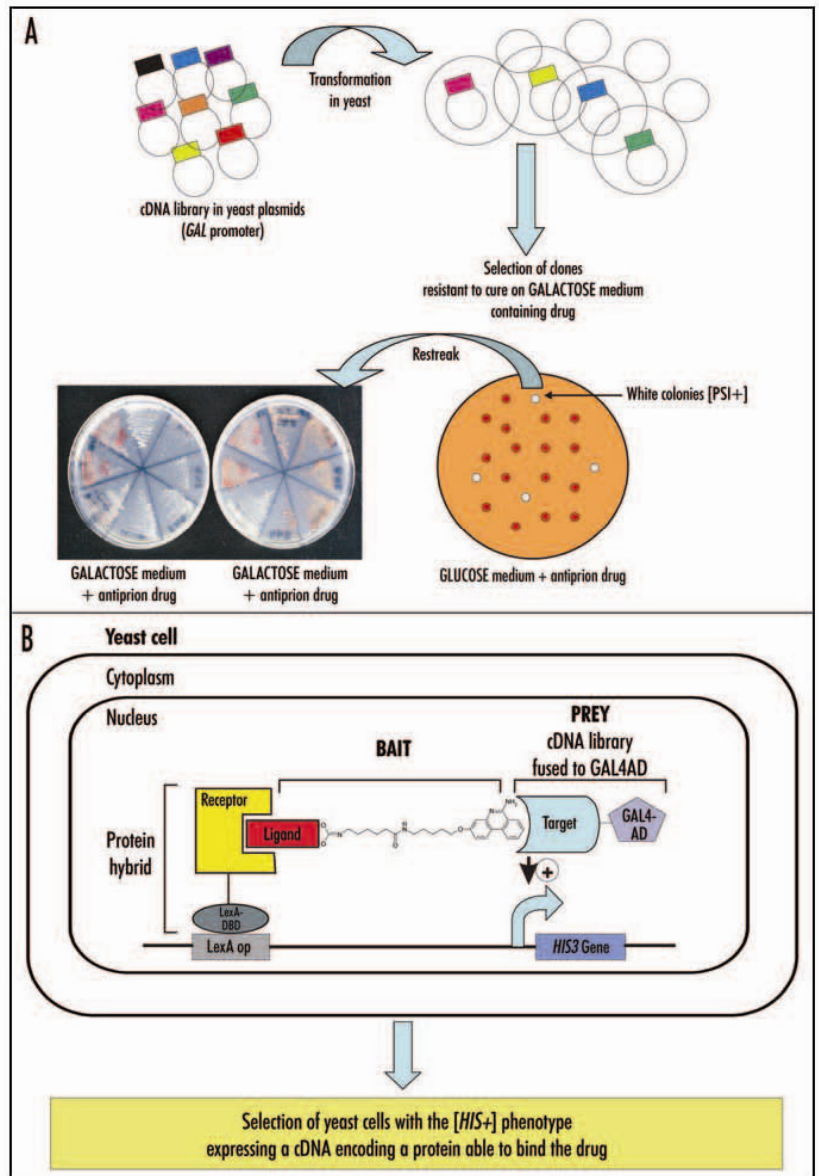


Figure 2. Antiprion drugs as baits in genetic approaches. (A) Genome wide overexpression screen (OES). A cDNA library (of any origin) expressed from the GAL-inducible promoter in a yeast plasmid was transformed in a [PRION⁺] yeast strain (in the example given [PSI⁺] forming white colonies) and cells were streaked on a Galactose medium (in condition where strong expression of cDNA was induced) and containing an anti-prion drug. The curing effect produces red [psi⁻] colonies. Colonies which remain white despite presence of the anti-prion compound might express a cDNA whose overexpression prevent the curing effect of the drug. These colonies are restreaked on the same Galactose medium containing the anti-prion drug to check for resistance to the anti-prion drug and also on Glucose medium containing anti-prion drug to check that the isolated clone is sensitive to the drug in this condition where expression of the cDNA is largely repressed. In the example given, one clone appears to be a false positive for which resistance is not caused by expression of the cDNA (it remains white on Glucose medium). (B) Three-hybrid assay (Y3H). This method is based on the use of a heterodimeric ligand constituted of a ligand of the receptor used as bait covalently linked to the anti-prion drug (δAP in the example given). The heterodimeric ligand can be used to screen against a library of cDNAs (from any origin) in fusion with the activation domain (AD) of a transcriptional activator (here Gal4p). The HIS3 reporter gene will only be activated in cells expressing a cDNA encoding a protein to which the anti-prion drug (δAP here) binds, and thus only these cells will be able to grow in a medium lacking histidine.

approaches aiming at understanding the mode of action of active compounds and thus potential new prion controlling mechanisms.

References

1. TREVITT CR, COLLINGE J. A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* 2006; 129:2241-65.
2. Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 2000; 74:4894-7.
3. Klingenstein R, Lober S, Kujala B, Godsava S, Leliveld SR, Gmeiner B, Peters PJ, Korth C. Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J Neurochem* 2006.
4. Vogherr M, Grimme S, Elshorst B, Jacobs DM, Fiebig K, Griesinger C, Zahn R. Antimalarial drug quinacrine binds to C-terminal helix of cellular prion protein. *J Med Chem* 2003; 46:3563-4.
5. Georgieva D, Schwark D, von Bergen M, Redecke L, Genov N, Betzel C. Interactions of recombinant prions with compounds of therapeutical significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:463-70.
6. Lum PY, Armour CD, Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK, Butler JS, Hinshaw JC, Garnier P, Prestwich GD, Leonardson A, Garrett-Engle B, Rush CM, Bard M, Schimmack G, Phillips JW, Roberts CJ, Shoemaker DD. Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 2004; 116:121-37.
7. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61:636-43.
8. Lerman LS. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1953; 39:232-6.
9. Arsenis C, McCormick DB. Purification of liver flavokinase by column chromatography on flavin-cellulose compounds. *J Biol Chem* 1964; 239:3093-7.
10. McCormick DB. Specific purification of avidin by column chromatography on biotin-cellulose. *Anal Biochem* 1965; 13:194-8.
11. Schnier JB, Kaur G, Kaiser A, Stinson SE, Sausville EA, Gardner J, Nishi K, Bradbury EM, Senderowicz AM. Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a flavopiridol-binding protein. *FEBS Lett* 1999; 454:100-4.
12. Knockaert M, Gray N, Damiens E, Chang YT, Grellier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz JE, Le Roch K, Doerig C, Schultz P, Meijer L. Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: Identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol* 2000; 7:411-22.
13. Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schachtele C, Lerman AS, Camero A, Wan Y, Gray N, Meijer L. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* 2005; 280:31208-19.
14. Brehmer D, Greff Z, Godl K, Blencke S, Kurtenbach A, Weber M, Muller S, Klebl B, Cotten M, Keri G, Wissing J, Daub H. Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res* 2005; 65:379-82.
15. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8324-8.
16. Wan Y, Hur W, Cho CY, Liu Y, Adrian FJ, Lozach O, Bach S, Mayer T, Fabbro D, Meijer L, Gray NS. Synthesis and target identification of hymenialdisine analogs. *Chem Biol* 2004; 11:247-59.
17. Knockaert M, Lenormand B, Gray N, Schultz P, Pouyssegur J, Meijer L. p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene* 2002; 21:6413-24.
18. Godl K, Wissing J, Kurtenbach A, Habenberger B, Blencke S, Gutbrod H, Salassidis K, Stein-Gerlach M, Missio A, Cotten M, Daub H. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:15434-9.
19. Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Nishi T, Sato I, Hiramoto M, Aizawa S, Hatakeyama M, Ohba R, Hatori H, Yoshikawa T, Suzuki F, Oomori A, Tanaka H, Kawaguchi H, Watanabe H, Handa H. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat Biotechnol* 2000; 18:877-81.
20. Guiffant D, Thibouillard D, Gug F, Galons H, Meijer L, Blondel M, Bach S. Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnol J* 2007; 2:68-75.
21. Sturgeon CM, Kemmer D, Anderson HJ, Roberge M. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol J* 2006; 1:289-98.
22. Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9836-41.
23. Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone C. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol* 2004; 22:62-9.
24. Luesch H, Wu TY, Ren B, Gray NS, Schultz PG, Supek F. A genome-wide overexpression screen in yeast for small-molecule target identification. *Chem Biol* 2005; 12:55-63.
25. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340:245-6.
26. Licitra EJ, Liu JO. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:12817-21.
27. Eaglestone SS, Ruddock LW, Cox BS, Tuite MF. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:240-4.
28. Ferreira PC, Ness F, Edwards SR, Cox BS, Tuite MF. The elimination of the yeast [PSI+] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol Microbiol* 2001; 40:1357-69.
29. Jung G, Masison DC. Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: A possible explanation for its effect in curing yeast prions. *Curr Microbiol* 2001; 43:7-10.
30. Jung G, Jones G, Masison DC. Amino acid residue 184 of yeast Hsp104 chaperone is critical for prion-curing by guanidine, prion propagation, and thermotolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:9936-41.
31. Grimminger V, Richter K, Imhof A, Buchner J, Walter S. The prion curing agent guanidinium chloride specifically inhibits ATP hydrolysis by Hsp104. *J Biol Chem* 2004; 279:7378-83.
32. Wegryn RD, Bapat K, Newnam GP, Zink AD, Chernoff YO. Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. *Mol Cell Biol* 2001; 21:4656-69.
33. Zhou P, Derkatch IL, Liebman SW. The relationship between visible intracellular aggregates that appear after overexpression of Sup35 and the yeast prion-like elements [PSI(+)] and [PIN(+)]. *Mol Microbiol* 2001; 39:37-46.
34. Bradley ME, Bagriantsev S, Vishveshwara N, Liebman SW. Guanidine reduces stop codon read-through caused by missense mutations in SUP35 or SUP45. *Yeast* 2003; 20:625-32.
35. Bach S, Talarek N, Andrieu T, Vierfond JM, Mettey Y, Galons H, Dormont D, Meijer L, Cullin C, Blondel M. Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 2003; 21:1075-81.
36. Bach S, Thibouillard D, Talarek N, Desban N, Gug F, Galons H, Blondel M. A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* 2006; 39:72-7.
37. Thibouillard D, Bach S, Gug F, Desban N, Beringue V, Andrieu T, Dormont D, Galons H, Laude H, Vilette D, Blondel M. Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnol J* 2006; 1:58-67.

IV. Criblage d'une molécule "médicament" contre les maladies à prions.

Article 5 :

Antihypertensive drug Guanabenz shows activity against both yeast and mammalian prions: toward a new therapeutic indication

Présentation/Résumé

A ce jour, aucun traitement n'est disponible contre les maladies à prions affectant de nombreuses espèces de mammifères dont l'homme. Stanley Prusiner et Byron Caughey ont isolé un certain nombre de molécules actives contre le prion de mammifère grâce à un système de neuroblastomes murins chroniquement infectés par le prion de mammifère. De par la lourdeur des systèmes de criblage existants qui obligent à pratiquer les expériences en laboratoire de type P3, le criblage haut-débit est rendu très difficile. La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* contient aussi des prions mais qui ne sont pas toxiques pour la levure ainsi que, plus important, pour le manipulateur rendant ainsi les expériences tout à fait réalisables sur une paillasse conventionnelle. Nous avons ainsi décidé d'utiliser la levure comme outil pour mettre au point un système de criblage haut-débit, économique, simple, rapide et efficace en faisant le pari d'une conservation des mécanismes de prionisation de la levure à l'homme (articles 1 et 2).

Parmi les nombreuses chimiothèques testées, une chimiothèque de molécules toutes au moins en phase 2 de tests cliniques a été criblée afin d'isoler des molécules qui auraient une activité antiprion en plus de leur effet déjà connu contre une toute autre maladie. C'est ce que l'on appelle le repositionnement thérapeutique. De ce crible, deux molécules présentaient une activité antiprion chez la levure : le Guanabenz (GA), utilisé pour traiter l'hypertension, et la Tacrine, premier médicament autorisé dans le traitement symptomatique des formes légères à modérées de la maladie d'Alzheimer.

Ces molécules ont ensuite été testées contre le prion de mammifère dans deux systèmes très différents : 1- des cellules épithéliales de lapin (cellules Rov 9) et 2- des cellules astrogliales de souris (Mov) (collaboration avec le Dr. Didier Vilette) exprimant toutes les deux la PrP ovine et infectées par le prion ovin. La résistance de PrP^{Sc} à un traitement à la protéinase K, donc la présence ou l'absence de PrP (détectée par des analyses immunologiques) après traitement avec les différentes molécules indique si PrP était sous forme pathologique (PrP^{Sc})

ou bien sous sa forme normale (PrP^C), donc si les molécules ont curé ou non les cellules infectées par PrP^{Sc}. Alors que la Tacrine ne présente aucun effet contre les prions de mammifère, le Guanabenz présente lui une activité antiprion avec une IC50 de 5 µM sur cellules Mov. En collaboration avec l'équipe du chimiste Hervé Galons (université René Descartes, Paris 6), une étude structure-activité a été menée. Une autre molécule, GAh, très proche chimiquement (puisqu'il y a seulement un atome de chlore en plus) a également présenté une activité antiprion mais supérieure à celle du GA alors qu'une autre, GAi, également très proche (puisqu'il y a remplacement des deux chlore par un fluore) ne présente aucune activité antiprion *in vivo* en système levure. Les mêmes résultats ont aussi été observés *ex vivo* en systèmes mammifère.

Le GA exerce son activité anti-hypertensive par son activité d'agoniste des récepteur $\alpha 2$ adrénergiques. Pour cette raison, nous avons ensuite testé *in vivo* en levure et *ex vivo* en systèmes mammifères d'autres composés anti-hypertenseurs agonistes ou antagonistes des récepteur $\alpha 2$ adrénergiques dans le but de déterminer si l'activité antiprion du GA était liée à sa capacité à interférer avec les récepteur $\alpha 2$ adrénergiques. Aucune activité antiprion de ces molécules n'a été révélée, suggérant que le GA agit par une autre voie que celle qui est impliquée pour son activité anti-hypertensive.

Enfin, le GA a été testé *in vivo* dans un modèle souris de maladie à prion. L'accumulation splénique de PrP^{Sc} est observée après traitement ou non chez la souris infectée. En effet, après infection, la PrP^{Sc} s'accumule en premier au niveau de la rate avant d'être acheminée dans le cerveau. Les résultats obtenus indiquent une baisse de plus de 50% de la quantité de PrP^{Sc} accumulée dans la rate au bout de 45 jours d'infection et dans le cas d'un traitement par le GA. En plus de l'accumulation de PrP^{Sc} dans la rate, la survie des souris atteintes et traitées ou non par le GA a aussi été observée. Les résultats montrent qu'un traitement de 4 mg/kg trois fois par semaine augmente de 19% la survie des animaux. Ces résultats peuvent par ailleurs être optimisés puisque la demi-vie du GA est très courte, il faudrait ainsi en administrer plus régulièrement, dans l'eau de boisson par exemple, pour observer éventuellement une augmentation de la survie supérieure.

De surcroît, le GA est une molécule capable de traverser la barrière hémato-encéphalique qui a déjà passé tous les tests cliniques puisqu'elle est déjà sur le marché pour le traitement de l'hypertension. Elle pourrait ainsi être rapidement utilisée pour des traitements compassionnels contre les maladies à prions chez l'homme.

Point important, il existe de nombreuses évidences indiquant que des mécanismes d'apparition communs existent entre les maladies à prions et d'autres maladies également

dues à des problèmes de repliements de protéines telles que les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson mais aussi certaines formes de mucoviscidose. Le GA a donc été testé dans des modèles de la maladie de Huntington et de mucoviscidose, et elle semble également être active contre ces maladies. Nos molécules ont donc un avenir potentiel dans le traitement de ces maladies.

Article 5

Antihypertensive drug Guanabenz is active *in vivo* against both yeast and mammalian prions

Déborah Tribouillard^{1,2}, Vincent Beringue³, Nathalie Desban², Fabienne Gug⁴, Stéphane Bach², Hervé Galons⁴, Hubert Laude³, Didier Vilette^{3,5} and Marc Blondel^{1,2}

¹ INSERM U613, CHU de Brest, Faculté de Médecine de l'Université de Bretagne Occidentale, 46 rue Félix Le Dantec, 29220 BREST cedex 2, France

² CNRS UPS2682, Station Biologique, Amyloids & Cell Division Cycle Laboratory, place Georges Teissier, 29680 ROSCOFF, France

³ INRA, Unité de Virologie & Immunologie Moléculaires, JOUY-EN-JOSAS, France

⁴ Laboratoire de Chimie Organique 2, Université René Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 PARIS cedex 06, France

⁵ present address: UMR INRA/ENVT 1225, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE cedex 03, France

Correspondence should be addressed to M.B. (<marc.blondel@univ-brest.fr>).

Prion-based diseases are incurable transmissible neurodegenerative diseases (Weissmann and Aguzzi, 2005). Here we report on the discovery of the *in vivo* antiprion activity of the Guanabenz (GA) which is routinely used in human medicine as an antihypertensive drug due to its agonist effect on α 2-adrenergic receptors. GA was first isolated as active *in vivo* against two different yeast prions using a previously described yeast-based two step assay (Bach et al., 2003; Bach et al., 2006). It was then shown to be able to promote PrP^{Sc} clearance in a murine cell-based assay. These effects are very specific as evidenced by the inactivity of some derivatives that were generated and does not involve its agonist activity on α 2-adrenergic receptors as evidenced by the inactivity of other anti-hypertensive agents possessing related mechanism of action. Finally, GA was active in a mouse-based *in vivo* assay for ovine prion propagation by inducing a prolonged survival of treated animals. GA thus belongs to the limited family of compounds active *in vivo* in animal models for the treatment of prion-based diseases. Because it is already in clinic in human and has been in use for many years to treat hypertension on a daily basis, without major side-effects, our results indicate that it could be rapidly evaluated in human as a potential treatment for prion-based diseases.

Prion-based diseases are transmissible and invariably fatal neurodegenerative disorders including Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, bovine spongiform encephalopathies in cattle and scrapie in sheep and goat for which no treatment is currently available (Trevitt and Collinge, 2006). These diseases are associated with neuronal cell death which lead to characteristic “spongiform” vacuolation of the brain. According to the “protein only” hypothesis, prions are solely composed of an abnormal form of the PrP protein, a GPI anchored protein normally expressed at the surface of a number of cell types including in particular neurons. PrP

exists in two forms, a “normal” form (PrP^C) and a pathological, misfolded and protease resistant form (PrP^{Sc}). PrP^{Sc} shows an increase in β -sheet structures and forms aggregates. Based on the assumption that PrP^{Sc} corresponds to (or at least is part of) the pathogenic entity, various approaches aiming at reducing PrP^{Sc} or PrP^C levels for finding therapies for prion-based diseases are currently explored (comprehensively reviewed in (Trevitt and Collinge, 2006)). Indeed, recent results showed that depleting of PrP^C from neurons of prion-infected mice where the *PRNP* gene (encoding for PrP protein) can be turned off, not only prevented progression of clinical disease, but also reversed spongiosis (Mallucci et al., 2003). Thus approaches leading to reduction of endogenous PrP^C or PrP^{Sc} levels may well be effective after the appearance of symptoms. Among these approaches are passive or active vaccinations (Gabizon et al., 1988; Horiuchi and Caughey, 1999) whereas others aim at the identification of pharmacological compounds promoting PrP^{Sc} clearance. Some of these approaches are based on the use of cell-free systems (Bertsch et al., 2005; Cordeiro et al., 2004; Soto et al., 2000; Supattapone et al., 1999) whereas others are based on the use of mammalian cells chronically infected with PrP^{Sc} (Archer et al., 2004; Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001; Vilette et al., 2001). In all these assays, the presence of PrP^{Sc} is monitored by the proteinase K sensitivity assay: whereas PrP^C is sensitive to this protease, PrP^{Sc} partially resists and thus remains immunologically detectable. All these assays are not easily amenable to high-throughput screening, in particular because experiments have to be done in highly secured laboratories. For this reason, we recently developed a rapid and economical budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)-based two step assay to screen anti-prion (Bach et al., 2003; Bach et al., 2006). Indeed since 1994 (Wickner, 1994) it is known that budding yeast contains several proteins behaving like prions (reviewed in (Benkemoun and Saupe, 2006)) and several simple reporter systems have been developed to investigate their behaviour. In a first step, molecules from various chemical libraries were

isolated on the basis of their *in vivo* activity against the [*PSI+*] yeast prion and then the active hits were confirmed against [URE3], a second yeast prion unrelated to [*PSI+*]. Both steps are based on the use of a white and red colony coloration system: prion containing yeast cells form white colonies on rich medium (YPD) whereas cells cured for the prion phenotype give red colonies. Our initial assumption that prion controlling mechanisms could be conserved from yeast to mammals was confirmed when most of the active compounds isolated in the yeast-based assay turned out to be also active to promote PrP^{Sc} clearance in three different mammalian cell-based assays (Bach et al., 2003; Tribouillard et al., 2006).

Among others, the Prestwick chemical library, composed of 880 molecules which are either in phase II/III clinical trials or already marketed and used in clinic was screened using the yeast-based assay. As internal controls we found Chlorpromazine (CPZ) and Quinacrine (QC), which are present in the Prestwick library, to be weakly active against yeast prions, as previously observed (Bach et al., 2003). Among all the other drugs, two presented a strong activity against yeast prions: Tacrine (TA), a cholinesterase inhibitor in clinic for the symptomatic treatment of memory loss in Alzheimer's disease (Levy, 1989) and Guanabenz acetate (GA), an agonist of α_2 -adrenergic receptor used in the treatment of hypertension (Holmes et al., 1983). TA and GA were both isolated as active against [*PSI+*] prion (Figure 1 panel A and panel B, left) and were then evaluated against [URE3] prion and found to be also active (panel B, right). Both compounds were then tested for their ability to promote PrP^{Sc} clearance in the Mov9 cell-based assay (Archer et al., 2004). This assay is based on a murine epithelial cell line expressing ovine PrP gene under the control of its endogenous promoter (Mov9 cells). Cells were then infected by a lysate prepared from the brains of infected sheep. These scrapie-infected Mov9 cells could then grow, divide and propagate PrP^{Sc}. The state of PrP was monitored using the proteinase K sensitivity

assay. Interestingly, whereas TA was found to be totally inactive, GA was found to be active against mammalian prion in this cell based-assay (Figure 3 panel A). By testing different concentrations, a dose-dependent antiprion effect was observed which allowed us to determine IC_{50} for GA: about 5 μ M (Figure 3, panel A, right). In the same experiment we followed by Western blot analysis the level of total PrP (before proteinase K digestion) to observe if GA could have an effect on PrP expression in Mov9 cells (Figure 3 panel A, bottom). As the PrP level remained unchanged, we conclude that GA does not act by decreasing the steady state level of PrP which could indirectly have an effect on the level of PrP^{Sc}. We also incubated protein lysates from infected Mov9 cells for five hours with 10 or 100 μ M of GA and then submitted them to proteinase K assay in order to observe if this drug would be able to act directly on PrP^{Sc} aggregates. As shown in Figure 3, panel B, even 100 μ M GA (which represents 20 times the IC_{50} value observed in cell culture) the level of PrP^{Sc} remained unchanged meaning that this molecule was not active *in vitro* against PrP^{Sc} aggregates.

Chemical derivatives of GA were then synthesized and tested against both yeast and mammalian prions using respectively the yeast-based and Mov9-based assays described above. As shown in Figure 2, suppressing only one of the two chlorine or even replacing it by a fluorine was sufficient to lead to a complete loss of activity. In contrast, adding a supplementary chlorine strongly increased its activity against [PSI⁺] and [URE3] highlighting the importance of these two chlorines. This also confirmed the specificity of the screening method.

To test if GA antiprion effect observed in Mov9 cells could be due to the agonist activity of the compound on α 2-adrenergic receptors (which is responsible of its antihypertensive action), we tested Clonidine (CD), a compound which is pharmacologically and chemically very close to GA. CD is also an agonist of α 2-adrenergic receptor used in clinic as an antihypertensive agent

(Houston, 1982). CD did not exhibit any antiprion activity in yeast nor in Mov9 cells (Figure 2) suggesting that the antiprion activity of GA probably does not involve the same mechanism than the one related to its antihypertensive action. The same result was obtained when using a variety of agonist or antagonists of α 1- or α 2-adrenergic receptor (Figure 2). In addition the antiprion activity of GA in *S. cerevisiae* cannot be due to its agonist activity on α 2-adrenergic receptors as yeast does not contain adrenergic receptors. Taken together, these results suggest that antiprion of GA is not related to the same mechanism than its antihypertensive effect.

We then evaluated the *in vivo* effect of Guanabenz acetate on mammalian prion using a mouse model for prion-based disease (Beringue et al., 2000). Mice expressing ovine PrP were scrapie-infected by intraperitoneal inoculation with the scrapie agent and then treated once a week, three times a week or not by Guanabenz acetate (10 mg/kg). In this model, due to the progress of infection, the presence of PrP^{Sc} can be monitored in the spleen already a few weeks after infection reaching a plateau after 4 weeks. 49 days after infection, we determined the level of PrP^{Sc} in the spleen of untreated mice (Figure 4, panel A, left) and of mice treated with GA (Figure 4, panel A, right). A modest but significant decrease in the quantity of PrP^{Sc} was observed, indicating that GA is able to decrease or slow down the infectivity process. These results prompted us to repeat experiment and to extend treatment to the onset of the disease. For this purpose, we used the same mouse model and treated mice once a week (10 mg/kg) or three times a week (3 mg/kg) or not by GA. We then stopped treatment when the first symptoms appeared and determined the timing of mortality for the various mice batches. As indicated in Figure 4 panel B, we found a small but significant life prolongation for mice treated once a week

(10 mg/kg): mice died at 101 days +/- 1 day compared to what was obtained for untreated control mice. Interestingly, mice treated three times a week but only with 3 mg/kg GA exhibited and expanded life prolongation and even one animal survived more than 200 days. This result suggests that a more frequent treatment with a lower dose could have better effect.

DISCUSSION

Taken together, our results indicate that GA, a drug already in clinical use for the treatment of hypertension (Holmes et al., 1983), is active *in vivo* against both yeast and mammalian prions. For this reason, our data strongly suggest a potential new therapeutic indication for Guanabenz acetate in the treatment of prion-based disease in mammals, particularly in man. As GA has already been used safely in clinic for almost 25 years without any major side-effects and as its pharmacology and toxicology are very well known, we believe that it could be rapidly evaluated in compassionate treatments for human prion-based disease. This is particularly appealing when one considers that quinacrine and chlorpromazine, two compounds already in clinic since many times for other applications and recently tested in human for compassionate treatment of CJD, were totally ineffective, even in combination, in a mouse model similar to the one we used (Barret et al., 2003; Collins et al., 2002). Furthermore these two molecules exhibit severe side effect which contrast with GA (Holmes et al., 1983), which can be safely used for years on a daily basis as an anti-hypertensive agent. Another molecules now tested in human is Dextran Sulfate (DS 500). DS500 was found to be active in mouse model for TSE (Farquhar et al., 1999; Farquhar and Dickinson, 1986) and is now evaluated for the treatment of CJD in human using intracerebellar pump.

Experimental protocol

Yeast strains and culture media. Yeast strains used in this study were as follows. Strg6: *Mata*, *erg6::TRP1*, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3 Δ 200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*, [*PSI+*] and SB34: *Mata*, *erg6::TRP1*, *dal5::ADE2*, *ade2-1*, *trp1-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*, *ura2::HIS*, [*URE3*] and were grown as described (Bach et al., 2003).

PrP^{Sc} inhibition assay in Mov9 cells. Experiments were done as described previously (Archer et al., 2004).

References

- Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J.L. and Laude, H. (2004) Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol*, **78**, 482-490.
- Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C. and Blondel, M. (2003) Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*, **21**, 1075-1081.
- Bach, S., Tribouillard, D., Talarek, N., Desban, N., Gug, F., Galons, H. and Blondel, M. (2006) A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods*, **39**, 72-77.
- Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmona, M., Colombo, L., De Luigi, A., Limido, L., Suardi, S., Rossi, G., Auvre, F., Adjou, K.T., Sales, N., Williams, A., Lasmezas, C. and Deslys, J.P. (2003) Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol*, **77**, 8462-8469.
- Benkemoun, L. and Saupe, S.J. (2006) Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet Biol*.
- Beringue, V., Adjou, K.T., Lamoury, F., Maignien, T., Deslys, J.P., Race, R. and Dormont, D. (2000) Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol*, **74**, 5432-5440.
- Bertsch, U., Winklhofer, K.F., Hirschberger, T., Bieschke, J., Weber, P., Hartl, F.U., Tavan, P., Tatzelt, J., Kretschmar, H.A. and Giese, A. (2005) Systematic identification of anti-prion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J Virol*, **79**, 7785-7791.
- Collins, S.J., Lewis, V., Brazier, M., Hill, A.F., Fletcher, A. and Masters, C.L. (2002) Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol*, **52**, 503-506.
- Cordeiro, Y., Lima, L.M., Gomes, M.P., Foguel, D. and Silva, J.L. (2004) Modulation of prion protein oligomerization, aggregation, and beta-sheet conversion by 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS). *J Biol Chem*, **279**, 5346-5352.
- Doh-Ura, K., Iwaki, T. and Caughey, B. (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol*, **74**, 4894-4897.
- Farquhar, C., Dickinson, A. and Bruce, M. (1999) Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*, **353**, 117.
- Farquhar, C.F. and Dickinson, A.G. (1986) Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol*, **67 (Pt 3)**, 463-473.
- Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D. and Prusiner, S.B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6617-6621.
- Holmes, B., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M. and Avery, G.S. (1983) Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs*, **26**, 212-229.
- Horiuchi, M. and Caughey, B. (1999) Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *Embo J*, **18**, 3193-3203.

- Houston, M.C. (1982) Clonidine hydrochloride. *South Med J*, **75**, 713-719.
- Korth, C., May, B.C., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9836-9841.
- Levy, R. (1989) Tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet*, **2**, 329.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klöhn, P.C., Brandner, S. and Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871-874.
- Soto, C., Kasczak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kasczak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I. and Frangione, B. (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, **355**, 192-197.
- Supattapone, S., Nguyen, H.O., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Scott, M.R. (1999) Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14529-14534.
- Trevitt, C.R. and Collinge, J. (2006) A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain*, **129**, 2241-2265.
- Tribouillard, D., Bach, S., Gug, F., Desban, N., Beringue, V., Andrieu, T., Dormont, D., Galons, H., Laude, H., Vilette, D. and Blondel, M. (2006) Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnol J*, **1**, 58-67.
- Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M.F., Vilotte, J.L., Lehmann, S. and Laude, H. (2001) Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4055-4059.
- Weissmann, C. and Aguzzi, A. (2005) Approaches to therapy of prion diseases. *Annu Rev Med*, **56**, 321-344.
- Wickner, R.B. (1994) [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **264**, 566-569.

Figures legends

Figure 1: Isolation of guanabenz as active against yeast prion.

- A.** An aliquot of an overnight culture of the appropriate *erg6Δ* [*PSI+*] strain (STRg6 -which grows as white colonies-) was spread on a Petri plate containing YPD medium supplemented with 200 μ M GuHCl and small filters (similar to the ones used for antibiograms) were placed on the agar surface. Individual compounds from the Prestwick chemical library (5 μ l of a 5 mM solution) were applied to each filter, except for the top left filter where DMSO was added (negative control: -) and for the bottom right filter where 5 μ l of a 300 mM GuHCl solution in DMSO was added (positive control: +). The Petri plate was then incubated three days at 25°C. When a compound was active against [*PSI+*], a halo of red colonies appears around the filter where it was spotted. The molecular structure of Guanabenz acetate is depicted on top. Note that Guanabenz acetate is strongly active against [*PSI+*] prion.
- B.** Guanabenz acetate was then tested against [*URE3*] prion using the same kind of assay. Note that it is also active against this other yeast prion.

Figure 2: Activity of chemical derivatives of Guanabenz

The same quantity of Guanabenz and of three derivatives was spotted on the filters following the same protocol as the one described in figure 1. Note the lack of activity of all three analogs.

Figure 3: Guanabenz efficiently promotes PrP^{Sc} clearance in an *ex vivo* murine cell-based assay

- A.** Scrapie-infected Mov9 cells were treated for six days with the indicated concentrations of GA and then lysed. Cell lysates were then subjected to proteinase K digestion followed by Western blot analysis using an anti-PrP antibody (upper gel) or directly analyzed by Western blot analysis using an anti-PrP antibody before proteinase K treatment (lower gel). On the right a graph representing the quantity of remaining PrP^{Sc} as a function of GA concentration is shown. Note that GA was active against PrP^{Sc} in a dose-dependent manner (IC₅₀: 5 μM) and without any effect on PrP expression.
- B.** Cell lysates of scrapie-infected Mov9 cells were subjected directly to the indicated concentration of GA or, as controls to the corresponding quantity of DMSO, the compound vehicle, and then subjected to proteinase K digestion followed by Western blotting analysis using an anti-PrP antibody. Note that GA, even at 100 μM (20 times the IC₅₀) was unable to resolubilize PrP^{Sc} indicating that it probably does not act directly on prion aggregates.

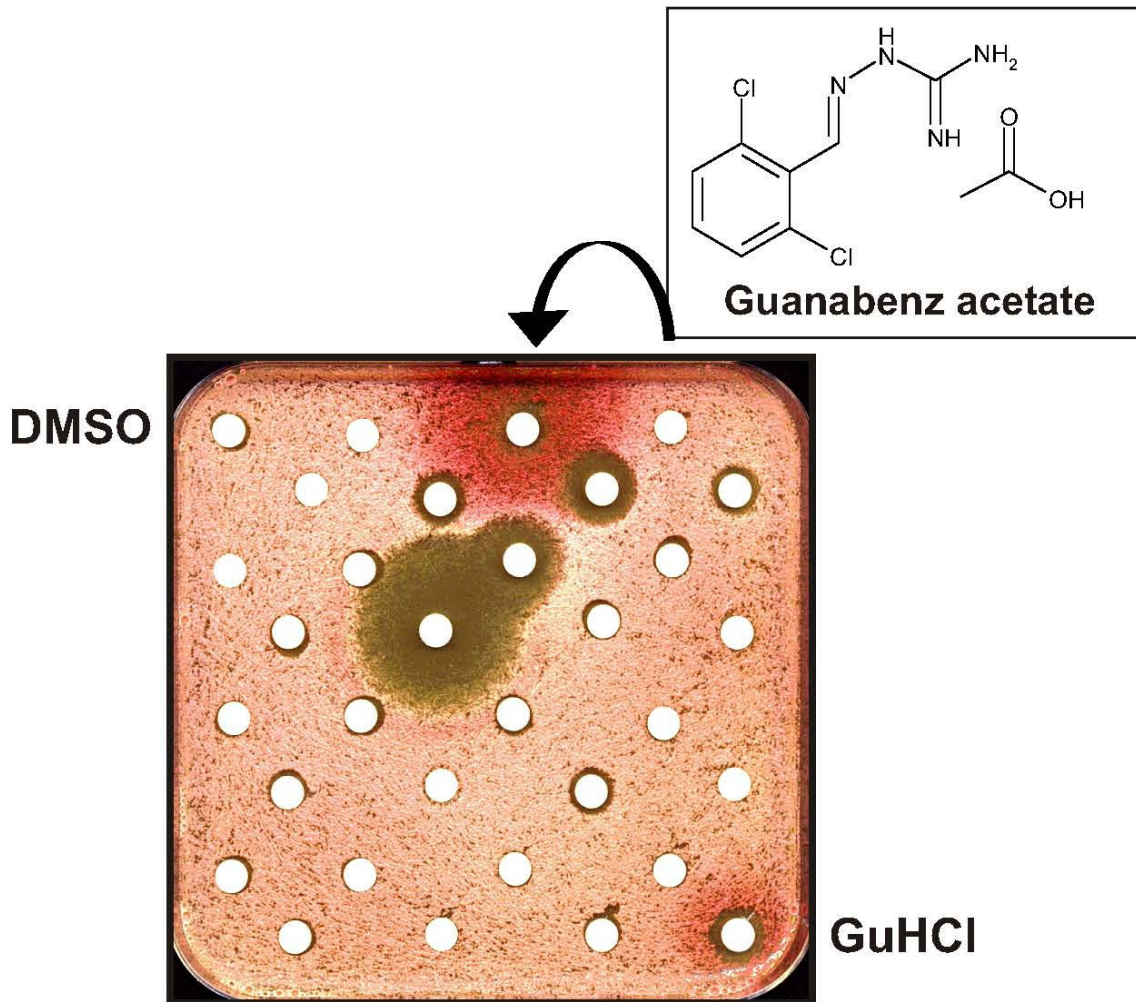
Figure 4:

- A.** Scrapie-infected mice expressing ovine PrP were treated by intraperitoneal injection once a week or not (Control) with GA at 10 mg/kg. After 49 days of treatment the rate of PrP^{Sc} detectable in the spleen was determined using the proteinase K resistance assay as described in figure 3. Note that spleens of mice treated with GA contain significantly less PrP^{Sc} than spleens of control, untreated mice. On the right panel is shown quantification of the Western blot shown on the left panel.

- B.** Percentage of surviving mice according to the type of treatment. Note that GA treatment lead to a slight but significant increase in survival.

Figure 1

a



b

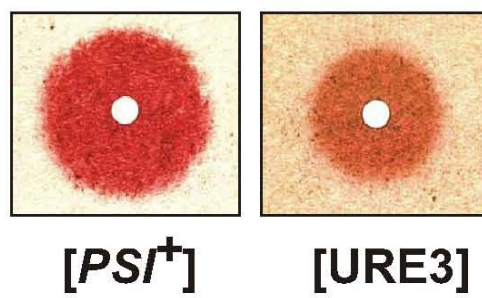
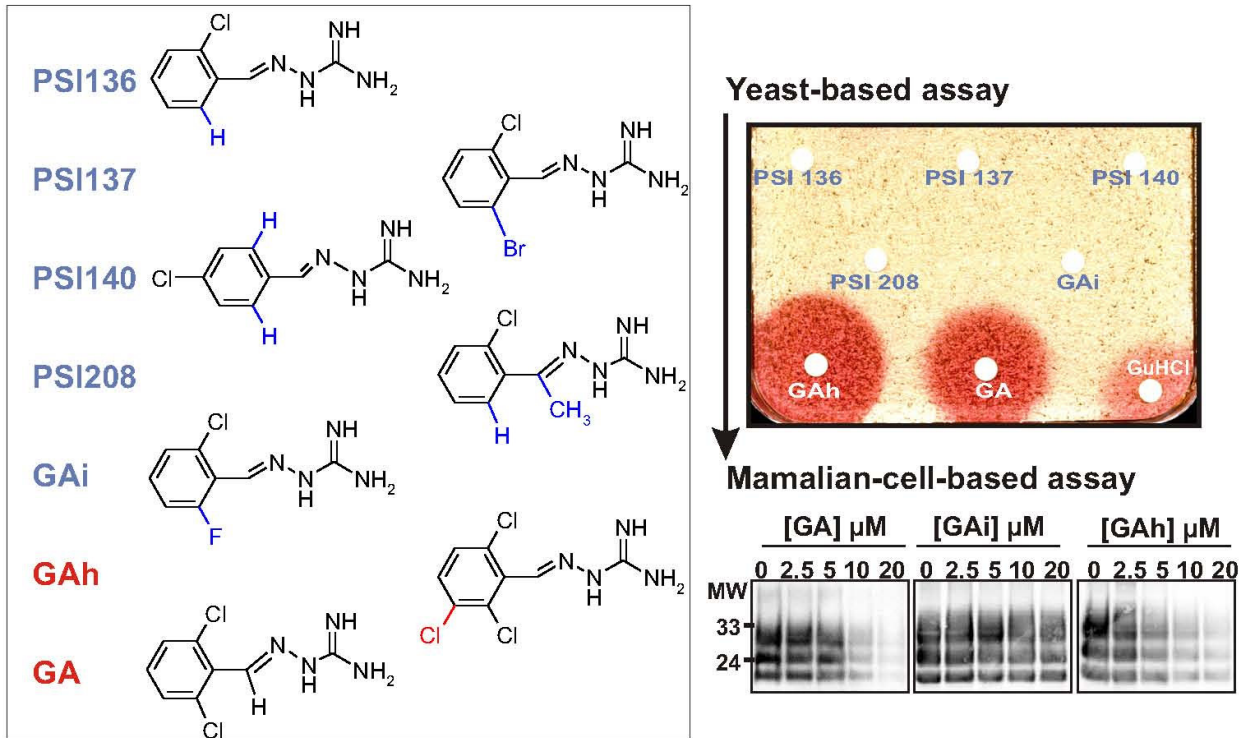


Figure 2

a



b

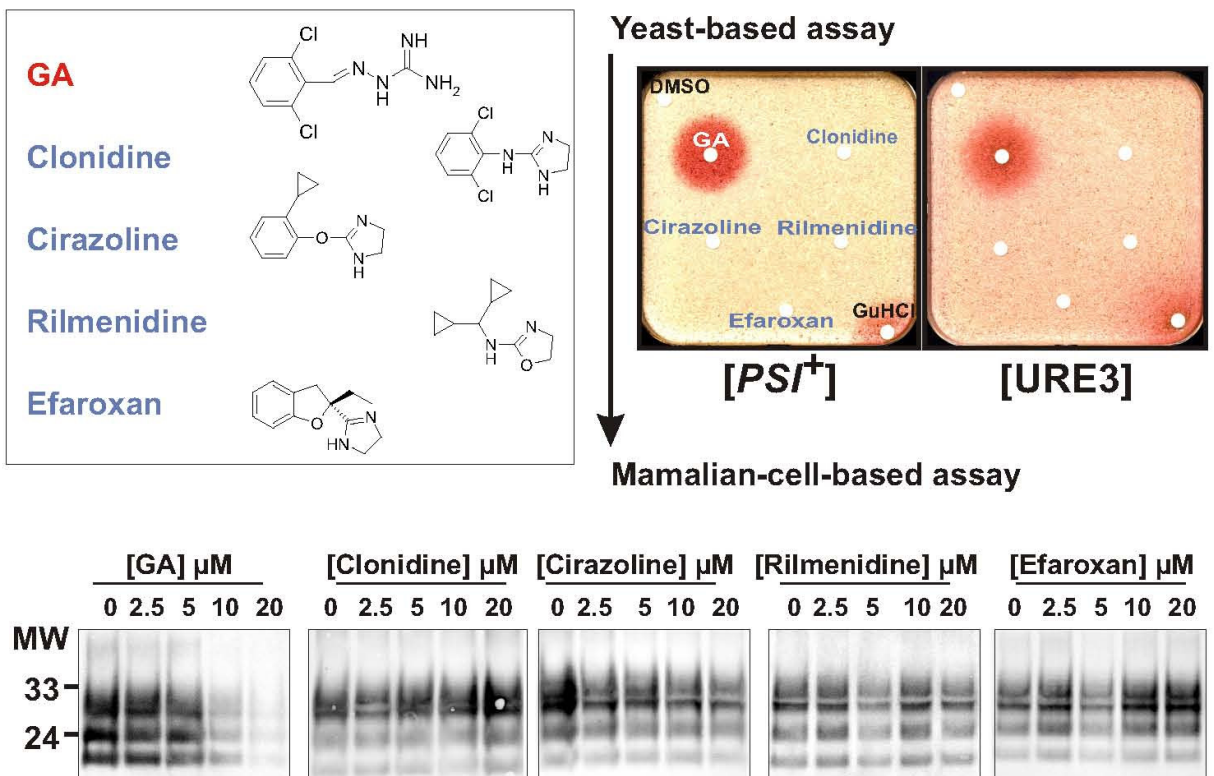
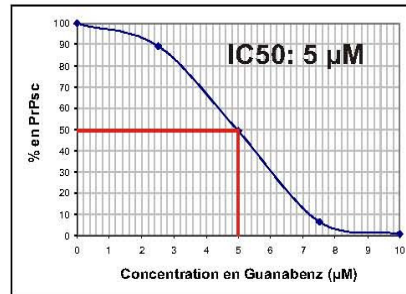
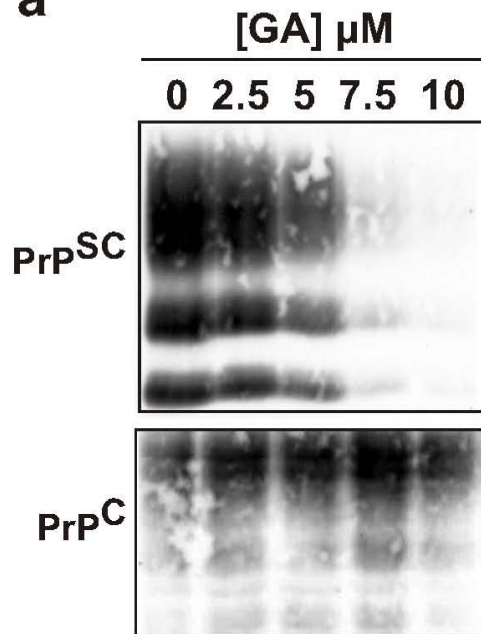


Figure 3

a



b

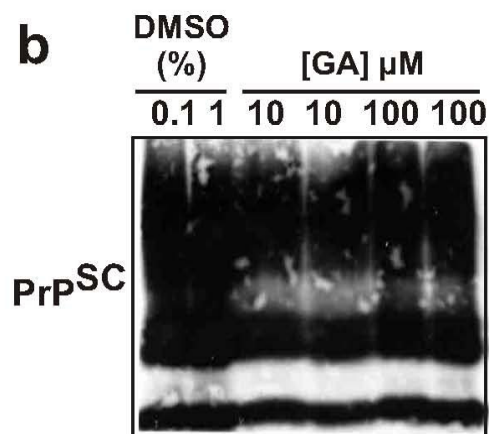
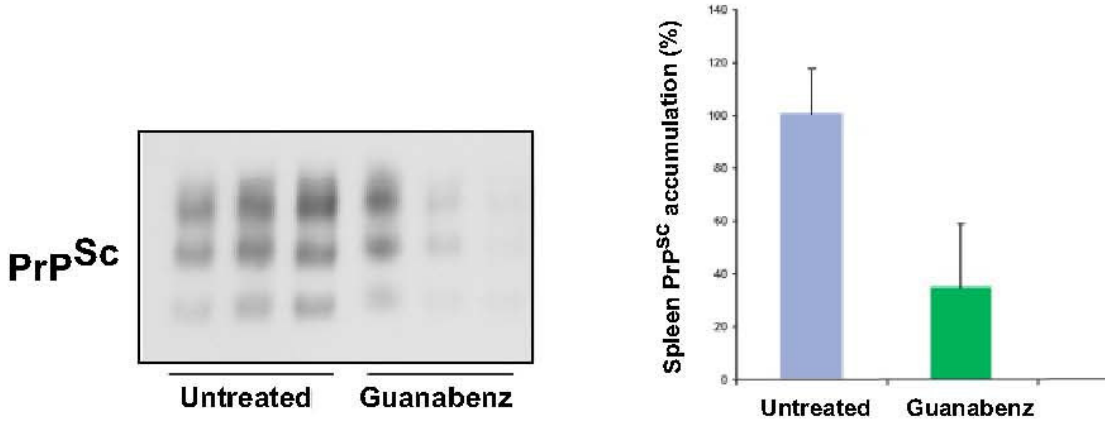


Figure 4

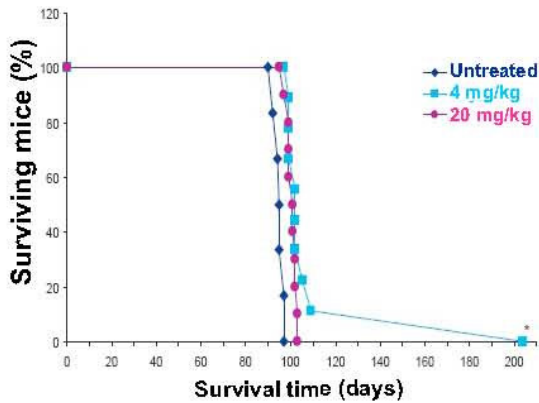
a



b

Survival time

Treatment	Dose	n/n ₀	Mean survival time in days (sem)	Increase (%)
Untreated		6/6	95 (1)	
Guanabenz	4 mg/kg 3X/week 20 mg/kg 1X/week	9/9 10/10	113 (11) 101 (1)	19 6



PrPsc levels in brain and spleen similar to control

V. La 6AP et le GA inhibent spécifiquement l'activité de chaperon de protéines du ribosome

Article 6 :

Protein folding activity of rRNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs

Présentation/Résumé

Lors du premier criblage *in vivo* en levure de molécules à activité antiprion, d'une chimiothèque de 2500 molécules, six composés ont été isolés dont la phénanthridine. Par une approche structure-activité, l'activité antiprion de la phénanthridine a pu être optimisée par ajout d'un groupement amino en position 6 (collaboration avec le chimiste Hervé Galons), donnant ainsi la 6 amino phenanthridine ou 6AP, mais son activité a aussi pu être inhibée par l'ajout d'un autre groupement, donnant la 6APi, de structure très proche mais inactive contre les prions. Pour les expériences à venir, nous aurons donc nos molécules actives, GA et 6AP mais également de très bons contrôles négatifs internes, GAi et 6APi. Comme le Guanabenz, la 6AP, s'est avérée être également active *ex vivo* avec une IC50 de 7,5 μM (dans le système de cellules Mov, le même que celui qui a permis de tester l'activité du GA, mais également dans le système de cellules Rov9, basé sur des cellules épithéliales de lapin (collaboration avec le Dr. Didier Vilette, INRA de Jouy-en-Josas). De plus, la 6AP présente aussi une activité antiprion, *in vivo* dans des modèles souris de maladies à prions (données non montrées dans ce papier).

L'objectif était ensuite de revenir à la recherche fondamentale en utilisant nos drogues antiprion comme des « hameçons » moléculaires pour identifier leurs cibles intracellulaires afin de mieux comprendre, **1-** leurs mécanismes d'action, **2-** les phénomènes de prionisation, et **3-** pour appréhender les éventuels effets secondaires de la 6AP et du GA dans le cadre de développements cliniques ultérieurs.

Pour cela nous avons utilisé un crible biochimique basé sur l'utilisation de matrices d'affinité constituées de 6AP ou de GA immobilisées sur des billes de sépharose, déjà décrites dans les articles 3 et 4 de ce manuscrit. Les protéines interagissant avec la 6AP ou le GA se fixent sur ces matrices d'affinité et, après des lavages intensifs des billes, sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse.

La première question que nous nous sommes posée était de savoir si nos drogues agissaient plutôt *en cis* (directement sur la molécule PrP) ou plutôt *en trans* (sur des facteurs cellulaires impliqués dans la formation et la propagation des prions). Pour répondre à cette question, trois types d'expériences ont été réalisées :

1- des western-blots avec des anticorps anti-prion (anti-PrP, anti-Sup35p et anti-Ure2p) ont été effectués sur les protéines éluées lors de différentes chromatographies d'affinité. Aucun signal n'est apparu, ainsi ni PrP, ni même Sup35p ou Ure2p ne présente d'affinité détectable avec la 6AP, **2-** des expériences de PMCA (*Protein misfolding cyclic amplification*), en collaboration avec Surachai Supattapone (Dartmouth Medical School, Hanover) ont montré que les drogues antiprion n'avaient aucun effet *in vitro* sur la transconformation de PrP^C en PrP^{Sc} et

3- des expériences de formation de fibres amyloïdes *in vitro* montrent que la 6AP et le GA n'ont aucun effet *in vitro* sur la formation des fibres amyloïdes d'Ure2p et de HET-s (collaboration avec Sven Saupe, IBGC de Bordeaux).

Ainsi, la 6AP et le GA ne semblent pas agir *en cis* mais plutôt *en trans*. De fait, l'identification par spectrométrie de masse des protéines qui se fixent à la 6AP et au GA après chromatographie d'affinité a conduit à l'identification des chaperons de protéines et du ribosome. La 6AP et le GA fixent les protéines ribosomales de façon ARN-dépendante puisque, après digestion à la RNase A, aucune protéine ne reste fixée aux matrices de 6AP ou de GA. Par ailleurs, une expérience de chromatographie à partir d'extrait totaux d'ARN révèle que la 6AP et le GA fixent directement les ARN ribosomaux. Il est maintenant bien documenté que le ribosome a essentiellement deux fonctions portées par le grand ARNr : une fonction bien connue dans la synthèse protéique et une fonction un peu moins connue de chaperon de protéine. Dès lors, la question qui s'impose est la suivante: quelle est l'activité biologique du ribosome qui est inhibée par la 6AP et le GA ? Est-ce la fonction de traduction ou est-ce la fonction chaperon ou bien encore, les deux à la fois ? Des expériences *in vitro* et *in vivo* de traduction ont montré que la 6AP et le GA n'affectaient pas la fonction de synthèse protéique. Par contre, des tests *in vitro* d'activité de chaperon de protéines du ribosome montrent que la 6AP et le GA inhibent spécifiquement cette fonction d'assistance au repliement des protéines qui, comme la fonction dans la traduction, est portée par le grand ARN ribosomal (ARNr 28S chez l'homme, 25S chez la levure et 23S chez la bactérie) de la grande sous-unité du ribosome (qui est ainsi un ribozyme).

Nos résultats suggèrent donc que l'activité de chaperon de protéines de l'ARNr 28S est nécessaire pour le maintien et la propagation des prions. Afin de confirmer et d'affiner ce

modèle, nous sommes actuellement en train de cartographier précisément, grâce à des expériences de « foot printing » et de « toe-printing », les zones d'interactions de la 6AP et du GA avec l'ARNr 28S.

En plus d'ajouter une pierre à l'édifice de la compréhension des mécanismes de prionisation, ces résultats ont permis la découverte de molécules inhibant spécifiquement la fonction chaperone du ribosome, inhibiteurs qui n'existaient pas jusqu'à maintenant. Les seuls inhibiteurs de la fonction chaperon de protéine connus jusqu'à présent inhibent aussi la traduction.

La 6AP et le GA, outre leur intérêt pour le développement de solutions thérapeutiques pour le traitement des maladies à prions, et peut-être plus généralement à agrégation de protéines, constituent donc des outils originaux et privilégiés pour l'étude du rôle *in vivo* de la fonction de chaperon de protéines du ribosome.

Article 6

Protein folding activity of rRNA is a selective target of two unrelated antiprion drugs

Déborah Tribouillard-Tanvier^{1,2}, Suzana Dos Reis³, Fabienne Gug⁴, Vincent Beringue⁵, Raimon Sabate⁶, Ema Kikovska³, Nicolas Talarek⁷, Stéphane Bach², Chenhui Huang³, Nathalie Desban², Sven J. Saupe⁶, Surachai Supattapone⁸, Jean-Yves Thuret⁹, Stéphane Chédin⁹, Didier Vilette^{5,10}, Hervé Galons⁴, Suparna Sanyal³, and Marc Blondel^{1,2}

¹ INSERM U613, CHU de Brest, Faculté de Médecine de l'Université de Bretagne Occidentale, 46 rue Félix Le Dantec, 29220 BREST cedex 2, France

² CNRS, Station Biologique, Amyloids & Cell Division Cycle Laboratory, place Georges Teissier, 29680 ROSCOFF, France

³ Institute of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Box-596, BMC, UPPSALA, Sweden

⁴ Laboratoire de Chimie Organique 2, Université René Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 PARIS cedex 06, France

⁵ INRA, Unité de Virologie & Immunologie Moléculaires, 78350 JOUY-EN-JOSAS, France

⁶ Laboratoire de Génétique Moléculaire des Champignons, IBGC UMR CNRS 5095, Université de Bordeaux 2, 1 rue Camille Saint Saens, 31077 BORDEAUX, France

⁷ Department of Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, BOSTON, MA 02115, USA

⁸ Departments of Biochemistry and Medicine, Dartmouth Medical School, Hanover, NH 03755, USA

⁹ SBGM, DBJC, CEA Saclay, 91191 GIF SUR YVETTE, France

¹⁰ present address: UMR INRA/ENVT 1225, 23 chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE cedex 03, France

Correspondence should be addressed to M.B. (<marc.blondel@univ-brest.fr>)

Keywords: prion, amyloid fibers, protein folding, protein chaperone, ribosome, ribosomal RNA

SUMMARY

6-Aminophenanthridine (6AP) and Guanabenz (GA, a drug currently in use for the treatment of hypertension) were isolated as antiprion drugs using a yeast-based assay. These structurally unrelated molecules are active against mammalian prion *ex vivo*, in several cell-based assays and *in vivo* in mouse models, strongly suggesting that their cellular targets are conserved from yeast to mammals. Here we report on the identification of cellular targets of these drugs. We have synthesized affinity chromatography matrices for both drugs and demonstrate an RNA-dependent interaction of 6AP and GA with ribosomes. This specific interaction has no effect on the peptidyl transferase activity of the ribosome nor on global translation. In contrast, 6AP and GA specifically inhibit the protein folding activity of the ribosome, another activity of ribosomal RNA (rRNA). We thus propose that the rRNA mediated protein folding activity is required for prion maintenance both in yeast and mammals.

INTRODUCTION

Prion-based diseases are fatal neurodegenerative disorders for which no efficient treatment is currently available (Trevitt and Collinge, 2006). These diseases are caused by proteinaceous infectious particles termed prions. According to the “protein only” hypothesis, prions are composed solely of an abnormal form of the PrP protein, a GPI anchored protein normally expressed at the surface of numerous cell types including neurons. PrP exists in two forms, a “normal” form (PrP^C) and a pathological, misfolded and protease resistant form (PrP^{Sc}). PrP^C mainly consists of α -helices and does not form aggregates. During the course of the disease, PrP^{Sc} accumulates and is capable of converting the normal PrP^C form to this altered conformation

(Prusiner, 1998). PrP^{Sc} shows an increase in β -sheet structure (Govaerts et al., 2004) and forms aggregates (Cohen et al., 1994). Prion-based diseases are thus related to other protein misfolding disorders such as Alzheimer, Parkinson or Huntington diseases, which are all characterized by the accumulation of intracellular or extracellular β -sheet rich protein aggregates.

Prions also exist in fungi. In 1994, Reed B. Wickner provided genetic evidence that a long known genetic element of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* showing unusual cytoplasmic inheritance is in fact a prion (Wickner, 1994). Other prions were then discovered in yeast and in filamentous fungi (reviewed in (Benkemoun and Saupe, 2006)) and several simple reporter systems have been developed to investigate their behaviour (Brachmann et al., 2006; Tuite and Koloteva-Levin, 2004). These model systems provided direct support for the “protein-only” hypothesis and indicated that fungal prions correspond to self-propagating amyloid or amyloid-like assemblies (Brachmann et al., 2005; King and Diaz-Avalos, 2004; Maddelein et al., 2002; Tanaka et al., 2004). Since prion replication corresponds to propagation of a misfolded state, the chaperone network has a central role in prion appearance and maintenance (Jones and Tuite, 2005). The chaperone network controls proper folding of newly synthesized proteins, assists assembly of macromolecular complexes and promotes clearance of protein aggregates. The protein chaperone activity is carried out by soluble chaperones and ribosome-associated chaperones. In addition, the ribosome itself was found to possess an intrinsic protein chaperone activity (Argent et al., 2000; Chattopadhyay et al., 1994; Chattopadhyay et al., 1996; Chattopadhyay et al., 1999; Das et al., 1996; Das Gupta, 1999; Kudlicki et al., 1997; Singh and Rao Ch, 2002). In yeast, prion propagation was demonstrated to be critically dependent on the chaperone machinery, in particular the Hsp104p chaperone (Chernoff et al., 1995). Prion propagation is also modulated by different members of the Hsp70p and Hsp40p family and additional co-chaperones.

Several approaches towards the development of prion disease therapies are currently explored. These include identification of pharmacological drugs, immunotherapeutics and PrP^C knockdown by RNA interference (Trevitt and Collinge, 2006). Therapeutics can be targeted to PrP^C, PrP^{Sc} or to the conversion process (Archer et al., 2004; Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001; Nishida et al., 2000; Vilette et al., 2001). Among the experimental systems used are animal models, cell culture and cell-free conversion assays. Relatively few studies have used systematic screening approaches of large chemical libraries. Recently we have developed a simple, economic, safe and rapid yeast-based method to screen for anti-prion drugs (Bach et al., 2003; Bach et al., 2006b). In a first screen, molecules are isolated on the basis of their *in vivo* activity against the [PSI⁺] yeast prion. The activity of positive compounds is then confirmed against [URE3], a second yeast prion which is unrelated to [PSI⁺]. In both cases we make use of a colorimetric system where prion containing yeast cells form white colonies whereas loss of prion leads to formation of red colonies. Remarkably, the vast majority of molecules isolated using this yeast-based assay turned out to be active against mammalian prion *ex vivo* in various mammalian cell-based assays ((Bach et al., 2003; Bach et al., 2006b; Tribouillard et al., 2006) and D. V. and M. B. unpublished results). This not only validates the yeast-based approach for high-throughput screening but also shows that yeast prions are relevant models for the study of mammalian prion-based diseases. Conversely, some of the antiprion drugs isolated using mammalian cell-based assays, like Quinacrine (QC) or Chlorpromazine (CPZ) were found to be active in the yeast-based assay (Bach et al., 2003). Taken together, these results strongly suggest that prion controlling mechanisms are conserved from yeast to mammals. For this reason we set out to identify intracellular targets of two of the most active compounds isolated using the yeast-based assay: 6-aminophenanthridine (6AP) and Guanabenz (GA, a drug already on the market for the treatment of hypertension (Tribouillard *et al.*, in preparation)). These drugs could potentially directly target

the prion proteins or alternatively the cellular machinery involved in prion propagation. Identification of the targets of these drugs should allow [1] to understand their mechanism of action, [2] to characterize new pathway(s) important for prion appearance and/or propagation and [3] to provide new screening targets for the isolation of antiprion drugs in *in vitro* target-based approaches.

Here we show that the two unrelated antiprion drugs 6AP and GA interact with ribosomes in an RNA-dependent manner. This interaction leads to a specific inhibition of the ribosomal protein folding activity, which is carried by the largest ribosomal RNA (23S rRNA in *E. coli*, 25S rRNA in *S. cerevisiae* and 28S rRNA in mammals) of the large subunit, whereas it has no significant effect on protein synthesis. These results suggest that the protein chaperone activity of the ribosome is required for prion maintenance both in yeast and mammals.

RESULTS

The antiprion activity of 6AP is completely absent in its close derivative 6APi

6AP (6-aminophenanthridine, molecular structure depicted in **Figure 1a**) is a potent derivative of phenanthridine, a compound originally isolated from our laboratory chemical library as active against prions using the yeast-based assay described above (Bach et al., 2003; Bach et al., 2006b). 6AP was found to be also active against mammalian prion in three mammalian cell-based assays ((Bach et al., 2003; Tribouillard et al., 2006) and **Figure 1c**, upper gel), namely the Rov system (rabbit kidney epithelial cells chronically infected by the 127S sheep prion strain (Vilette et al., 2001)), the N2a system (murine neuroblastoma cells chronically infected by the RML murine prion strain (Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001)) and the MovS system (immortalized neuroglial cells from ovine transgenic mice chronically infected by the 127S sheep

prion strain (Archer et al., 2004)). In all these assays PrP^{Sc} is detected based on its proteinase K resistance. During the course of structure-activity studies on the 6AP chemical family, numerous derivatives were synthesized. 6APi was obtained by introduction of a 2-(butan-1-ol) group (depicted in blue in **Figure 1a**) on the 6-amino position of 6AP. 6APi is totally inactive against both [*PSI*⁺] and [*URE3*] yeast prions (**Figure 1b**) and also against mammalian prion in the Mov-based assays (**Figure 1c**, lower gel). 6APi thus represents an ideal negative control for experiments involving 6AP: despite its structural similarity with 6AP it is totally inactive against both yeast and mammalian prions.

6AP does not interact with prion proteins but shows specific interactions with ribosomal components

In order to identify targets of 6AP, we synthesized a 6AP-linked affinity chromatography matrix to purify intracellular macromolecules able to physically interact with this drug (Bach et al., 2006a). To avoid possible steric hindrance between target(s) and the matrix, it was necessary to introduce a spacer between 6AP and the sepharose beads. An aminocaproylaminopentyloxy linker was chosen because of its optimal length (F. G. and H. G., in preparation). In addition, its internal peptidic bond lowers its hydrophobicity therefore reducing potential auto-aggregation or unspecific hydrophobic interactions with macromolecules from the cell lysate. Furthermore, the amide function increases rigidity of the linker. The position where this aminocaproylaminopentyloxy extension can be introduced while maintaining the antiprion activity of 6AP was determined by testing the antiprion activity of 6AP derivatives with the linker in position 1, 2 or 3, as depicted in **Figure 2a**. A previous structure-activity study has indeed shown that all other possible positions on 6AP are crucial for its antiprion activity (F. G., N. D., M. B. and H. G., in preparation). Only introduction of the aminocaproylaminopentyloxy

linker in position 3 led to a reasonably active chemical derivative of 6AP (**Figure 2b**), while the two other substitutions led to completely inactive compounds. The modified 6AP was then bound to sepharose beads via its amino group to yield the affinity chromatography matrix depicted in **Figure 2c**. As controls, beads quenched with ethanolamine were prepared. These matrices were then used for affinity chromatography experiments to purify biological targets of 6AP. Crude extracts of budding yeast, porcine brain or Mov (murine neuroglial) cells were prepared and incubated for 30 minutes with 6AP beads or control beads. As additional controls, competitions with an excess of free 6AP or 6APi were realized: the rationale being that targets of the antiprion activity of 6AP should be competed away by 6AP but not by 6APi. After extensive washing, sample buffer was added to the beads and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue or silver staining and Western blotting.

In principle, two modes of action for antiprion drugs can be envisioned: either in *cis* directly on prion protein/aggregates, or in *trans* by interfering with the activity of cellular factor(s) required for prion propagation. In this second possibility, antiprion drugs are not expected to interact directly with the prion proteins whereas the first possibility implies a direct interaction of the compound with the prion proteins either in their normal or prion form. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using antibodies directed against Sup35p (the protein corresponding to the $[PSI^+]$ prion), Ure2p (the protein corresponding to the [URE3] prion) or PrP. Although these three proteins were clearly detectable in cell extracts, they were undetectable on the affinity matrices after chromatography (**Figure 2d**) suggesting that there is no direct interaction between 6AP and these prion forming proteins. This is consistent with the fact that 6AP is active against the three considered prions ($[PSI^+]$, [URE3] and PrP^{Sc}) which do not share any significant sequence similarity. Confirming that there is no direct interaction between prion protein and 6AP, we observed no effect of both 6AP and 6APi on *in vitro* PrP^C to

PrP^{Sc} conversion. This assay was performed using a Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA), a highly sensitive method developed by the group of Claudio Soto (Saborio et al., 2001). Neither 6AP nor 6APi inhibited PrP^C to PrP^{Sc} conversion in this *in vitro* assay (**Figure 2e**), which further argues against a direct action on the prion protein in *cis*. Similarly, we found no significant effect of 6AP on prion amyloid formation rate of purified recombinant Ure2p protein (**Supplementary Figure 1 a and c**). The same result was obtained using a second amyloid forming prion protein, namely the prion forming domain (PFD of the HET-s prion protein of *Podospora anserina* (**Supplementary Figure 1b**) consistent with previous observation using an *in vitro* filter trap assay (Boye-Harnasch and Cullin, 2006). From all these experiments, we conclude that 6AP is not a general inhibitor of prion amyloid formation acting in *cis*. Taken together, these results strongly argue for a 6AP mode of action in *trans* on cellular factors rather than in *cis* directly on the prion proteins.

Next, the proteins bound to 6AP beads were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue (not shown) and silver staining (**Figure 2f**). Specific protein bands (absent from control beads, present on 6AP beads and competed away by free 6AP but not by free 6APi) were excised from the gel for identification by mass spectrometry. All identified bands correspond to ribosomal proteins from both the large and the small ribosomal subunits (**Supplementary Table I**) suggesting that the ribosome or at least ribosome components could be specific targets of 6AP.

GA also specifically interacts with ribosomal components

Guanabenz (GA, molecular structure depicted in **Figure 3a**, left structure), is an orally active central α 2-adrenoceptor agonist already on the market for the treatment of hypertension (Holmes et al., 1983). Very recently we isolated this drug as active against both [*PSI*⁺] and [URE3] yeast

prions (Tribouillard *et al.*, in preparation). We also found GA to be active against mammalian prion, not only *ex vivo* in the MovS-based assay described before (IC₅₀ = 5 μM) but also *in vivo* in a mouse model already described (Le Dur *et al.*, 2005). As for 6AP, we found that GA did not inhibit *in vitro* PrP^C to PrP^{Sc} conversion in the same PMCA assay described above (not shown). Similarly to 6AP, we also found no significant effect of GA on prion amyloid formation rate of both purified recombinant Ure2p protein and the HET-s PFD of *P. Anserina* (**Supplementary Figure 1**). These results indicate that, as 6AP, GA likely acts in *trans* on cellular factors rather than in *cis* on the prion proteins. For this reason and because its molecular structure is clearly unrelated to that of 6AP, we set up an affinity chromatography experiment on immobilized drug similar to the one used with 6AP. First, using results of structure-activity studies performed on the GA family, we synthesized the most appropriate control molecule. GAi (**Figure 3a**, right structure) differs from GA by a single replacement of one chlorine by a fluorine (also an halogen atom, highlighted in blue). This new molecule is totally inactive against yeast and mammalian prions (Tribouillard *et al.*, in preparation). Similarly to the approach undertaken for 6AP, we added an aminocaproylaminopentyloxy group as a spacer in position 4 on GA and observed that this modification did not alter the antiprion activity of GA (**Figure 3b**). GA sepharose beads were subsequently synthesized (as depicted in **Figure 3c**) and used for affinity chromatography experiments to purify biological targets of GA. As with 6AP beads, crude extracts of budding yeast, porcine brain or MovS cells were prepared and incubated for 30 minutes with GA beads or control beads. As additional controls, competitions with an excess of free GA or GAi were performed. After extensive washing, sample buffer was added to the beads and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue (not shown) and silver staining. Specific protein bands (absent from control beads, present on GA beads and competed

away by free GA but not by free GAi) were excised from the gel for identification by mass spectrometry. The results are shown in **Figure 3d**. The identified bands also correspond to ribosomal proteins, again from both large and small subunits of the ribosome suggesting that the ribosome itself or ribosomal components constitute specific targets of GA. Thus, 6AP and GA, two chemically unrelated antiprion drugs isolated from two independent chemical libraries appear to share the same cellular targets, namely components of the ribosome.

6AP and GA compete each other for interaction with ribosomal components

We next tested whether 6AP and GA share the same interaction site(s) on ribosomal constituents by determining the respective ability of each compound to compete for the binding of ribosomal proteins to the other compound. As shown in **Figure 4a**, GA (but not GAi) is able to compete for the binding of ribosomal proteins to 6AP beads. Conversely, 6AP (but not 6APi) is able to compete for the binding of ribosomal proteins to GA beads (**Figure 4b**). Taken together, these results suggest that 6AP and GA share common (or at least partially overlapping) binding site(s) on ribosomal components.

RNA-dependent interaction of ribosomal components with 6AP and GA

Next we wondered whether the various identified ribosomal proteins could be retained as a result of interaction of the drugs with ribosomal RNA. We thus determined whether the interaction of 6AP and GA with ribosomal proteins could be dependent on RNA. We found that an RNase A treatment of yeast crude extracts before affinity chromatography purification resulted in complete suppression of the binding of the ribosomal proteins to both 6AP (**Figure 4a**) and GA beads (**Figure 4b**). Same results were obtained using extract from porcine brain or MovS cells (data not shown). We conclude that binding of ribosomal proteins to 6AP and GA is

RNA-dependent. Next the ability of RNA to directly interact with 6AP and GA was assessed by repeating affinity chromatography experiments using yeast total RNA preparations. Specific binding of RNA to both affinity matrices was observed (**Figure 4c** and **d**). Taken together, these results show that binding of ribosomal proteins to both 6AP and GA is RNA-dependent and is probably mediated by a direct interaction between each of the two antiprion drugs and the rRNA. These results readily explain why a large number of distinct ribosomal proteins are retained during the affinity chromatography.

6AP and GA have no effect on protein synthesis both *in vivo* and *in vitro*

Because the main function of the ribosome is protein synthesis, the effect of 6AP and GA on translation was assessed both *in vitro* and *in vivo*. Exponentially growing [*PSI*⁺] yeast cells were treated with various compounds as indicated, at a final concentration of 100 μ M (a concentration known to have an antiprion effect in yeast without any significant effect on the growth rate). Radiolabelled [³⁵S] methionine was then added for 10 minutes and cells harvested. Extracts were prepared and analyzed by SDS-PAGE (**Figure 5a**) or 2D-gel electrophoresis (**Figure 5b**) followed by autoradiography. None of the tested compounds exhibited a significant effect (inhibition or activation) on global protein synthesis. In addition, 6AP and GA had no significant specific effect on Sup35p, PrP or Ure2p protein level ((Bach et al., 2003) and data not shown). In sharp contrast, cycloheximide (CHX), a known inhibitor of global translation (Kerridge, 1958), completely inhibited protein synthesis at this concentration. The effect of 6AP and GA was also tested in an *in vitro* translation system, namely the rabbit reticulocyte lysate system. The efficiency of translation of a control mRNA encoding for the EF1 α translation factor was evaluated in presence of 200 μ M of the indicated compounds (**Figure 5c**). Again, only CHX had

a significant inhibitory effect on EF1 α mRNA translation. This result confirms the *in vivo* data and allows us to conclude that none of the tested antiprion drugs, including 6AP and GA, has a significant effect (positive or negative) on global protein synthesis in the tested systems.

6AP and GA strongly and specifically inhibit the rRNA-mediated protein folding activity of the ribosome

In addition to its role in protein synthesis, ribosome was also found to have the capacity to assist protein folding. This ability has been demonstrated *in vitro* using many different enzymes as substrates and bacterial as well as eukaryotic ribosomes (Argent et al., 2000; Chattopadhyay et al., 1994; Chattopadhyay et al., 1996; Das et al., 1996; Das Gupta, 1999; Kudlicki et al., 1997; Singh and Rao Ch, 2002) and is supported by *in vivo* data in *E. coli* (Chattopadhyay et al., 1999). In all cases studied so far, this protein folding (or “assisted folding”) activity of ribosome was showed to be mainly due to the domain V of its largest rRNA (23S rRNA in *E. coli*) of its large subunit (50S in *E. coli*). Interestingly, this large rRNA, and particularly its domain V, also bears peptidyl transferase activity (Nissen et al., 2000). Since 6AP and GA, which bind to rRNA, exhibit no inhibitory effect on protein synthesis, we wondered if they might have any effect on the protein folding activity of the ribosome. Human Carbonic Anhydrase (hCA) was used as a substrate for *in vitro* assisted folding experiments (**Figure 6**). The hCA protein was denatured in presence of guanidium hydrochloride and EDTA. For refolding experiments, hCA was diluted 100 times in native buffer either alone (to determine self folding efficiency) or with highly active preparations of *E. coli* ribosomes (final concentration: 100 nM), or the large subunit (50S, final concentration: 100 nM), or rRNA purified from the 50S subunit (23S rRNA and 5.8S rRNA, at a final concentration of 100 nM), or the *in vitro* transcribed 660 nucleotides long domain V from *B. subtilis* (final concentration: 150 nM) (see experimental scheme in **Figure 6a** and results in

Figure 6b left panel). The correct refolding of hCA was assessed by following the reappearance of its enzymatic activity. Self folding restored about 20% of hCA activity. *E. coli* ribosomes or the 50S alone restored about 70% of hCA activity, the 23S rRNA about 45% and the *in vitro* transcribed domain V about 35%. The different extent of the assisted folding achieved by the different ribosomal folding modulators depends very much on the structural integrity of the rRNA, which is probably better in 70S and 50S than in the phenol extracted 23S rRNA and in the *in vitro* transcribed domain V. Neither heparin nor tRNA (at concentration ranging from 2.33 μM to 70 μM) were able to assist refolding of hCA, further showing that the protein folding activity of the large rRNA of the large subunit of the ribosome is specific and cannot be undertaken by other negatively charged polymer (**Figure 6c** left panels). The same result was obtained using BSA (right panel). Interestingly, 6AP and GA dramatically inhibited ribosome, 50S, 23S rRNA and domain V assisted folding to the level of self folding (about 20%). This effect was specific as neither 6APi nor GAI showed any effect at the same concentration (1 mM). Thus the potency of the four tested compounds (6AP, 6APi, GA and GAI) in inhibiting the assisted folding activity of the ribosome parallels their activity as antiprion drugs. The same results were obtained using preparation of *S. cerevisiae* ribosomes (**Figure 6b** right panel) or other enzymes (human Malate Dehydrogenase and bovine Carbonic Anhydrase, data not shown) as substrates suggesting that the ability of 6AP and GA to inhibit the protein folding activity of the ribosome is a general feature not restricted to bacterial ribosomes.

We wanted to check whether the tested compounds also inhibit the peptidyl transferase activity of the ribosome under the same experimental conditions (same preparation of *E. coli* ribosomes, same drug and ribosome concentration). As shown in **Figure 6d**, formation of dipeptide, a classical assay for peptidyl transferase activity (Antoun et al., 2006), was not significantly

affected by any of the four compounds. The same result was obtained in another type of experiment where the ability of ribosomes to recycle (thus giving a global view on translation efficiency) was assessed (data not shown). In a second serie of experiments, we made chemical foot-printing experiments on *in vitro* transcribed domain V of *B. subtilis* 23S rRNA as well as on two other completely unrelated RNAs, namely tRNA^{Ser} and RNase P RNA. The results are presented in **Supplementary Figure 2**: none of the drugs (6AP and GA) or their inactive analogues (6APi and GAi) were able to protect any region of tRNA^{Ser} and RNase P RNA. In contrast, foot-printing experiments on domain V of 23S rRNA showed specific and common protection sites with both 6AP and GA but not with their inactive analogues. Taken together these results indicate that 6AP and GA specifically bind to the large rRNA and inhibit the protein chaperone activity of the ribosome *in vitro* without affecting its protein synthesis function.

The antiprion activity of Chlorpromazine and 6AP and GA rely on distinct mechanisms

Chlorpromazine (CPZ, molecular structure depicted in **Figure 7d**), an antipsychotic drug (Delay et al., 1952), was shown to be active against mammalian prion in N2a cell-based assays (Korth et al., 2001) and later against yeast prions (Bach et al., 2003). As chemical structure of CPZ is quite similar to that of 6AP, ability of CPZ to compete ribosomal components' binding to 6AP (and GA) beads was determined. Like GAi and 6APi, CPZ does not compete for the binding of ribosome components to both GA and 6AP affinity matrices (**Figure 7a**). These results suggest that CPZ does not interact directly with ribosomes (or interacts to a distinct part of the ribosome). Similarly, CPZ (at 1 mM final concentration as for experiments with 6AP or GA) was found to be unable to inhibit assisted refolding of hCA by the ribosome (**Figure 7b**). These results indicate

that ribosome binding and inhibition of ribosome-assisted refolding, are properties specific to 6AP and GA and that CPZ probably exerts its antiprion activity by a distinct mechanism.

In yeast, it has been shown that CPZ induces a down regulation of ribosome biogenesis (Li et al., 2000). CPZ triggers a membrane stress (Kamada et al., 1995) that leads to attenuation of ribosome synthesis via a Pkc1p-dependent pathway. In response to an increase in internal turgor pressure, yeast cells down-regulate ribosome biogenesis and activity in order to avoid continuous protein synthesis in conditions where cells are fragilized and might thus explode (Deloche et al., 2004). **Figure 7c** shows a schematic representation of this pathway (adapted from (Li et al., 2000)). To test the simple idea that antiprion effect of CPZ could, at least in yeast, involve the Pkc1p pathway, we determined the effect of partial or total inactivation of the *PKC1* gene (which is not essential in yeast) on the CPZ antiprion effect. As shown in **Figure 7d** upper right panel, deletion of the *PKC1* gene totally abolishes the antiprion activity of CPZ. In contrast, deletion of the *PKC1* gene has no effect on the toxicity induced by CPZ as the halo of non growing cell has the same diameter as that obtained for isogenic *Wild-Type* (*WT*) strain (upper left panel). We also partially inactivated the *PKC1* gene by replacing its endogenous promoter by the galactose-inducible promoter of *GAL1,10* genes and by growing cells on glucose medium (where expression from the *GAL1,10* promoter is largely repressed). Under this condition, we observed a clear diminution of the size of the red halo, indicating a reduced antiprion effect of CPZ (lower right panel compared to lower left panel). *PCK1* partial or total inactivation did not abolish the antiprion effect of 6AP or GA (data not shown). These results indicate that in yeast the antiprion activity of CPZ (but not 6AP and GA) depends on the Pkc1p-dependent pathway. It follows that other drugs that create a membrane stress and activate this Pkc1p pathway could be expected to display antiprion activity. This Pkc1p-dependent pathway can also be activated with Brefeldin A (BFA, molecular structure depicted in **Figure 7e**), a classical inhibitor of the

vesicular transport, active from yeast to human (reviewed in (Jackson and Casanova, 2000)). We indeed observed a modest but significant antiprion effect of BFA on $[PSI^+]$ (Figure 7e).

Taken together our results suggest that at least in yeast the antiprion effect of CPZ and 6AP/GA are based on different mechanisms. The Pkc1-dependent antiprion activity of CPZ appears to be related to its ability to create a membrane stress leading to down regulation of ribosome biogenesis. Interestingly, while the antiprion activity of CPZ and 6AP/GA seems to rely on distinct mechanisms both could ultimately involve modulation of ribosome activity.

DISCUSSION

We show here that the ribosome is a common intracellular target of 6AP and GA, two chemically unrelated antiprion drugs active from yeast to mammals. Ribosomal components were shown to interact specifically and in an RNA-dependant manner with both 6AP and GA. Control experiments using 6APi and GAi, two molecules chemically very close to 6AP and GA, but totally devoid of antiprion activity, show the specificity of 6AP and GA's interaction with the ribosome. Our results are best explained by postulating that in the affinity chromatography experiments immobilized drugs retain the entire ribosome. Importantly, interactions of 6AP or GA with the ribosome do not affect ribosomal functions in protein synthesis but result in a strong and specific inhibition of the ribosomal protein folding activity.

6AP and GA represent the first compounds to inhibit selectively (i.e. without any significant effect on protein synthesis and translation) the protein folding activity of the ribosome. Indeed, a number of antibiotics like chloramphenicol, lincomycin and erythromycin, which are known to bind the central large loop of domain V of 23S rRNA, inhibit the 23S rRNA/domain V-mediated protein folding activity but they also strongly affect protein synthesis

(thereby providing their antibacterial activity) (Das Gupta, 1999). In contrast, antibiotics like streptomycin or kasugamycin which bind to the 30S subunit of the ribosome and also block protein synthesis have no effect on the protein folding activity of the ribosome which is due to its 50S subunit. Therefore, as the first molecules specifically inhibiting the protein folding activity of the ribosome, 6AP and GA confirm that this activity is independent (or at least uncoupled) from its function in protein synthesis. In addition these compounds constitute precious tools to study the yet largely unexplored biological role and significance of the protein folding activity of the ribosome *in vivo*.

At present, it cannot be totally excluded that, in addition to ribosome-assisted protein folding, 6AP and GA target other cellular processes that could account for their antiprion effect. However we detected no direct interaction of 6AP and GA with prion proteins and all proteins identified in our affinity purifications are ribosome-associated. Importantly, we do observe a strict correlation for the different drug derivatives between the antiprion activity and inhibitory effect on ribosome-assisted folding. Thus, while at present we have no direct proof of a causal link between inhibition of ribosome-assisted folding and prion destabilization, our results strongly suggests that we have identified not only a physical target but indeed the functional target of these antiprion drugs. We therefore propose that ribosome-assisted protein folding is involved in prion maintenance both in yeast and mammals. This chaperone activity of the ribosome would constitute a novel and general mechanism in the control of prion maintenance.

What could be the mechanistic implication of protein folding activity of the ribosome in prion propagation? A first possibility is that this function of the largest rRNA is critical to allow the prion proteins to reach a folding state competent for prion formation. Of note in this context, is the fact that RNA molecules strongly increase PrP transconformation *in vitro* (Caughey and Kocisko, 2003; Deleault et al., 2003). Total hamster brain RNA fractionation experiments

showed that RNA molecules of more than 300 nucleotides (that co-purify with rRNA) retain this amplification ability whereas smaller RNA do not. In addition, the putative function of the largest rRNA in prion formation/propagation provides mechanistic support for previously unexplained observations showing in yeast the ability of 3 μ m plasmid (encoding rRNA) to induce the $[psi^-]$ to $[PSI^+]$ conversion when introduced into a $[psi^-]$ strain (Dai et al., 1986). Interestingly also, the bacterial ribosome is able to prevent the inducible aggregation of insulin B chain, α -lactalbumin or γ -crystallin *in vitro* (Singh and Rao Ch, 2002). Thus, a second possibility is that the chaperone activity of the ribosome is able to limit assembly of the prion protein aggregates thus favoring maintenance of a high numbers of prion seeds. This activity would be somewhat reminiscent of the role for Hsp104p in yeast, a member of the AAA+ protein chaperone family not found in metazoans. Hsp104p is essential for propagation of prions in yeast by ensuring the shearing of prion aggregates, thereby increasing the number of prion seeds (Chernoff et al., 1995; Shorter and Lindquist, 2006). A third possibility is that inhibition of ribosome-assisted protein folding impedes prion maintenance in an indirect manner, for instance, if a co-factor required for prion replication relies on the ribosome-assisted chaperone activity for proper folding or if inhibition of this ribosomal activity causes a general accumulation of misfolded polypeptides leading to a cellular stress response that affects prion maintenance. This last possibility comes to mind in particular because hypotheses that imply a direct interaction between the ribosome and the prion protein are not fully satisfactory in the case of the mammalian prion since the ribosome and PrP aggregates occupy different cellular compartments (for a review see (Campana et al., 2005)). However, it has been shown that conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation can occur in the cytoplasm (Ma and Lindquist, 2002). So the possibility of a direct involvement

of the ribosome in the conversion process remains a viable hypothesis. Yeast is certainly the simplest and most convenient model to discriminate between these different possibilities.

Collectively, our data lead to a model in which down-regulation of protein folding activity of the ribosome would destabilize prions. 6AP and GA are able to specifically and directly interact with ribosome and inhibit its function in protein folding. CPZ, an antiprion drug isolated as active against mammalian prion also interferes with the ribosome function (Deloche et al., 2004). We propose that CPZ acts indirectly on ribosome by creating a membrane stress that, via a Pkc1p-dependent pathway, leads to down-regulation of ribosome biogenesis. This down-regulation could also affect protein folding activity of the ribosome and cause an antiprion effect.

Since ribosome structure and function are largely conserved throughout evolution, our results readily explain the universality of the antiprion effect of 6AP and GA which are active both in yeast and mammals (and potentially also the universality of CPZ). Because of the similarities between prion disease and other protein misfolding diseases, the finding that the 6AP and GA antiprion drugs target the chaperone activity of the ribosome might also be relevant for these other diseases. For this reason, 6AP and GA could have wide applications not restricted to prion diseases.

METHODS

Yeast strains, yeast-based antiprion assay and genetic manipulations.

Yeast strains used in this study were as follows. 74-D694: *Mata*, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3Δ200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*, [*PSI*⁺] (Chernoff et al., 1995), Strg6: *Mata*, *erg6::TRP1*, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3Δ200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*, [*PSI*⁺] and SB34: *Mata*, *erg6::TRP1*, *dal5::ADE2*, *ade2-1*, *trp1-*

1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS, [URE3] (Bach et al., 2003) and were grown and used as described (Bach et al., 2006b). *yDT94: Mata₂, ade1-14, trp1-289, his3 Δ 200, ura3-52, leu2-3,112, pkc1::KanMX, [PSI⁺]* was constructed by replacing the ORF of the *PKC1* gene by the KanMX cassette as already described (Longtine et al., 1998). The PCR product was designed to replace the entire coding region of the *PKC1* gene. *yDT90: Mata₂, ade1-14, trp1-289, his3 Δ 200, ura3-52, leu2-3,112, pGAL1,10::KanMX::pPKC1, [PSI⁺]* was constructed by replacing the promoter of the *PKC1* gene by that of the *GAL1,10* gene as already described (Longtine et al., 1998). Details concerning the primers used to amplify the deletion cassette or to check the strains will be provided upon request.

PrP^{Sc} inhibition assay in MovS cells.

Scrapie (127S strain)-infected neuroglial cells (MovS (Archer et al., 2004)) were treated for 8 days at 37°C, 5% CO₂ with 0 to 20 μ M of the indicated drugs or, as controls by the corresponding volume of DMSO. Cells extracts were then digested with proteinase K and analyzed by Western blotting using antibody 4F2 (dilution 1/5000) directed against PrP protein (Krasemann et al., 1996). Quantification of remaining PrP (PrP^{res}) compared to controls was done using the Vilber-Lourmat Photodocumentation Chemistart 5000 imager.

Preparation of 6AP- and GA- resins.

The preparation of the conjugates of 6AP and GA, depicted respectively in **Figures 2** and **3** will be published elsewhere (Gug *et al.*, submitted). The conjugates were coupled in 0.2 M NaHCO₃, 0.2 M NaCl, pH 8.5 on Fast flow CNBr Activated Sepharose 4B® supplied by Amersham. The

final calculated concentration was 5-25 $\mu\text{mol/ml}$ of resin. The remaining active group were blocked in pH 8.0 buffer containing 1 M ethanolamine.

Preparation of cell extracts and affinity chromatography on immobilized drugs.

The homogenization buffer for yeast cell extracts was 25 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.2% Triton X100 and 1 mM PMSF. The homogenization buffer for porcine brain extracts was 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS (pH 7.2), 15 mM EGTA, 15 mM MgCl_2 , 1 mM sodium vanadate, 1 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenyl phosphate, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ of soybean trypsin inhibitor and 100 μM benzamidine. The homogenization buffer for Mov cell extracts was 50 mM Tris (pH 7.4), 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% Triton X100. At the end of the preparation procedure, yeast RNA extracts were resuspended in water treated by Di Ethyl Pyro Carbonate (DEPC).

Yeast protein extracts were obtained from a culture growing at 30°C ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$). Cell pellets were resuspended in homogenization buffer (300 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ of culture) and lysed using acid washed glass beads (purchased from Sigma, 300 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ of culture). Homogenates were vortexed for 30 sec followed by 30 sec ice-cooling (six times) and then centrifuged for 3 min at 3,000 rpm at 4°C. Supernatants were recovered, assayed for protein content (using Bio-Rad protein assay) and immediately loaded batchwise on the affinity matrix.

Porcine brain extracts were obtained from a local slaughterhouse (Louis Gad SA) and directly homogenized and processed for affinity chromatography or stored at -80°C prior to use. Tissues were weighed, homogenized and sonicated in homogenization buffer (2 ml/g of material). Homogenates were centrifuged for 10 min at 14,000 X *g* at 4°C. The supernatants were

recovered, assayed for protein content (using Bio-Rad protein assay) and immediately loaded batchwise on the affinity matrix.

MovS cell extracts were obtained from a culture grown at 37°C, 5% CO₂, washed with PBS 1X and homogenized in homogenization buffer (1 ml for a 25 cm² culture flask). Homogenates were incubated for 10 min at 4°C and centrifuged for 1 min at 2,000 rpm at 4°C. The supernatants were recovered, assayed for protein content (Micro BCA, Pierce) and immediately loaded batchwise on the affinity matrix.

Yeast RNA were prepared from an exponentially growing yeast culture (OD_{600 nm} = 1), cells were harvested, immediately frozen at -80°C and homogenized in AE buffer (50 mM sodium acetate (pH 5.3), 10 mM EDTA, 450 µl/20 ml of culture) and SDS 10% (50 µl/20 ml of culture). 1 volume (500 µl/20 ml of culture) of phenol balanced in AE buffer was added. Homogenates were vortexed for 2 min, heated at 65°C for 4 min, frozen in dry ice and finally centrifuged for 4 min at 14,000 X rpm at room temperature after thawing. The supernatant was recovered and added to one volume of PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol) and then vortexed. After centrifugation, the supernatant was recovered and RNA were precipitated by adding 1/10 of volume of 3 M sodium acetate (pH 5.3) and 2.5 volumes of ethanol and incubating for at least 30 min at -80°C. Homogenates were centrifuged for 30 min at 4°C, the pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in DEPC-treated water. RNA concentration was determined and RNA preparation immediately loaded batchwise on the affinity matrix.

Just before use, 6AP and GA beads were washed with 1 ml of bead buffer (50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM NaF, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40, 10 µg/ml of leupeptin, aprotinin, and soybean trypsin inhibitor, and 100 µM benzamidine) and diluted 4 times in this buffer. Protein extracts: 200 µg of yeast protein extract, or 2 mg of porcine brain or MovS

cell protein extract were added to 40 μ l of diluted beads (10 μ l of packed beads). The volume was adjusted to 600 μ l by adding bead buffer, the tubes were rotated at 4°C for 30 min. Competitions with free active or inactive drugs were performed with free compounds (or the corresponding volume of DMSO) at a final concentration of 1 mM incubated with cell extracts for 3 min before the mixture was added to the affinity matrix. Then, bead buffer containing the same quantity (1 mM) of free drugs was immediately added (as described previously) to reach a final volume of 600 μ l. After a brief spin at 10,000 X g at 4°C and removal of the supernatant, the beads were washed 4 times with bead buffer before addition of 35 μ l of 2X Laemmli sample buffer. Following heat denaturation for 3 min at 95°C, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting or silver staining as described below.

For RNA extracts, the same protocol was used except that all solutions and beads were treated with 1U/ μ l Rnasin Plus RNase Inhibitor (Promega) and that 5 μ g of purified RNA were added on immobilized drugs. Bound RNA was analyzed by urea-denaturing gel electrophoresis followed by a BET staining of the gel.

RNase treatments were performed by adding RNase A at a final concentration of 100 μ g/ml in the various cell extracts which were then incubated for 20 min at room temperature before being added to affinity chromatography matrix.

Electrophoresis, Silver staining, Western blots and antibodies.

Following heat denaturation for 3 min at 95°C, the proteins bound to 6AP or GA matrices were separated by 10% SDS-PAGE (precast NuPAGE -Invitrogen- 1 mm thick gel) followed by immunoblotting analysis or silver staining using an Amersham SDS-PAGE silver staining kit. For immunoblotting, proteins were transferred to 0.45 μ m nitrocellulose filters (Schleicher and

Schuell). These were blocked with 5% skimmed milk in Tris-buffered saline/Tween 20, incubated for 1H with the indicated antibodies, and analyzed by Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham) using a Vilber-Lourmat Photodocumentation Chemistart 5000 imager.

Antibody anti-PrP used: 4F2 (dilution 1/5000) (Krasemann et al., 1996). Antibody anti-Sup35p used: rabbit polyclonal raised against peptide 55-68 of Sup35p, a kind gift of S. L. Lindquist, dilution 1/1000. Antibody anti-Ure2p used: rabbit polyclonal anti-Ure2p, a kind gift of L. Maillet, dilution 1/5000.

PMCA assays.

All tested compounds were resuspended in DMSO to make 12.5 mM stock solutions and stored at -20°C prior to use. Working solutions were prepared by serially diluting the stock solution into water.

To make normal mouse brain homogenate, two frozen mouse brains (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN) were Potter homogenized in 10 ml of ice-cold PBS (phosphate-buffered saline without calcium or magnesium) containing Complete protease inhibitors (Roche, Indianapolis, IN). The homogenate was centrifuged at 200 x g for 30 sec, and the post-nuclear supernatant was collected.

Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) reactions consisted of 50 µl 10% normal mouse brain homogenate, 40 µl RML scrapie brain homogenate (diluted 1/200 into PBS, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA), and 10 µl tested compounds or control buffer (8% DMSO in water). Intermittent sonication was performed in 0.5 ml thin-walled PCR tubes using a Misonix 3000MPD device, using a variation of the semi-automated procedure originally described (Castilla et al., 2005). The sonicator output setting was 6.0, and a 30 sec pulse was delivered

every 30 min for 24H. The sonicator horn was filled with 350 ml water, which was maintained at 41°C.

Following PMCA reactions, all samples were treated with 25 µg/ml proteinase K for 1H at 37°C, subjected to SDS-PAGE, and transferred onto a PVDF membrane which were subsequently probed with monoclonal antibody 6D11 (Signet, Dedham, MA) at 1/15000 dilution in TBST.

MALDI-TOF Peptide Mapping Protein Identification.

The protein bands were excised from a one-dimensional SDS-PAGE gel stained by Coomassie blue and digested in gel with trypsin as described previously (Shevchenko et al., 1996). MALDI analysis and interpretation were realized by Innova Proteomics (Rennes, France).

Translation assays.

The dipeptide formation assay was designed following (Antoun et al., 2006), in a cell-free bacterial translation system made up of highly purified components from *E. coli* (Pavlov and Ehrenberg, 1996). An initiation complex (IC) containing *E. coli* 70S ribosome, [³H]f-Met tRNA^{f-Met}, an mRNA coding for fMet-Leu-Ile-stop, and all three bacterial initiation factors was prepared, with or without the indicated drugs (6AP, 6APi, GA or GAi) at a final concentration of 1 mM. In parallel, a ternary complex (TC) containing Leucine, tRNA^{Leu}, Leu-tRNA synthetase, EF-Tu, EF-Ts and GTP was prepared. The reaction was initiated by rapid mixing of the IC and TC in a quench-flow instrument. The reaction was quenched at different time-points by addition of formic acid, then the amount of [³H]f-Met-Leu dipeptide was quantified in HPLC equipped with an on-line radio detector (Pavlov et al., 1997). *In vitro* translation assay based on the rabbit reticulocyte lysate (Ambion kit) was used according to the instruction of the manufacturer.

Translation of the control capped mRNA (encoding for EF1 α from *Xenopus laevis*) provided in the kit was evaluated in presence of the various compounds all at a final concentration of 200 μ M. Autoradiography and quantification were made using a Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics).

A first *in vivo* translation assay was performed using a yeast culture grown at 30°C in YPD ($OD_{600\text{ nm}}=0.6$ in exponential phase of growth) incubated with the indicated molecules (100 μ M) or the corresponding volume of DMSO (compound vehicle) for 10 min at 30°C at which time [35 S] methionine was added for 10 min. Crude yeast extracts were then realized as described previously and analyzed by SDS-PAGE. The gel was dried and analyzed using a Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics). A second *in vivo* translation assay was performed as previously described (Vido et al., 2001) and analyzed by two dimensional SDS-PAGE.

***In vitro* ribosome assisted folding assays.**

E. coli ribosome, *S. cerevisiae* ribosome and 50S subunit were prepared using sucrose gradient zonal ultracentrifugation as described previously (Rodnina and Wintermeyer, 1995). 23S rRNA was isolated from 50S subunit by 8 successive phenol-chloroform (1:1) extractions. The aqueous phase containing rRNA was precipitated by addition of 2 volumes ethanol and 0.1 volume of 5 M sodium acetate pH 5.2. As the 23S rRNA from different bacterial species has identical secondary structure, especially in the central loop of the domain V, we have chosen to transcribe *in vitro* the 660 nt long domain V of 23S rRNA, due to the availability of the respective clone in plasmid pDK105 (Kovalic et al., 1995). The plasmid was linearised using *Eco*RI and the run off RNA was then transcribed from the SP6 promoter using SP6 RNA polymerase (GE Healthcare). The DNA template was digested with RNase-free Dnase I and RNA was precipitated with ethanol after

phenol-chloroform extraction. Further the RNA concentration was evaluated using Nanodrop spectrophotometer. The bulk tRNA was purified as described (Lee and Marshall, 1986). Heparin was purchased from Lovens Kemiske Fabrik (Denmark) and BSA from Promega.

For the *in vitro* refolding experiments, human Carbonic Anhydrase (hCA) at a concentration of 20 μ M was denaturated using guanidium hydrochloride 6 M and EDTA 30 nM for 1 min at 23°C. To allow refolding, hCA was then diluted 100 times (final concentration 200 nM) in a buffer containing 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl and 5 mM magnesium acetate for 30 min with or without the folding modulators and/or the drugs (all at 1 mM final concentration). The refolding of hCA, as a function of its activity, was followed by the colorimetric assay measuring the increase of A_{400} with time when the substrate of hCA, para-nitrophenyl acetate (pNPA), was added at a final concentration of 500 μ M directly to the refolding mix.

ACKNOWLEDGMENTS

Most of this work was carried out in the laboratory of Laurent Meijer (CNRS Roscoff) who is warmly acknowledged for his continuing support, friendship and helpful discussions. We are also indebted to Jean Labarre (CEA Saclay) for his precious help with the 2D-gel electrophoresis and to Bénédicte Couлары-Salin for EM. Thanks are also due to Laurent Meijer, Elodie Couplan, Carl Mann, Patrick Zarzov and Laurent Maillet for critical proofreading of the manuscript and for helpful suggestions. This work was supported by the following grants: GIS “Infections à prion”, ACI “Jeune Chercheur” from the french government, “CRITT Santé Bretagne” to MB, “Ministère de la Recherche” and FRM grants (to D. T.), “Ingénieur de valorisation” fellowship from the CNRS and ANR “blanche” from the french government to MB, SJS, HG and DV,

Swedish Research Council (VR) grant and Göran Gustafsson grant to SS. SDR was supported by an EMBO postdoctoral fellowship.

REFERENCES

- Antoun, A., Pavlov, M. Y., Lovmar, M., and Ehrenberg, M. (2006). How initiation factors tune the rate of initiation of protein synthesis in bacteria. *EMBO J* 25, 2539-2550.
- Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2004). Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol* 78, 482-490.
- Argent, R. H., Parrott, A. M., Day, P. J., Roberts, L. M., Stockley, P. G., Lord, J. M., and Radford, S. E. (2000). Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *J Biol Chem* 275, 9263-9269.
- Bach, S., Blondel, M., and Meijer, L. (2006a). Evaluation of CDK Inhibitor selectivity: from affinity chromatography to yeast genetics. CRC press chapter 5 *in press*.
- Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J. M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C., and Blondel, M. (2003). Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21, 1075-1081.
- Bach, S., Tribouillard, D., Talarek, N., Desban, N., Gug, F., Galons, H., and Blondel, M. (2006b). A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* 39, 72-77.
- Benkemoun, L., and Saupe, S. J. (2006). Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet Biol*.
- Boye-Harnasch, M., and Cullin, C. (2006). A novel in vitro filter trap assay identifies tannic acid as an amyloid aggregation inducer for HET-s. *J Biotechnol* 125, 222-230.
- Brachmann, A., Baxa, U., and Wickner, R. B. (2005). Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. *EMBO J* 24, 3082-3092.
- Brachmann, A., Toombs, J. A., and Ross, E. D. (2006). Reporter assay systems for [URE3] detection and analysis. *Methods* 39, 35-42.
- Campana, V., Sarnataro, D., and Zurzolo, C. (2005). The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* 15, 102-111.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121, 195-206.
- Caughey, B., and Kocisko, D. A. (2003). Prion diseases: a nucleic-acid accomplice? *Nature* 425, 673-674.
- Chattopadhyay, S., Das, B., Bera, A. K., Dasgupta, D., and Dasgupta, C. (1994). Refolding of denatured lactate dehydrogenase by Escherichia coli ribosomes. *Biochem J* 300 (Pt 3), 717-721.
- Chattopadhyay, S., Das, B., and Dasgupta, C. (1996). Reactivation of denatured proteins by 23S ribosomal RNA: role of domain V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8284-8287.
- Chattopadhyay, S., Pal, S., Pal, D., Sarkar, D., Chandra, S., and Das Gupta, C. (1999). Protein folding in Escherichia coli: role of 23S ribosomal RNA. *Biochim Biophys Acta* 1429, 293-298.

- Chernoff, Y. O., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S. G., and Liebman, S. W. (1995). Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺]. *Science* 268, 880-884.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., and Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* 264, 530-531.
- Dai, H., Tsay, S. H., Lund, P. M., and Cox, B. S. (1986). Transformation of *psi*⁻ *Saccharomyces cerevisiae* to *psi*⁺ with DNA co-purified with 3 micron circles. *Curr Genet* 11, 79-82.
- Das, B., Chattopadhyay, S., Bera, A. K., and Dasgupta, C. (1996). In vitro protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA. *Eur J Biochem* 235, 613-621.
- Das Gupta, C. (1999). Are synthesis and folding of proteins overlapping functions of the ribosomal RNA? *Current Science* 77, 568-573.
- Delay, J., Deniker, P., and Harl, J. M. (1952). [Therapeutic method derived from hiberno-therapy in excitation and agitation states.]. *Ann Med Psychol (Paris)* 110, 267-273.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W., and Supattapone, S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425, 717-720.
- Deloche, O., de la Cruz, J., Kressler, D., Doere, M., and Linder, P. (2004). A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 13, 357-366.
- Doh-Ura, K., Iwaki, T., and Caughey, B. (2000). Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 74, 4894-4897.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8342-8347.
- Holmes, B., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M., and Avery, G. S. (1983). Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs* 26, 212-229.
- Jackson, C. L., and Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* 10, 60-67.
- Jones, G. W., and Tuite, M. F. (2005). Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays* 27, 823-832.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., and Levin, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9, 1559-1571.
- Kerridge, D. (1958). The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Gen Microbiol* 19, 497-506.
- King, C. Y., and Diaz-Avalos, R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428, 319-323.
- Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9836-9841.
- Kovalic, D., Giannattasio, R. B., and Weisblum, B. (1995). Methylation of minimalist 23S rRNA sequences in vitro by ErmSF (TrA) N-methyltransferase. *Biochemistry* 34, 15838-15844.
- Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G., and Bodemer, W. (1996). Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice. *Mol Med* 2, 725-734.
- Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G., and Hardesty, B. (1997). Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins. *Fold Des* 2, 101-108.

- Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L., and Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 16031-16036.
- Lee, K. M., and Marshall, A. G. (1986). High-speed preparative-scale separation and purification of ribosomal 5S and 5.8S RNA's via Sephacryl S-300 gel filtration chromatography. *Prep Biochem* *16*, 247-258.
- Li, Y., Moir, R. D., Sethy-Coraci, I. K., Warner, J. R., and Willis, I. M. (2000). Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol Cell Biol* *20*, 3843-3851.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953-961.
- Ma, J., and Lindquist, S. (2002). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science* *298*, 1785-1788.
- Maddelein, M. L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Coulary-Salin, B., and Saupe, S. J. (2002). Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 7402-7407.
- Nishida, N., Harris, D. A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavel, O., and Lehmann, S. (2000). Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* *74*, 320-325.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* *289*, 920-930.
- Pavlov, M. Y., and Ehrenberg, M. (1996). Rate of translation of natural mRNAs in an optimized in vitro system. *Arch Biochem Biophys* *328*, 9-16.
- Pavlov, M. Y., Freistoffer, D. V., Heurgue-Hamard, V., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 abolishes competition between release factor RF1 and ribosome recycling factor (RRF) for a ribosome binding site. *J Mol Biol* *273*, 389-401.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13363-13383.
- Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (1995). GTP consumption of elongation factor Tu during translation of heteropolymeric mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 1945-1949.
- Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* *411*, 810-813.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* *68*, 850-858.
- Shorter, J., and Lindquist, S. (2006). Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. *Mol Cell* *23*, 425-438.
- Singh, R., and Rao Ch, M. (2002). Chaperone-like activity and surface hydrophobicity of 70S ribosome. *FEBS Lett* *527*, 234-238.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J. S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* *428*, 323-328.
- Trevitt, C. R., and Collinge, J. (2006). A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* *129*, 2241-2265.
- Tribouillard, D., Bach, S., Gug, F., Desban, N., Beringue, V., Andrieu, T., Dormont, D., Galons, H., Laude, H., Vilette, D., and Blondel, M. (2006). Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnol J* *1*, 58-67.

- Tuite, M. F., and Koloteva-Levin, N. (2004). Propagating prions in fungi and mammals. *Mol Cell* 14, 541-552.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B., and Labarre, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276, 8469-8474.
- Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S., and Laude, H. (2001). Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4055-4059.
- Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566-569.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: The antiprion activity of 6AP is completely absent in its close derivative 6APi.

- a.** The molecular structure of 6AP and 6APi are depicted. Simple introduction of a 2-(butan-1-ol) group (represented in blue) on the amino group in position 6 is sufficient to abolish the antiprion activity of 6AP.
- b.** Aliquots of an overnight culture of a [*PSI*⁺] strain (left panel, STRg6) and of a [*URE3*] strain (right panel, SB34), both growing as white colonies (because they contain prions), were spread on YPD medium supplemented with 200 μ M GuHCl. Small filters (similar to the ones used for antibiograms) were placed on the agar surface. 10 μ l of a 10 mM solution in DMSO of 6AP (top) and 6APi (bottom) were spotted on the filters. The Petri plates were then incubated three days at 25°C. Red halos are observed around the filters where 6AP was spotted, but not around those where 6APi was spotted indicating that, in contrast to 6AP, 6APi is inactive against yeast prions.
- c.** Scrapie-infected MovS cells were treated for eight days with the indicated concentrations of 6AP (upper gel) or 6APi (lower gel) and then lysed. Cell lysates were then subjected to proteinase K digestion (only PrP^{Sc} is resistant to proteinase K) followed by Western blot analysis using an anti-PrP antibody. Note that, as observed with yeast prions, only 6AP was active against PrP^{Sc} in a dose-dependent manner ($IC_{50} = 12 \mu$ M).

Figure 2: 6AP does not interact with prion proteins but shows specific interactions with ribosomal components.

- a.** A linker (aminocaproylamino-pentyl-oxo) was attached in position 1, 2 or 3 of 6AP as depicted in the molecular structure.

- b. The corresponding 6AP derivatives were tested for their activity against the [*PSI*⁺] prion (using the same strain and method as in **Figure 1b**). The numbers on the left refer to the position of the aminocaproylaminopentyloxy linker. Note that only the derivative carrying the linker in position 3 retains a significant antiprion activity.
- c. Molecular structure of 6AP beads with the linker in position 3 on 6AP, covalently linked to sepharose beads.
- d. Extracts from yeast (left panels), porcine brain (center panel) and murine MovS cells (right panel) were incubated with 6AP beads. The beads were then washed extensively and the bound proteins analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting analysis using antibodies directed against Sup35p, Ure2p or PrP as indicated. 1: crude extracts, 2: control beads without 6AP, 3: chromatography using 6AP beads. Note that none of the three prion proteins bind to 6AP beads.
- e. Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) reactions performed in the presence of various compounds and then subjected to proteinase K digestion followed by Western blot analysis using an anti-PrP antibody. All samples contain a mixture of normal and scrapie brain homogenates in addition to the tested compounds at various concentrations as indicated in the right panel. Note that both 6AP and 6APi are unable to inhibit *in vitro* conversion of PrP^C to PrP^{Sc}.
- f. Extracts from yeast (left panel), porcine brain (center panel) and murine MovS cells (right panel) were incubated with 6AP beads. The beads were then washed extensively and the bound proteins analyzed by SDS-PAGE. 1: control beads without 6AP, 2: chromatography using 6AP beads, 3: competition with free 6AP, 4: competition with free 6APi, the inactive derivative of 6AP (see **Figure 1a**). Gels were silver stained, specific

bands were excised and analyzed by mass spectrometry. Note that for all the tested extracts, all specific bands correspond to ribosomal proteins (see also **Table I**).

Figure 3: GA specifically interacts with ribosomal components.

- a.** Molecular structures of Guanabenz (GA), a very active antiprion molecule (already on the market for the treatment of hypertension) and of an inactive derivative (GAi) are depicted. Note that although the two molecules are very close in structure, GA is very active whereas GAi is totally inactive.
- b.** A linker (aminocaproylaminopentyloxy) was attached in position 4 of GA as depicted in the molecular structure. The corresponding molecule was then tested for its activity against $[PSI^+]$ prion (using the same strain and method as in **Figure 1b**). Note that a significant antiprion activity is maintained.
- c.** Molecular structure of GA beads used for the following chromatography experiments.
- d.** Extracts from yeast (left panel), porcine brain (center panel) and murine MovS cells (right panel) were incubated with GA beads. The beads were then washed extensively and the bound proteins analyzed by SDS-PAGE. 1: control beads without GA, 2: chromatography using GA beads, 3: competition with free GA, 4: competition with free GAi, the inactive derivative of GA (see panel **a**). Gels were silver stained, specific bands were excised and analyzed by mass spectrometry. Note that from all the tested extracts, all specific bands correspond to ribosomal proteins.

Figure 4: 6AP and GA compete each other for interaction with ribosomal components which is RNA-dependent.

Crude cell extracts (panel **a** and **b**) or RNA preparations (panel **c** and **d**) from yeast were incubated with 6AP beads (**a** and **c**) or GA beads (**b** and **d**). 1: control beads without 6AP or GA, 2: chromatography using 6AP or GA beads, 3: cellular extracts were treated by RNase A at 100 µg/ml for 20 minutes at room temperature before the affinity chromatography experiments, 4 and 6: competition with free 6AP or GA, 5 and 7: competition with free 6APi or GAI. The bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining (**a** and **b**) whereas the bound RNA were analyzed by appropriate denaturing gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining (**c** and **d**). Note that after treatment of cellular extracts by RNase A, ribosomal constituents are unable to bind 6AP or GA beads indicating that interaction between both compounds and the ribosomal constituents is RNA-dependent. Note also that both 6AP and GA (but not 6APi and GAI) are able to compete for the binding of ribosomal components to both 6AP and GA beads suggesting that they share common binding site(s). Finally, rRNA binds to 6AP and GA beads and this binding is competed by both 6AP and GA (but not 6APi and GAI) suggesting that there is a direct interaction between rRNA and 6AP or GA and that this interaction again involves overlapping binding site(s).

Figure 5: 6AP and GA have no effect on translation both *in vivo* and *in vitro*.

- a.** The effect of the indicated compounds on general *in vivo* translation in living yeast cells was evaluated. Briefly, various drugs or DMSO (the compounds vehicle) alone were added to yeast cells in exponential growth in YPD rich medium at a final concentration of 100 µM. After 10 minutes, radiolabelled [³⁵S] methionine was added for 10 minutes. The cells were harvested to prepare cell extracts which were then analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. Note that, with the exception of cycloheximide (a known

inhibitor of general translation), none of the tested compounds has a significant effect on global protein synthesis.

- b. *WT* yeast cells were grown in presence of DMSO (control left panel) or 6AP (at final concentration of 100 μ M, the concentration used for an efficient cure of prion) and cells extracts were then analyzed by 2D-SDS-PAGE followed by autoradiography. Note that no significant differences were observed between 6AP-treated cells and control cells.
- c. Effect of the indicated compounds on *in vitro* translation of EF1 α using a commercial kit (Ambion). Note that only cycloheximide significantly inhibits synthesis of EF1 α .

Figure 6: 6AP and GA strongly and specifically inhibit the protein folding activity of the ribosome.

- a. Scheme depicting the principle of the *in vitro* assay to evaluate the protein folding activity of the ribosome. Human Carbonic Anhydrase (hCA) was denatured (using GuHCl and EDTA) and then diluted into native buffer to allow refolding. Correct refolding was assessed by measuring the recovery of enzymatic activity as a function of time. Spontaneously, about 20% of the enzyme is able to refold correctly (Self folding, upper part of the scheme). If either a preparation of ribosomes, or the large subunit (50S), or the 23S rRNA, or the domain V of 23S rRNA, was added, the fraction of enzyme able to refold correctly increases up to 70%, due to the protein folding activity of the domain V of 23S rRNA of the large subunit of the ribosome (Assisted folding, lower part of the scheme).
- b. Effect of the various drugs (as indicated) on assisted folding of hCA by eukaryotic (yeast *S. cerevisiae*, right panel) or prokaryotic (*E. coli* left panel) ribosomes (or indicated part

of it). Concentration of each folding modulator is indicated. Note that only GA and 6AP, but not GAi and 6APi, were able to inhibit the assisted folding down to the level of self folding.

- c. Effect of heparin (left panel), tRNA (central panel) or BSA (right panel) on assisted folding of hCA. Note that none of these molecules are able to assist folding of hCA. Negative control is self folding and positive control is the assisted folding by 70S ribosome (for heparin and BSA experiments) or by 23S rRNA (for tRNA experiment).
- d. Effect of various compounds, as indicated, on the formation of f-Met-Leu dipeptide in an *in vitro* translation system based on purified *E. coli* ribosome. None of the tested drugs showed a significant effect on the kinetic of translation.

Figure 7: Chlorpromazine antiprion activity might also be due to modulation of ribosomal function.

- a. CPZ is not able to compete away binding of the ribosomal proteins to 6AP and GA beads. Crude cellular extracts from yeast were incubated with 6AP (left gel) or GA beads (right gel), the beads were then washed extensively and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and silver staining. 1: control beads without 6AP or GA, 2: chromatography using 6AP or GA beads, 3: competition with free 6AP or GA, 4: competition with free 6APi or GAi, 5: competition with CPZ.
- b. Effect of CPZ (1 mM final concentration) on assisted folding of hCA by 70S ribosomes. Note that CPZ is unable to inhibit hCA assisted folding.
- c. Simplified scheme depicting the pathway leading to down-regulation of ribosome-biogenesis in response to a membrane stress (adapted from (Li et al., 2000)).

- d. The antiprion effect of Chlorpromazine (CPZ, molecular structure depicted on the left) was determined in the *WT* [*PSI*⁺] strain deleted or not for the *PKC1* gene or in which the endogenous promoter of the *PKC1* gene was replaced by the *GAL1,10* inducible promoter. All these strains were spread on YPD medium supplemented with 600 μM GuHCl, in conditions where the expression from the *GAL1,10* inducible promoter was largely repressed. Note that when expression of *PKC1* is reduced (*pGAL-PKC1*), antiprion effect of CPZ is also reduced and that, when *PKC1* is deleted (*pkc1Δ*), CPZ antiprion activity is lost.
- e. Brefeldin A (BFA, molecular structure depicted on the bottom left) is weakly active against the [*PSI*⁺] prion. An aliquot of an overnight culture of a *WT* [*PSI*⁺] strain (growing as white colonies because it contains the [*PSI*⁺] prion) was spread on a Petri plate containing YPD medium supplemented with 200 μM GuHCl and small filters were placed on the agar surface. On the upper filter 6AP was added (20 μl of a 10 mM solution in DMSO) and the same amount of BFA was deposited on the bottom filter. The Petri plates were then incubated three days at 25°C. The red halos that can be observed around the filters indicate that BFA is also active against [*PSI*⁺] prions, although significantly less than 6AP.

E) Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 1

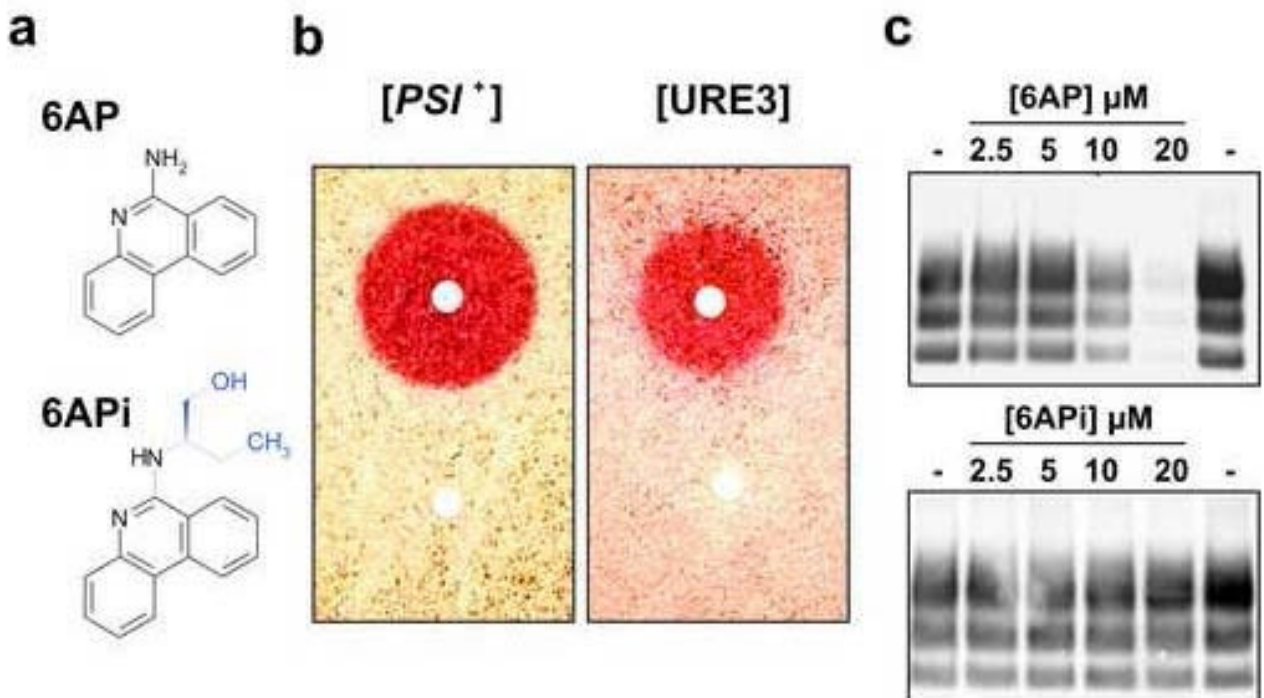


Figure 2

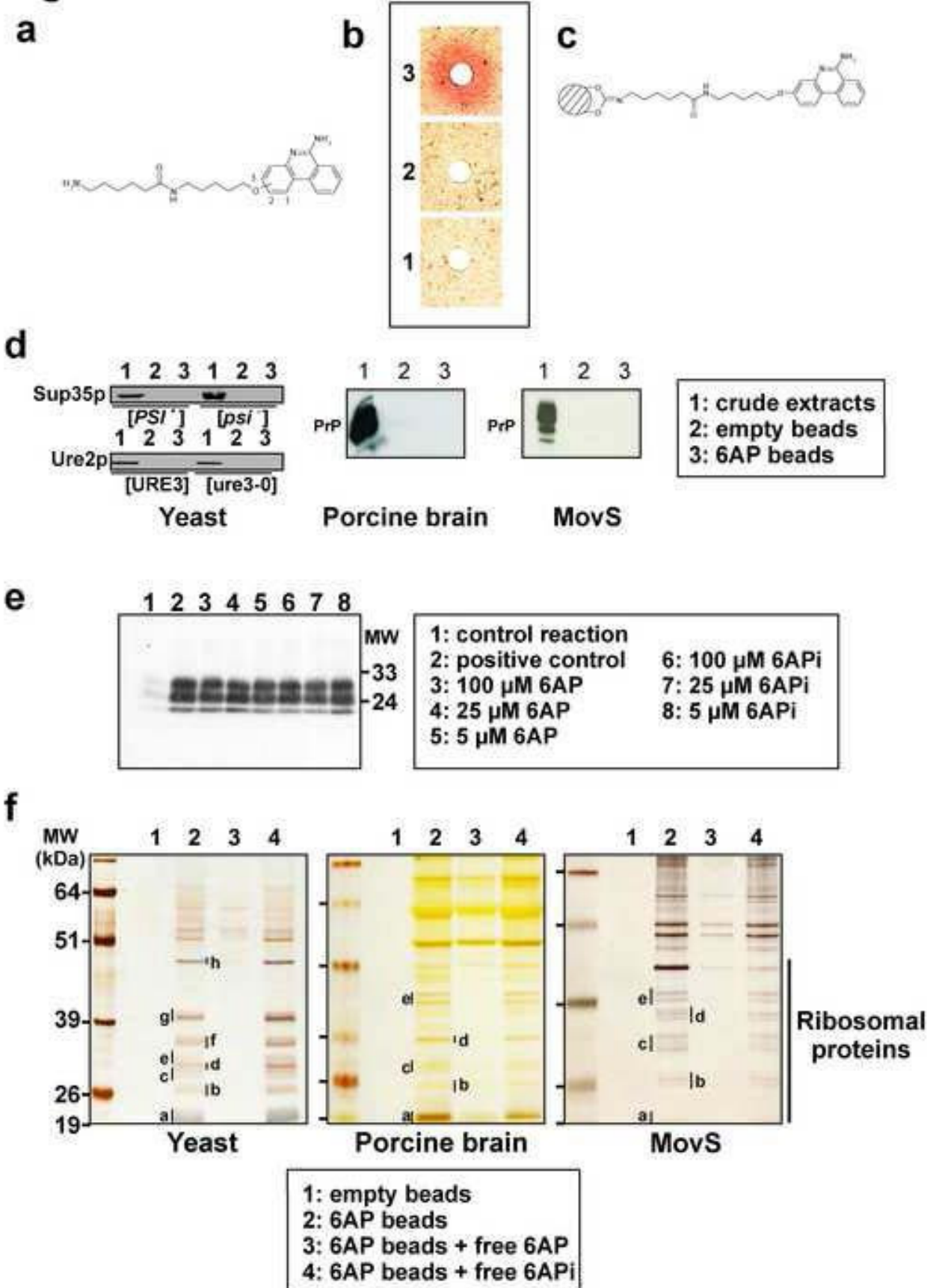
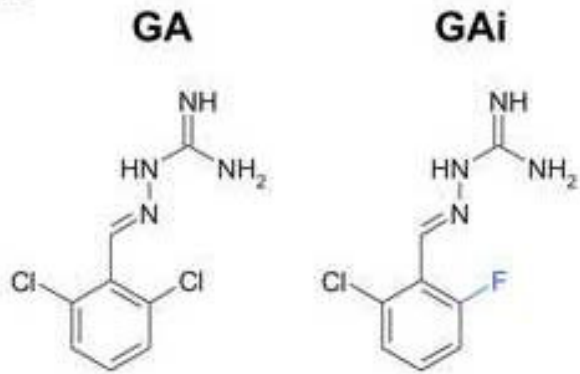
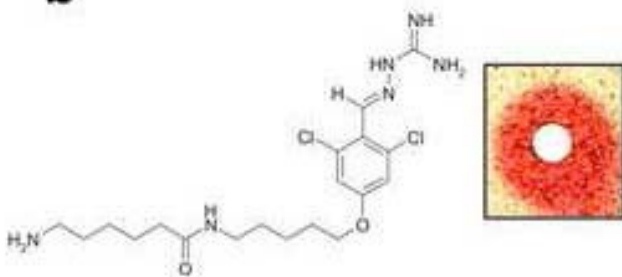


Figure 3

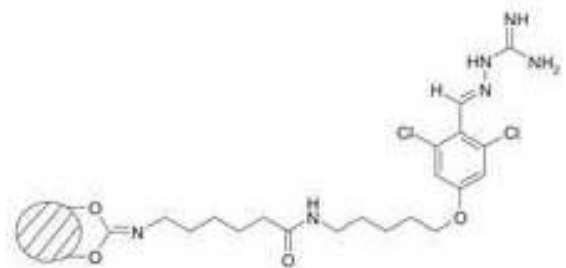
a



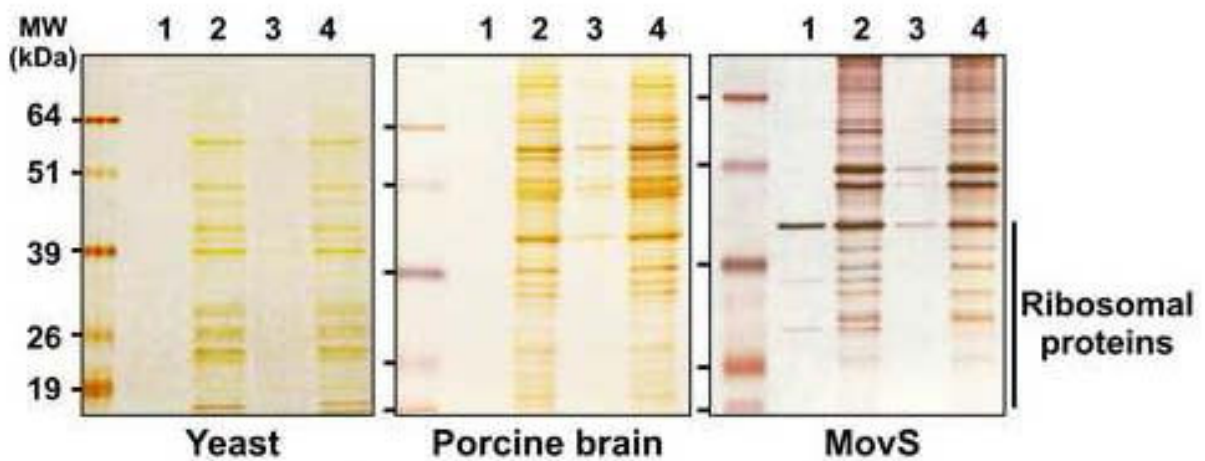
b



c

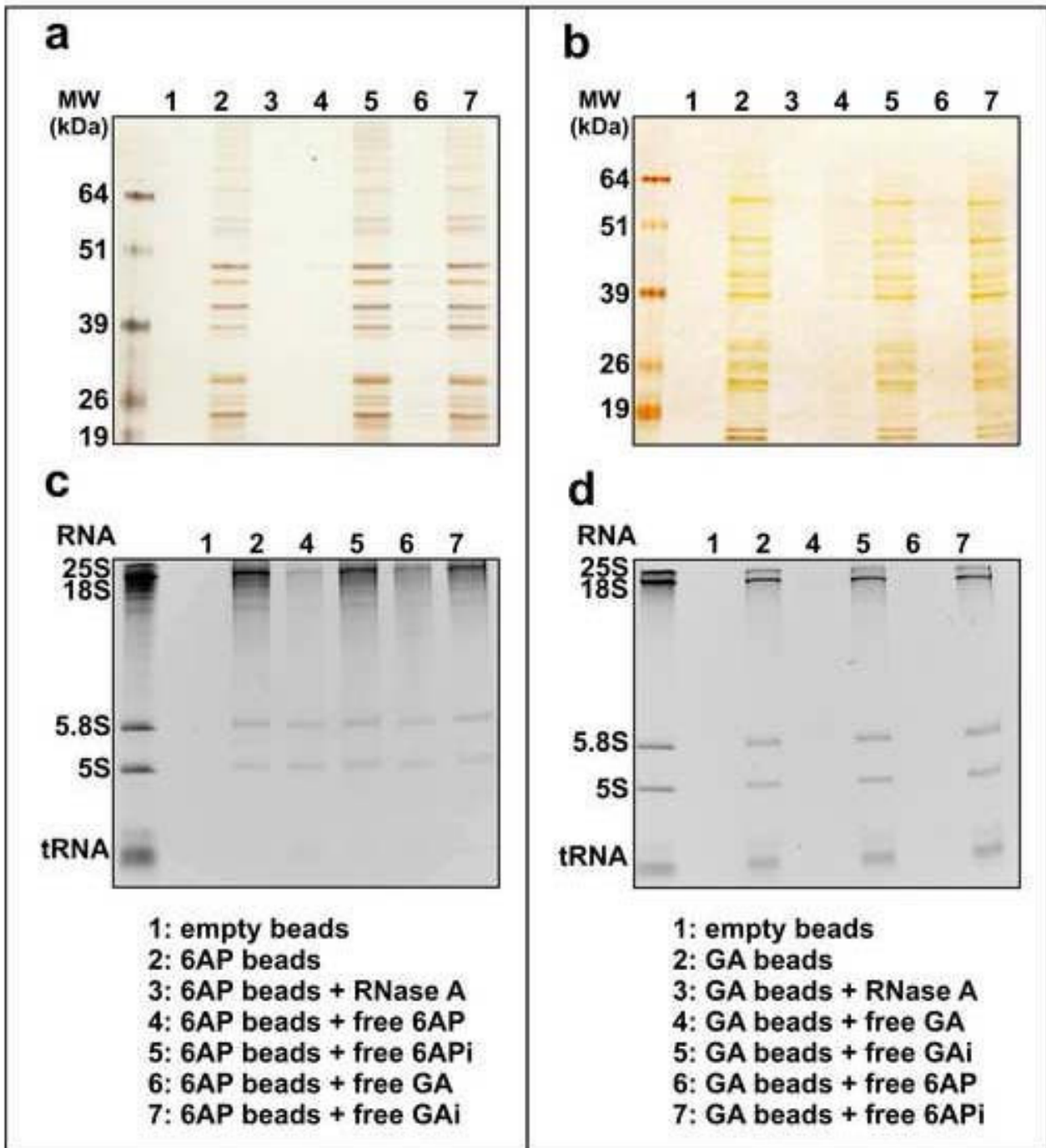


d



1: empty beads
2: GA beads
3: GA beads + free GA
4: GA beads + free GAI

Figure 4



E) Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 5

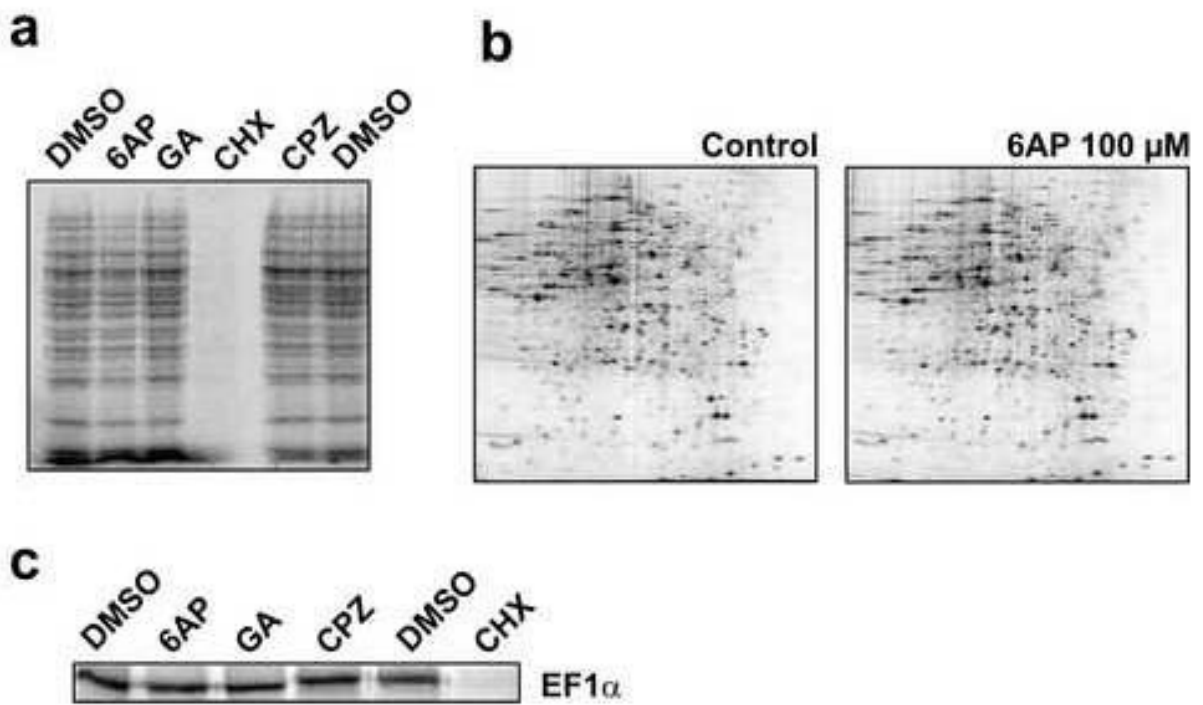
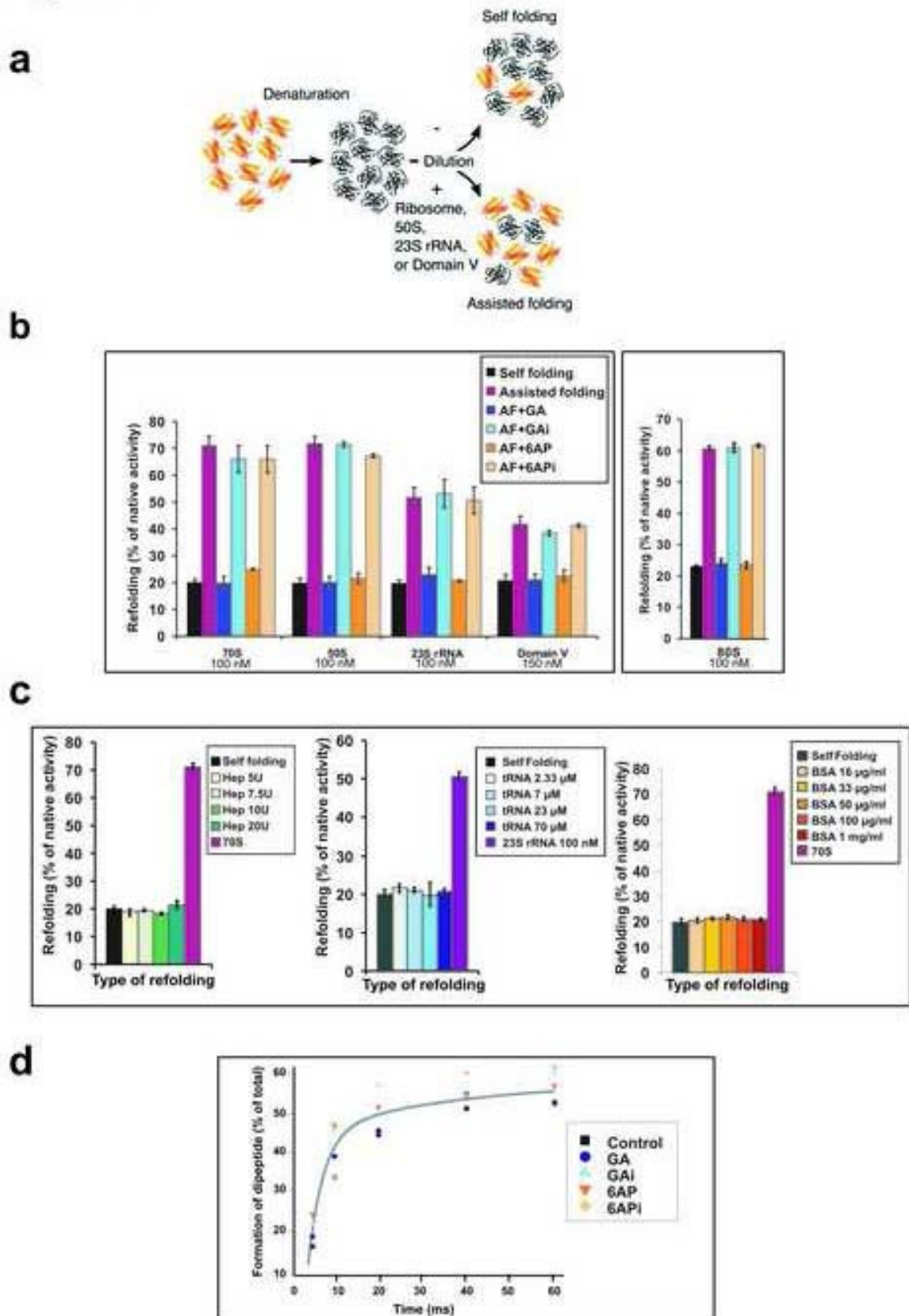


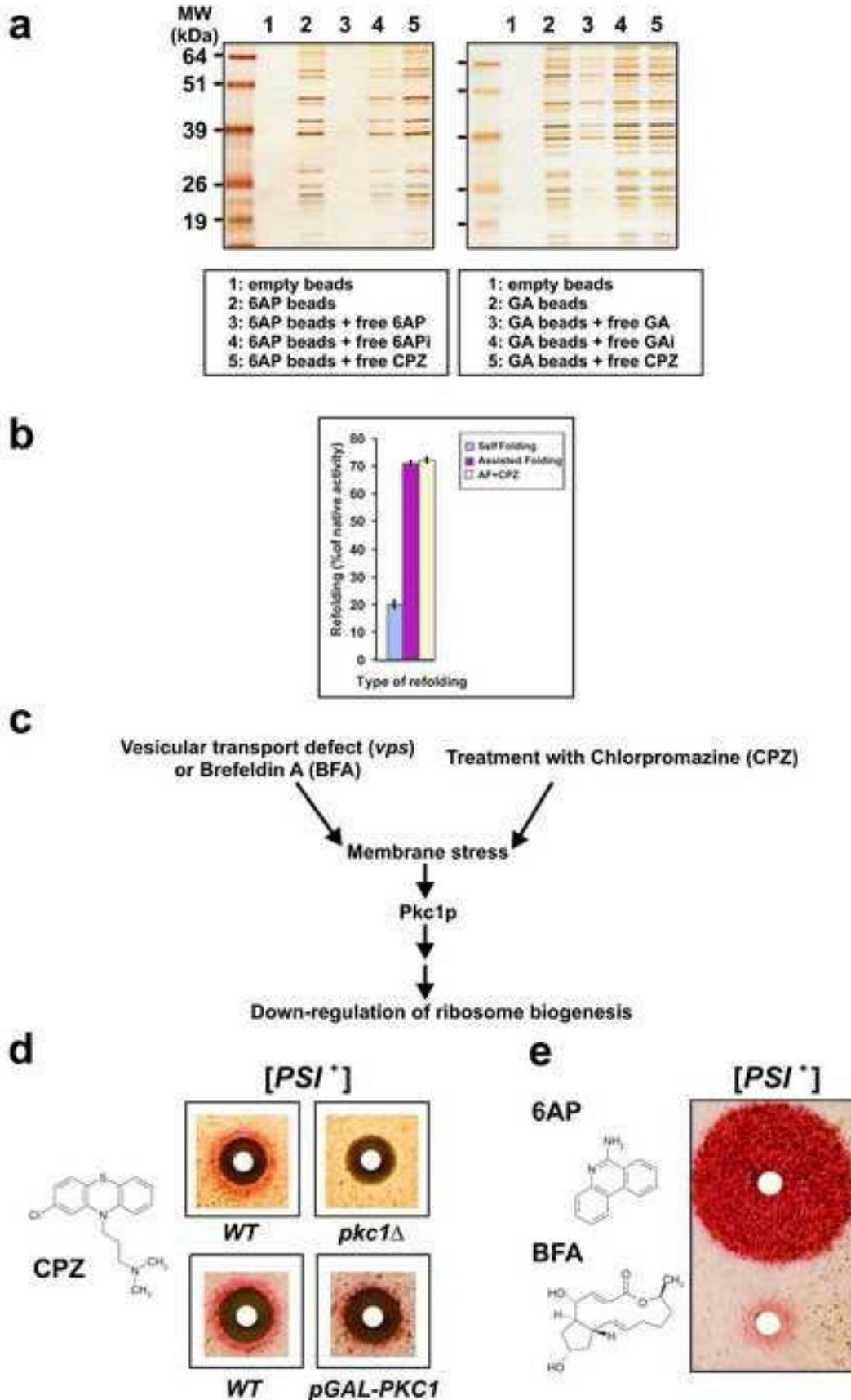
Figure 6



E) Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 7



Supplementary Table I: Mass spectrometry identification of proteins bound to 6AP beads

Group number	Origin	Theoretical molecular weight (kDa)
Yeast		
a.	<i>RPS11, RPL20, RPL24B, RPL24A</i>	18, 21, 18, 18
b.	<i>RPS9A, RPS9B, RPL18, RPL6A, RPL6B</i>	23, 23, 21, 20, 20
c.	<i>RPL19, RPS7A, RPL16A</i>	23, 23, 23
d.	<i>RPS8, RPL10, RPL7A, RPL7B, RPL15A</i>	25, 26, 28, 28, 25
e.	<i>RPS4, RPS1A, RPS1B, RPL8A, RPL2</i>	29, 29, 29, 28, 28
f.	<i>RPL5, RPLA0</i>	34, 34
g.	<i>RPL4A, RPL4B</i>	40, 40
h.	<i>RPL3</i>	45
Porcine brain		
a.	<i>RPL7A</i>	16
b.	<i>RPL18, RPS5</i>	22, 22
c.	<i>RPL10, RPL13, RPL14</i>	25, 25, 25
d.	<i>RPL5</i>	35
e.	<i>RPL3</i>	47
Mov		
a.	<i>RPL23</i>	18
b.	<i>RPL18, RPL13, RPL14</i>	22, 25, 24
c.	<i>RPS2, RPL7A</i>	29, 31
d.	<i>RPL6, RPP0, RPS8</i>	33, 34, 37
e.	<i>RPL3</i>	48

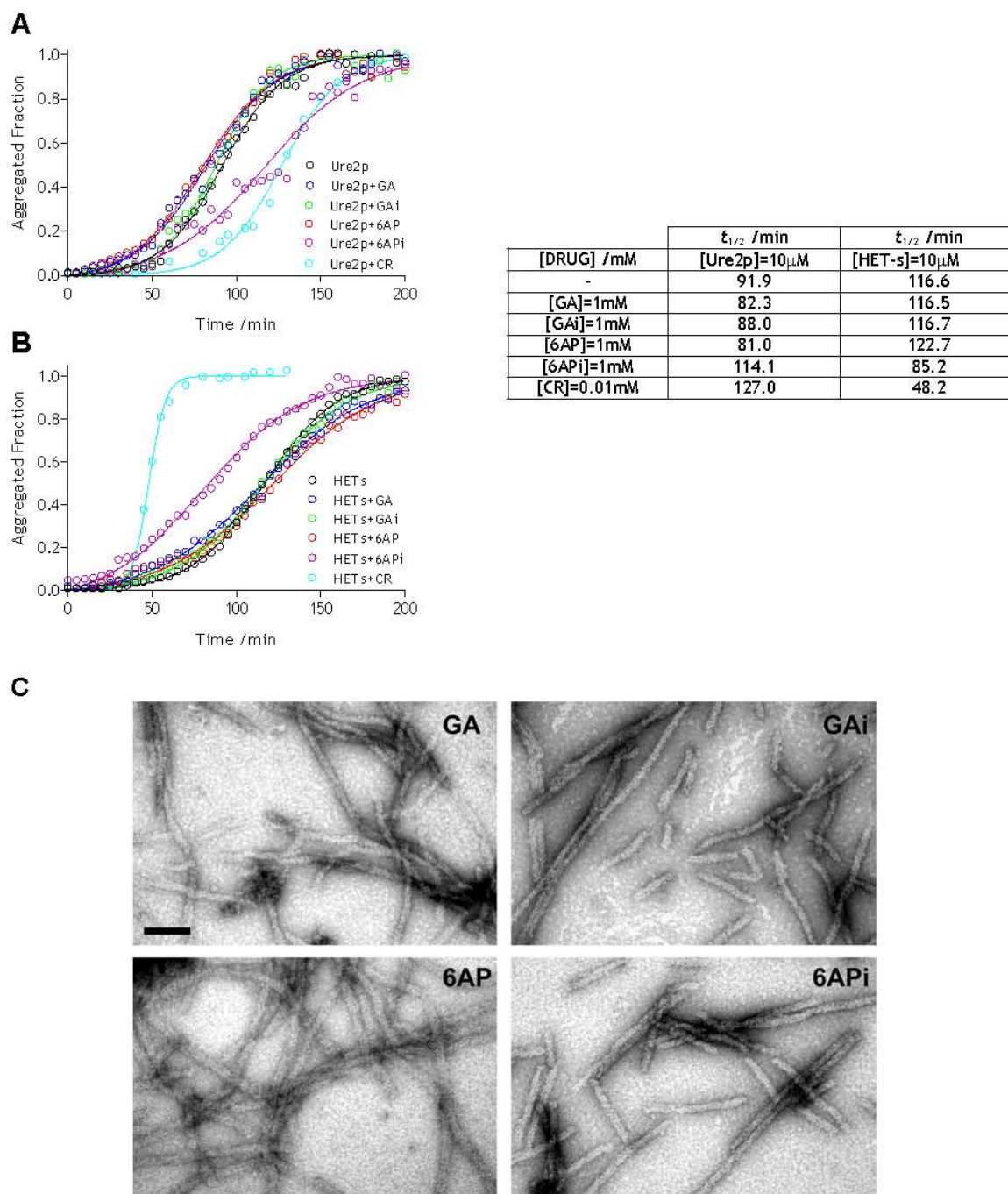
F) Supplemental Text and Figures

Supplementary Figure 1: Amyloid aggregation of purified fungal prion proteins in the presence of 6AP and GA and their inactive derivatives.

We have analyzed the amyloid formation rate of purified recombinant Ure2p yeast prion protein in the presence of 6AP and GA and their inactive derivatives (Figure 1A). Aggregation kinetics were followed by light scattering. Fibril formation was verified at polymerisation end points by ThT fluorescence (not shown) and Ure2p fibril morphology was also analyzed by EM. We do not know of any molecules that inhibit Ure2p amyloidogenesis that could have been used as a positive control in these experiments but since Congo red was described as an antiprion drug acting in *cis* and is known to delay amyloid formation in some systems¹, we chose to also include it in this experiment. Neither 6AP nor GA affected prion amyloid formation rate of Ure2p significantly while CR had a slight inhibitory effect. 6APi also induced a modest delay in amyloid formation. However, the compound was not fully soluble in the used conditions. Ure2p fibril morphology was the same with either 6AP, GA or their inactive derivatives (Figure 1C). The same experiment was also performed with the prion forming domain of HET-s, a fungal prion protein. There again, neither 6AP nor GA affected significantly amyloid formation. Again, the only compound that exerted a significant effect were CR and 6APi which here accelerated aggregation significantly (Figure 1B). It has been described previously that CR can have an inhibitory or pro-aggregative effect depending on the considered peptide or protein¹.

In these experiments, we found no correlation between the antiprion activity of the GA and 6AP and their inactive derivatives and their effect in *cis* on prion amyloid formation using purified recombinant proteins.

1. Frid, P., Anisimov, S. V. & Popovic, N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* **53**, 135-60 (2007).



Supplementary Figure 1: Amyloid formation rate of the Ure2p and HET-s PFD at pH 7 and 37°C in the presence of antiprion drugs and inactive derivatives. Prion aggregation was monitored by measuring the scattering at 600nm. The kinetics of the aggregation at 10 μ M of protein in absence or presence of 1mM of GA, Gai, 6AP, 6Api or 0.01mM of Congo Red (CR) were determined and the half-aggregation times have been obtained (A) Ure2p aggregation (B) HET-s PFD aggregation. (C) Ure2p amyloids have been analyzed at reaction end points by electron microscopy, scale bar is 100 nm.

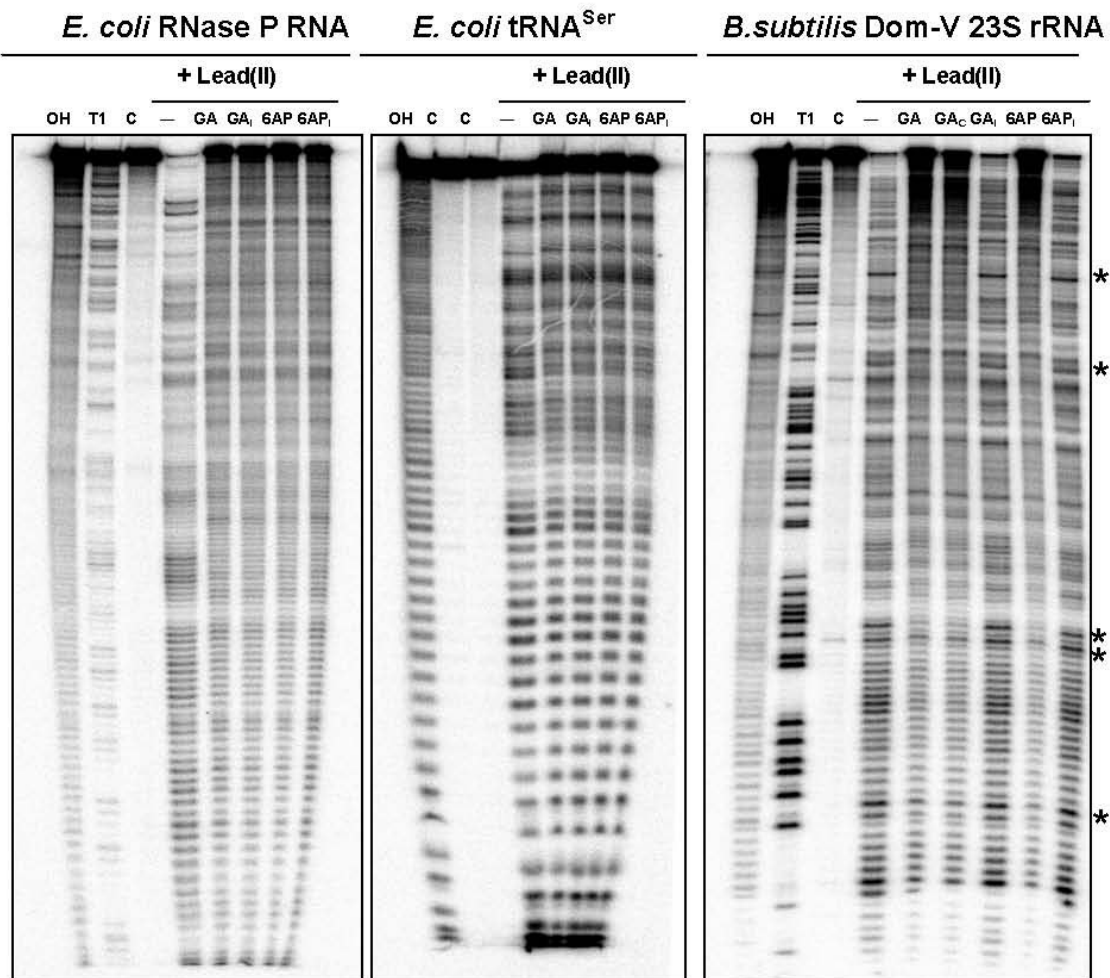
F) Supplemental Text and Figures

Supplementary Figure 2: Chemical Footprinting Analysis of Binding of the Antiprion Drugs (6AP and GA) on Various RNAs.

The autoradiograms below show chemical footprinting with $Pb(OAc)_2$, conducted on the *in vitro* transcribed 3'-end-labeled (^{32}P -pCp) *E. coli* RNase P RNA, *E. coli* tRNA^{Ser}, and domain V of *B. subtilis* 23S rRNA in the absence (-) or presence of antiprion drugs 6-Aminophenanthridine (6AP), Guanabenz (GA) and their inactive analogues 6APi and GAi respectively in a final concentration of 1 mM (dissolved in DMSO). The RNAs were subjected to Pb^{2+} -hydrolysis (5 mM) for 5 or 7 mins. Other lanes show alkaline ladder (OH), RNase T1 cleavage (T1) and DMSO treated control RNA (C). GA_S is the salt form of Guanabenz. The footprint assays as well as the control assays were separated on denaturing 8% polyacrylamide gels and further analysed using Phosphorimager (Molecular Dynamics 400S).

A comparison of the cleavage patterns showed specific and common protection sites (*) only on the domain V of 23S rRNA in the presence of active drugs 6AP, GA and GA_S. No protection was seen on the RNase P RNA and tRNA^{Ser} as well as with the inactive drug analogues (6APi and GAi) on the domain V of 23S rRNA.

These results clearly suggest specific binding of the antiprion drugs (6AP and GA) on 23S rRNA. The identification of the protected nucleotides will pinpoint the antiprion drug binding sites on it.



Chemical Footprinting

The chemical footprint analysis was performed in the presence of freshly prepared $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ solution, according to Udekwu et al.¹

E. coli RNase P RNA, *E. coli* tRNA^{Ser}, and domain V of *B. subtilis* 23S rRNA were transcribed *in vitro* and labelled with ^{32}P -pCp at the 3' end. The RNAs were subjected to Pb^{2+} -hydrolysis (5 mM) for 5 to 7 mins, in the absence or presence of the antiprion drugs 6AP and GA and their inactive analogues 6AP_i and GA_i respectively, at a final concentration of 1mM (dissolved in DMSO). The alkaline hydrolysis and the G-specific RNase T1 digestion were performed under denaturing conditions, according to the manufacturer's protocol (Ambion). The footprint assays as well as the control assays (only DMSO- treated) were separated on denaturing 8% polyacrylamide gels and further analysed using Phosphorimager (Molecular Dynamics 400S).

1. Udekwu, K. I. et al. Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev* **19**, 2355-66 (2005).

D. Résultats non publiés :

1. Les chaperons de protéines Hsp70p sont importants pour l'effet antiprion de la 6AP

Après avoir montré que la 6AP était active contre les prions de levure et de mammifères *ex vivo* et *in vivo*, indiquant une conservation des mécanismes de prionisation de la levure à l'homme, nous sommes revenus à la génétique de la levure. En effet, l'approche biochimique par chromatographie d'affinité avait révélé que notre drogue fixait, en plus des protéines ribosomales, des chaperons de protéines de la famille des Hsp70p. De même un crible génétique en levure révèle aussi que les chaperons de protéines Hsp ont un rôle à jouer et si on va plus loin nous verrons que l'inactivation *in vivo* de différentes Hsp70p récapitule l'effet antiprion de la 6AP suggérant que ces protéines sont essentielles pour l'apparition et le maintien du prion et qu'elles peuvent constituer de très bonnes cibles pour la mise au point d'un criblage enzymatique *in vitro*.

I. Développement d'un crible génétique en levure pour identifier des cibles potentielles de la 6AP

L'article 4 de ce manuscrit décrit la méthode. Le but est d'isoler des cDNA, de diverses origines et mis sous contrôle du promoteur fort et inductible *GALI,10*, dont la surexpression confère une résistance aux drogues antiprion. En effet, des cellules [*PSI+*] (formant des colonies blanches) qui surexprimeraient une cible potentielle de la 6AP devraient résister à la cure par cette drogue, et donc devraient rester blanches et ne pas devenir rouges. Deux campagnes de criblages avec une banque de cDNA de levure : une première par Stéphane Bach, post-doctorant au laboratoire, et une deuxième que j'ai réalisé en début de thèse sont récapitulées dans le tableau 12.

Nous avons tout d'abord isolé à trois reprises le gène *ADE1*, ce qui était attendu et ceci valide notre méthode de criblage : en effet, ce gène faisant parti du système rapporteur, il est normal que sa surexpression conduisent à la formation de colonies blanches, quel que soit le statut [*PSI+*] ou [*psi-*] des cellules. Par ailleurs, tous les autres gènes isolés ne l'ont été qu'une seule fois indiquant que nous sommes loin d'avoir saturé le crible. Des campagnes de criblages supplémentaires seraient nécessaires pour cela.

Par ailleurs, dans ce crible génétique, et tout comme avec l'approche biochimique, des gènes codant pour des protéines ribosomales sont ressortis (tableau 12). Egalement, un gène codant pour une co-chaperone des chaperons de protéines Hsp90p, Sba1p (homologue de p23 de

mammifère) a été identifiée. Nous nous sommes intéressés en premier lieu aux chaperons de protéines Hsp.

**Tableau 12 : cDNA dont la surexpression empêche la cure du prion [PSI⁺] par la 6AP.
La surexpression de Sba1p (homologue levure de p23) empêche la cure de [PSI⁺] par la 6AP.**

<i>Identification</i>	<i>Standard Name</i>	<i>Description</i>	<i>Biological process</i>
B3	RPL34B	Structural constituent of ribosome	Protein Biosynthesis
B4	YOP1	YPT interacting protein	Membrane organization and biogenesis
B13	VPS29 ?	3' part of the VPS29/ARD1 coding region	Retrograde (endosome to Golgi) transport
B20	YNL217w	?	?
B23	RPL2B	Structural constituent of ribosome ribosomal protein L2B	Protein Biosynthesis
B24	RPS31	Ribosomal protein S31 & also encodes a ubiquitin protein	Protein Biosynthesis
B27	GPI12	Required for synthesis of N-acetylglucoaminyphosphatidylinositol (intermediate in synthesis of GPI anchors)	GPI anchor biosynthesis
B31	RPS17A	Structural constituent of ribosome ribosomal protein S17A	Protein Biosynthesis
B32	RPS1A	Structural constituent of ribosome ribosomal protein S1A	Protein Biosynthesis
B35	RPL24A	Structural constituent of ribosome ribosomal protein L24A	Protein Biosynthesis
B36	SBA1	HSP90 associated co-chaperone, shows similarity to the mammalian P-Twenty-Three proteins	Protein Folding
B37	HXK2	Hexokinase II	Fructose metabolism
B39	RIB5	Riboflavine synthase	Vitamin B2 biosynthesis
B42	ABF2	DNA Binding	Mitochondrial genome maintenance
Faux positifs B40-C5-C6	ADE1	Phosphoribosyl amino imidazolesuccinocarboxamide synthetase	Purine base metabolism

II. Hsp90p n'est pas une cible de la 6AP

Etant donné que Sba1p est une co-chaperone de Hsp90p, le crible génétique nous a donc orientés vers Hsp90p. Nous nous sommes alors demandé si Hsp90p pouvait être impliqué dans les mécanismes de prionisation. Pour cela deux expériences ont été réalisées: **1- tests sur boîte** : nous avons testé deux inhibiteurs des Hsp90p : le Pu3 et la Geldanamycine. En effet, si les Hsp90p sont des cibles de la 6AP, des inhibiteurs de cette enzyme devraient avoir un effet antiprion or comme nous pouvons le voir sur la figure 61a, les inhibiteurs d'Hsp90p n'ont aucun effet sur la cure des prions suggérant que nos drogues antiprion n'inhibent pas le chaperon de protéines Hsp90p.

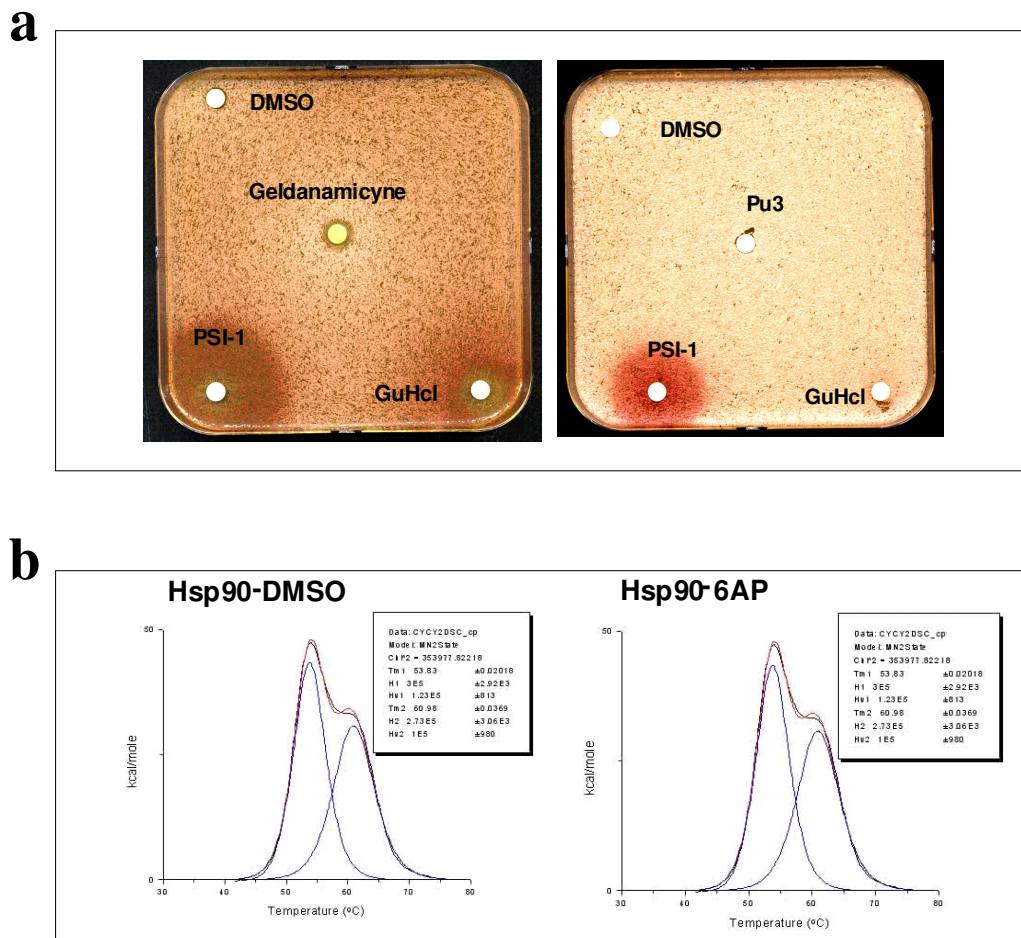


Figure 61 : Hsp90p n'est pas une cible de la 6AP.

a. La Geldanamycine et Pu3 sont des inhibiteurs connus d'Hsp90p. La figure montre qu'ils n'ont aucune activité antiprion contrairement à la 6AP (PSI-1) et au Chlorure de Guanidium (GuHCl). Si Hsp90p était impliqué dans les mécanismes de "prionisation" on aurait pu s'attendre à ce que des inhibiteurs de cette protéine, curent les prions de levures, or ce n'est pas le cas.

b. La calorimétrie consiste à chauffer graduellement une protéine jusqu'à dénaturation. Ceci se traduit par l'apparition d'un pic caractéristique pour chaque protéine. Si une molécule interagit avec la protéine en question, le pic de dénaturation est décalé. La figure montre qu'en présence ou non de la drogue antiprion 6AP, le pic n'est pas décalé. Hsp90p n'interagit donc probablement pas directement avec la 6AP.

2- Calorimétrie : cette expérience a été réalisée en collaboration avec Cyrille Garnier et Denis Chrétien de l'université de Rennes 1. Cette méthode est basée sur le fait que chaque protéine, après chauffage possède un pic de dénaturation précis et qui lui est spécifique or si une petite molécule interagit avec la protéine le pic sera décalé. En présence de DMSO (contrôle négatif) ou de 6AP, le pic de dénaturation de la protéine Hsp90p de mammifère (porc) n'est pas décalé (figure 61b). La 6AP n'interagit donc probablement pas directement avec le chaperon de protéine Hsp90p : cette dernière n'est sans doute pas une cible directe de la 6AP.

III. Hsp70p pourrait être une cible de la 6AP

En poursuivant notre raisonnement, nous nous sommes dirigés vers les chaperons de protéines de la famille des Hsp70p. En effet si nous revenons à l'approche par chromatographie d'affinité, il est important de se rappeler que nous avons isolé les protéines Ssap et Ssbp, membres de la famille des chaperons de protéines Hsp70p (figure 62).

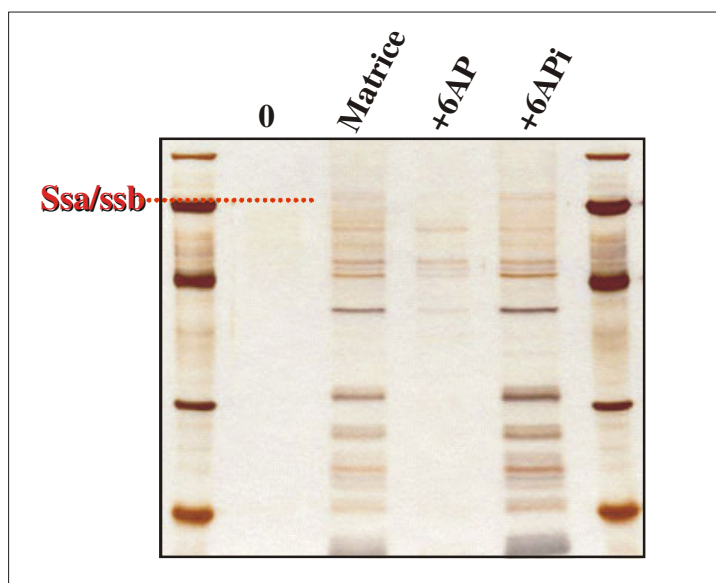


Figure 62 : Hsp70p est une cible potentielle de la 6AP.

En plus de l'identification des protéines ribosomales, l'expérience de chromatographie d'affinité a révélé d'autres protéines se liant spécifiquement à la 6AP c'est-à-dire ne se liant pas à la matrice contrôle (0), se liant à la matrice et compétées après incubation avec la 6AP libre et non compétées après incubation avec la 6AP inactive (6APi). Ces protéines sont Ssa2p, Ssb1p et Ssb2p, trois membres de la famille des Hsp70p.

Après identification par spectrométrie de masse, les protéines indiquées sur la figure, fixées par la matrice drogue-bille, compétées par la 6AP et non compétées par le dérivé inactif de la 6AP se sont révélées être Ssa2p et Ssb1, 2p, trois membres de la famille des Hsp70p. Cette expérience ne répond toutefois pas à la question de savoir si cette interaction est directe ou non. D'après la littérature les protéines Ssbp se fixent aux ribosomes au cours de la traduction (Pfund et al., 1998).

Ainsi deux modèles sont possibles :

- soit la 6AP interagit directement avec le ribosome, entraînant aussi Ssa2p et Ssb1, 2p qui interagissent physiquement avec le ribosome
- soit la 6AP interagit directement avec Ssa2p et Ssb1, 2p, entraînant le ribosome qui interagit avec elles.

Pour savoir si nos drogues antiprion fixent directement ou indirectement les chaperons de protéines Hsp70p, deux expériences ont été réalisées : **1- chromatographie d'affinité** avec des extraits de levure où les gènes *SSB* et *SSA* sont délétés. Sur la figure 63a, nous pouvons voir que l'absence de ces protéines n'empêche absolument pas la fixation des protéines ribosomales, signifiant que le ribosome interagit directement avec la 6AP.

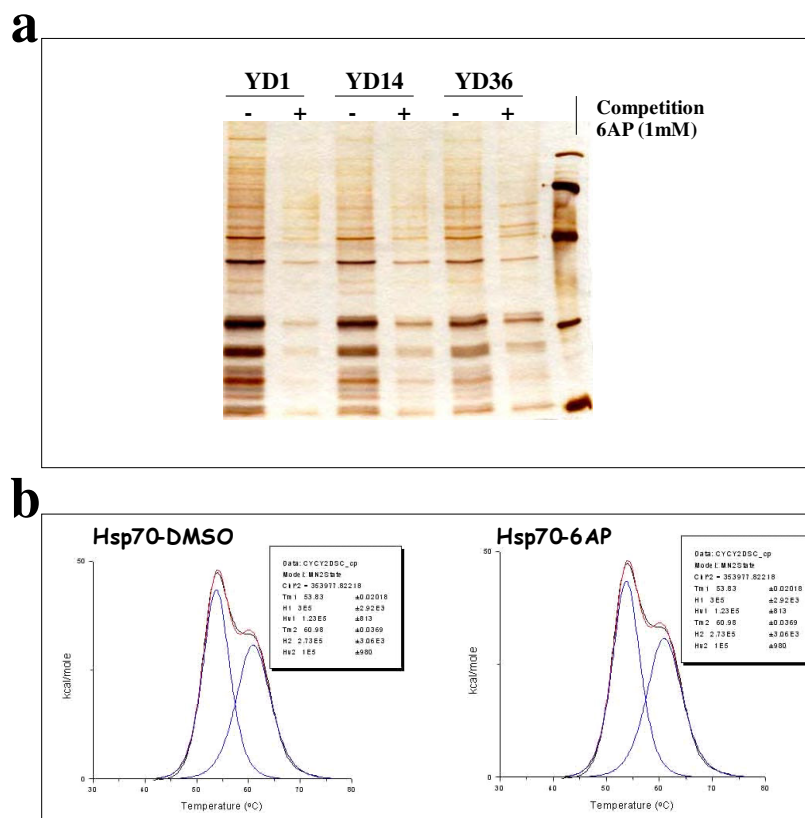


Figure 63 : Hsp70p n'est pas une cible directe de la 6AP.
a. L'inactivation de différents membres de la famille des Hsp70p n'empêche pas la fixation des protéines ribosomales. En effet, lorsqu'on dépose des extraits protéique des mutants YD1 (*ssb1Δ ssb2Δ*), YD14 (*ssa1Δ ssa2Δ*) et YD36 (*ssa1,2ΔΔ ssb1,2ΔΔ*), les protéines ribosomales se fixent toujours à la drogue antiprion.
b. L'expérience de calorimétrie ne révèle aucun décalage dans le pic de dénaturation de l'Hsp70p de mammifère (rat) que ce soit en présence du contrôle négatif DMSO ou en présence de la 6AP.

2- calorimétrie avec une Hsp70p purifiée de mammifère (rat) : l'expérience a aussi été réalisée par Cyrille Garnier et Denis Chrétien de l'université de Rennes 1 dans les mêmes conditions que pour Hsp90p et les résultats montrés en figure 63b suggèrent que Hsp70p n'interagit pas directement avec la drogue antiprion 6AP puisque l'on observe aucun décalage de pic de dénaturation de la protéine Hsp70p en présence ou en absence de 6AP.

Grâce à un programme d'action incitative (PAI) « Ulysse », j'ai effectué un séjour de trois semaines dans le laboratoire de Gary Jones (Yeast Genetics Laboratory, Maynooth, Irlande), spécialiste des chaperons de protéines chez la levure. J'ai ainsi pu utiliser les différents mutants des membres de la famille des Hsp70p disponibles dans ce laboratoire. L'idée de départ de cette collaboration était d'essayer d'isoler des mutants de différentes Hsp70p qui soient résistants à la cure par la 6AP. En effet, si les Hsp70p sont des cibles directes de la 6AP, de tels mutants doivent être isolables. En accord avec les résultats de calorimétrie, nous n'avons pas été capables d'isoler de tels mutants, malgré des tentatives répétées. Par contre nous avons pu tester l'inactivation/surexpression de différents co-chaperons des Hsp70p sur l'effet de cure par la 6AP et le GA. Les résultats montrent que la délétion de Fes1p (« Nucleotide Exchange Factor ») qui favorise la forme ouverte de Hsp70-ATP augmente la sensibilité à la cure par la 6AP (figure 64). En revanche la surexpression de Fes1p n'a aucun effet.

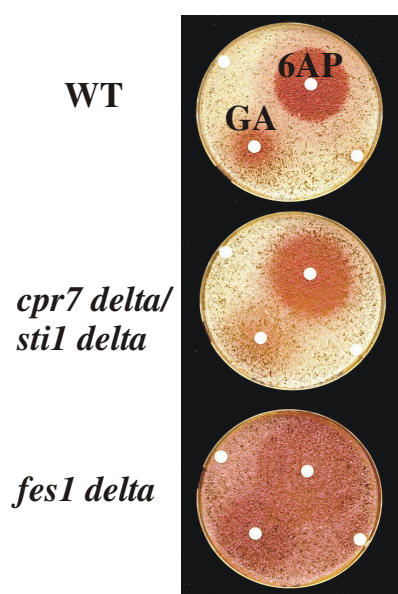


Figure 64 : La délétion de *FES1* augmente la sensibilité de cure des drogues 6AP et GA.

Si nous comparons à la souche sauvage (WT), la simple délétion de *FES1* augmente la taille du halo rouge après dépôt des drogues antiprion sur les pastilles; la sensibilité à la cure par les drogues antiprion 6AP et GA est augmentée.

La forme « fermée » d'Hsp70p, Hsp70-ADP, favoriserait la forme non prion des protéines, en accord avec les résultats présentés dans l'article très récent de Gary Jones (Loovers et al., 2006). Mais ces expériences ne répondent pas à la question de savoir si Hsp70p est une cible directe de la 6AP. Ceci constitue toutefois une autre preuve que ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de prionisation et dans les mécanismes de cure par la 6AP et le GA.

IV. L'inactivation de différentes Hsp70p de levure récapitule l'effet de cure de la drogue antiprion 6AP

Chez la levure, la famille des Hsp70p se divise en deux sous-famille : les protéines Ssap (Ssa1p, Ssa2p, Ssa3p et Ssa4p) et les protéines Ssbp (Ssb1p et Ssb2p).

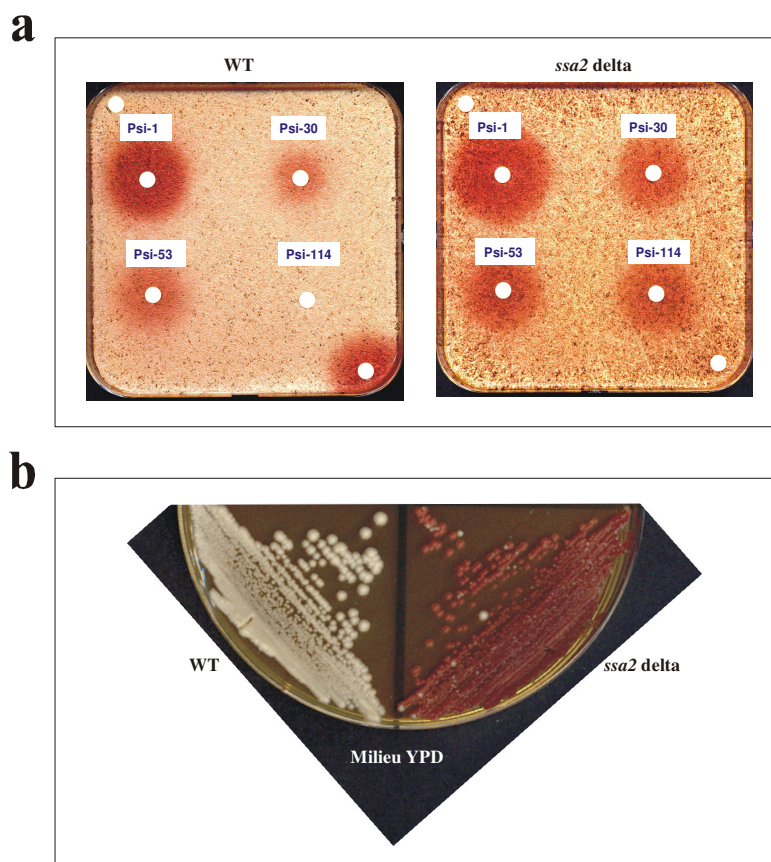


Figure 65 : L'inactivation de différents gènes d'*HSP70* récapitule l'effet antiprion de la 6AP chez la levure pour *[PSI+]* et *[URE3]*.

a. Sur le panneau de gauche, différentes drogues antiprion : la 6AP (Psi-1), le Guanabenz (Psi-114) et aussi deux autres drogues antiprion, le 11-amino-4-chloro-dibenzo[b,f]-diazepine (Psi-30) et le Psi-53 sont testées pour leur activité contre le prion *[PSI+]* dans une souche sauvage (WT). Comme attendu, on observe un halo de colonies rouges autour des filtres où les drogues ont été déposées. Ces drogues ont une activité antiprion. Sur le panneau de droite, dans cette souche identique où le gène *SSA2* a été délété, la sensibilité aux mêmes drogues est accrue.

b. La délétion du gène *SSA2* provoque la perte du prion *[URE3]*.

Nous avons construit toutes les combinaisons de mutants possibles (viables) et pratiqué pour chaque mutant en un test sur boîte afin de voir l'effet des mutations considérées sur la cure par la 6AP. Le seul mutant qui montre un effet significatif est le mutant *ssa2Δ* (figure 65), seul gène exprimé constitutivement, contrairement aux autres gènes *SSA* qui sont induits par des stress. En effet, la simple délétion de ce gène *SSA2* augmente l'effet de cure de la 6AP du prion [*PSI*⁺] (figure 65a) et cure totalement le prion [URE3] sans drogue antiprion dans le milieu (figure 65b). Ainsi, l'inactivation du gène *SSA2* récapitule l'effet de la drogue antiprion 6AP. Le fait que les agrégats du prion [URE3] soient plus facile à curer pourrait être dû au fait, que ces agrégats soient plus gros que les agrégats du prion [*PSI*⁺] (et donc plus facilement perdus).

Ces résultats suggèrent donc également que les chaperons de protéines de la famille des Hsp70p jouent un rôle dans les mécanismes d'apparition et de maintien des prions et sont de plus impliqués dans l'activité antiprion de la 6AP et du GA. Il serait maintenant intéressant de réaliser ces expériences dans des lignées de cellules mammifères par des méthodes utilisant la technologie des ARN anti-sens. Le but serait d'observer le devenir de la PrP^{Sc} après inactivation des chaperons de protéines Hsp70p de mammifère.

V. Effets antagonistes de différentes Hsp70p sur le maintien des prions

Nous allons maintenant terminer ce chapitre concernant les résultats non publiés sur les Hsp70p avec des expériences qui ont révélé des résultats inattendus, plutôt esthétiques et amusants.

En effet lorsque nous avons construit tous les mutants possibles d'Hsp70p en levure et que nous les avons testés sur boîte afin d'observer leur comportement vis-à-vis de la cure par la 6AP, nous avons obtenu un résultat surprenant pour le double mutant *ssb1,2ΔΔ* (figure 66). Il est apparu comme une cible autour du filtre à antibiogramme où la drogue a été déposée. En effet, une alternance de rouge, blanc, rouge est apparue autour du filtre. En récupérant des colonies dans les différentes zones, nous avons confirmé que les colonies rouges correspondent à des cellules [*psi*⁻] et les colonies restées blanches (anneau du milieu) correspondent bien à des cellules [*PSI*⁺]. Ce résultat étrange peut être expliqué si on admet qu'on a affaire à une famille multigénique avec des gènes ayant des effets contradictoires. Il y aurait des gènes codant pour des protéines « proprion » et à l'inverse des gènes codant pour des protéines « antiprion » avec des susceptibilités aux drogues différentes. Si notre hypothèse est vraie, à savoir qu'on touche bien une famille multigénique, l'utilisation d'autres drogues devrait modifier la taille du halo blanc étant donné qu'elles n'ont que peu de chance d'affecter

de la même façon, les différents membres de la même famille. C'est effectivement ce que nous avons observé (figure 66, en haut à droite). Les trois drogues testées conduisent à des profils différents. Une des façons d'expliquer cette alternance rouge, blanc, rouge est de proposer que, près de la pastille où la concentration en drogue antiprion est forte, la drogue inhibe tous les « prapion », ensuite la concentration en drogue diminue, ce qui provoque une résistance à la cure due à une inhibition insuffisante des « pro-prion » et, lorsque la concentration en drogue est encore plus faible, nous pouvons imaginer que cela lève l'inhibition des « antiprion » et qu'ils prennent donc le dessus favorisant ainsi la cure, donc l'apparition de colonies rouges.

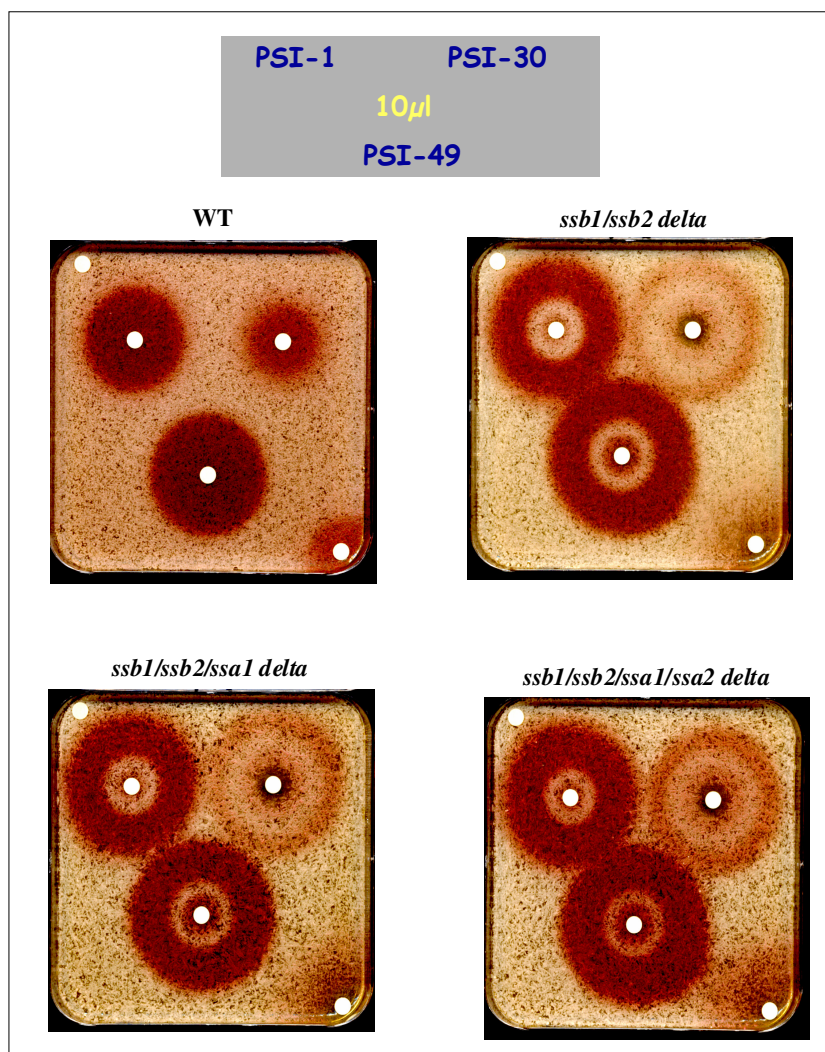


Figure 66 : Effets antagonistes de différentes Hsp70p sur le maintien des prions.

Sur le panneau en haut à gauche, est montrée l'activité de trois drogues antiprion la 6AP (Psi-1), le 11-amino-4-chloro-dibenzo[b,f]-diazepine (Psi-30) et la 6-amino-8-chlorophénanthridine (Psi-49), dans la souche sauvage [*PSI+*]. Sur les trois autres panneaux, la sensibilité aux drogues est bouleversée du fait de l'inactivation de différents gènes codant pour des Hsp70p. Un profil étrange en "cible" apparaît. Ce profil est différent pour chaque drogue.

Enfin, pour confirmer le fait qu'on est bien en présence de gènes codant pour des protéines « antiprion » et de gènes codant pour des protéines « proprion », nous avons délété dans le double mutant *ssb1ssb2*, les gènes *SSA1* et/ou *SSA2*. Comme montré sur la figure 66 (panneau du bas), la délétion du gène *SSA1* provoque une diminution de taille du halo blanc. Ce phénomène est encore plus marqué si le gène *SSA2* est lui aussi délété. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les gènes *SSA* seraient des « proprion » alors que les gènes *SSB* seraient des « antiprion », comme déjà suggéré dans la littérature (Roberts et al., 2004).

A partir de ces expériences et de ces mutants, nous avons imaginé un crible pour isoler des gènes qui codent pour des protéines « antiprion ».

VI. Développement d'un crible génétique en levure pour cribler des gènes codant pour des protéines « antiprion »

A l'inverse du crible précédemment décrit où l'on recherchait des protéines empêchant la cure donc des « proprion », ici nous recherchons des protéines qui favorisent la cure. Cette méthode est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes du manuscrit. Nous utilisons le double mutant *ssb1,2ΔΔ* ayant le profil « rouge, blanc, rouge » soit « cure, pas cure, cure » et nous nous plaçons dans les conditions où le halo est blanc, c'est-à-dire où il y a absence de cure. Il nous fallait donc tout d'abord déterminer ces conditions. Pour cela nous avons étalé le double mutant sur des milieux contenant des concentrations croissantes en drogue, allant de 0 à 110 μM de 6AP (figure 67) et nous avons observé à partir de quelle concentration les colonies devenaient blanches. Sur la figure 67, nous voyons que les colonies sont blanches à partir de 30 μM de 6AP et ceci jusqu'à 100 μM de 6AP. Nous avons décidé de réaliser les expériences du crible dans les conditions où la 6AP est à 50 μM dans le milieu. Nous avons transformé les doubles mutants *ssb1,2ΔΔ* par une banque d'ADN génomique clonée dans un vecteur multicopie (2μ) pFL44 puis nous les avons étalé sur un milieu contenant 50 μM de 6AP. Le but était de cribler des colonies qui sont normalement blanches sur ce milieu mais qui après surexpression d'une protéine deviennent rouges.

De ce crible, il est apparu, que la surexpression du gène *ZUO1* codant pour la Zuotine, un chaperon de protéines, restaure la cure des mutants. Nous retombons donc, encore une fois sur un chaperon de protéines. Nous avons alors construit le mutant *zuo1Δ* et nous l'avons testé sur boîte afin de voir quel effet l'inactivation de ce gène avait sur la cure du prion par la 6AP (figure 68). Le résultat montre que la délétion de ce gène augmente l'effet de cure du prion

[PSI+] par la 6AP. Ce résultat peut paraître contradictoire puisque d'un côté nous isolons la protéine Zuotine comme étant une protéine « anti-prion » qui favorise la cure et d'un autre côté lorsque nous la délétions, nous trouvons que cela favorise aussi la cure. Il fait penser au résultat obtenu avec Hsp104p : son inactivation, tout comme sa surexpression conduit à la cure.

Ceci montre que les chaperons de protéines peuvent avoir des effets qui favorisent la formation des prions ou au contraire qui antagonisent la formation des prions, tout est question d'équilibre. Dans tous les cas, ces chaperons sont impliqués et peuvent être des cibles potentielles de drogues anti-prion.

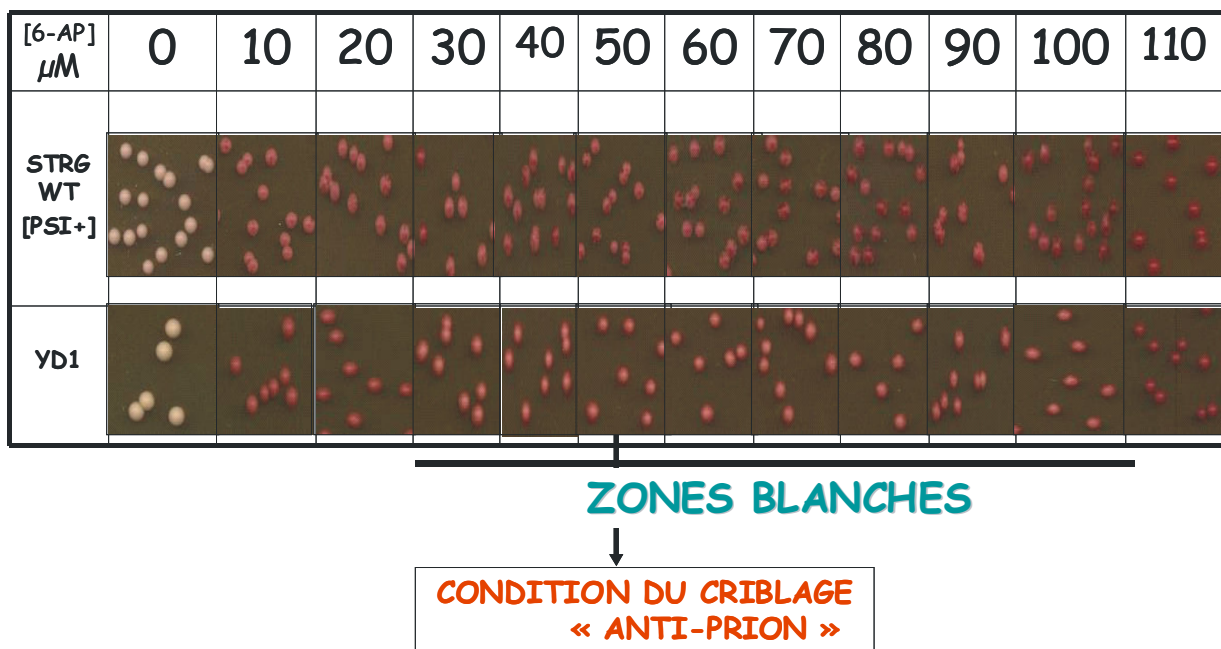


Figure 67 : Détermination des conditions du crible pour identifier des protéines “anti-prion”.

Des cellules du double mutant *ssb1,2ΔΔ* sont étalées sur des milieux contenant 200 μM de GuHCl et des concentrations croissantes en drogue, allant de 0 à 110 μM de 6AP. De 30 μM à 100 μM de 6AP, les colonies sont blanches (partie du halo blanc observée sur la figure 66). Le crible suivant, pour isoler des protéines “anti-prion” sera fait dans les conditions où la 6AP est à 50 μM dans le milieu. Comme contrôle, les cellules sauvages [PSI+] sont étalées sur les mêmes milieux; à 0 μM, aucune cure n'est observée et à partir de 10 μM, les cellules deviennent rouges, elles sont curées. La souche double mutante *ssb1,2ΔΔ* est alors transformée par une banque d'ADN génomique clonée dans un vecteur multicopie (2μ) pFL44 puis les cellules sont étalées sur un milieu riche contenant 200 μM GuHCl ainsi que 50 μM de 6AP. Les colonies qui sont récupérées sont celles qui deviennent rouges sur le milieu.

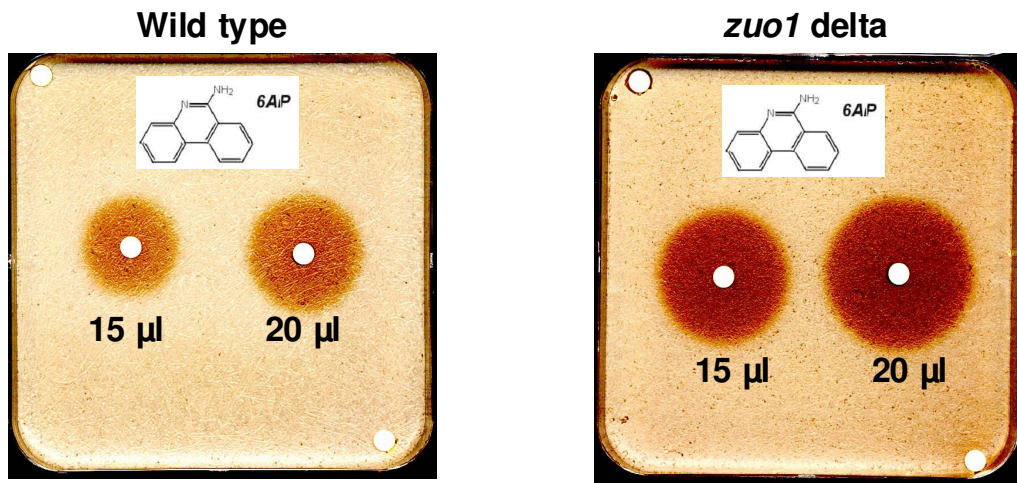


Figure 68 : Effet de la délétion du gène *ZUO1* sur la cure du prion [*PSI+*] par la 6AP. Comparativement à la souche sauvage (panneau de gauche), la délétion du gène *ZUO1* (panneau de droite) augmente fortement la sensibilité des drogues à la cure du prion [*PSI+*].

2. Etude de l'effet antiprion de la Chlorpromazine :

La Chlorpromazine, un antipsychotique ayant également une activité antiprion en système mammifère et en levure ou des mutants du transport vésiculaire créent un stress à la membrane chez la levure *S.cerevisiae*. Ce stress à la membrane active différentes voies de transduction du signal conduisant à l'inhibition de la biogenèse du ribosome ainsi qu'à l'atténuation de l'initiation de la traduction. L'idée est que les cellules de levure (et peut être l'ensemble des cellules eucaryotiques) ont évolué ce système pour atténuer la traduction dans une situation où l'intégrité de la membrane cellulaire est compromise, ceci probablement de façon à éviter l'éclatement de la cellule (figure 69 d'après (Deloche et al., 2004)).

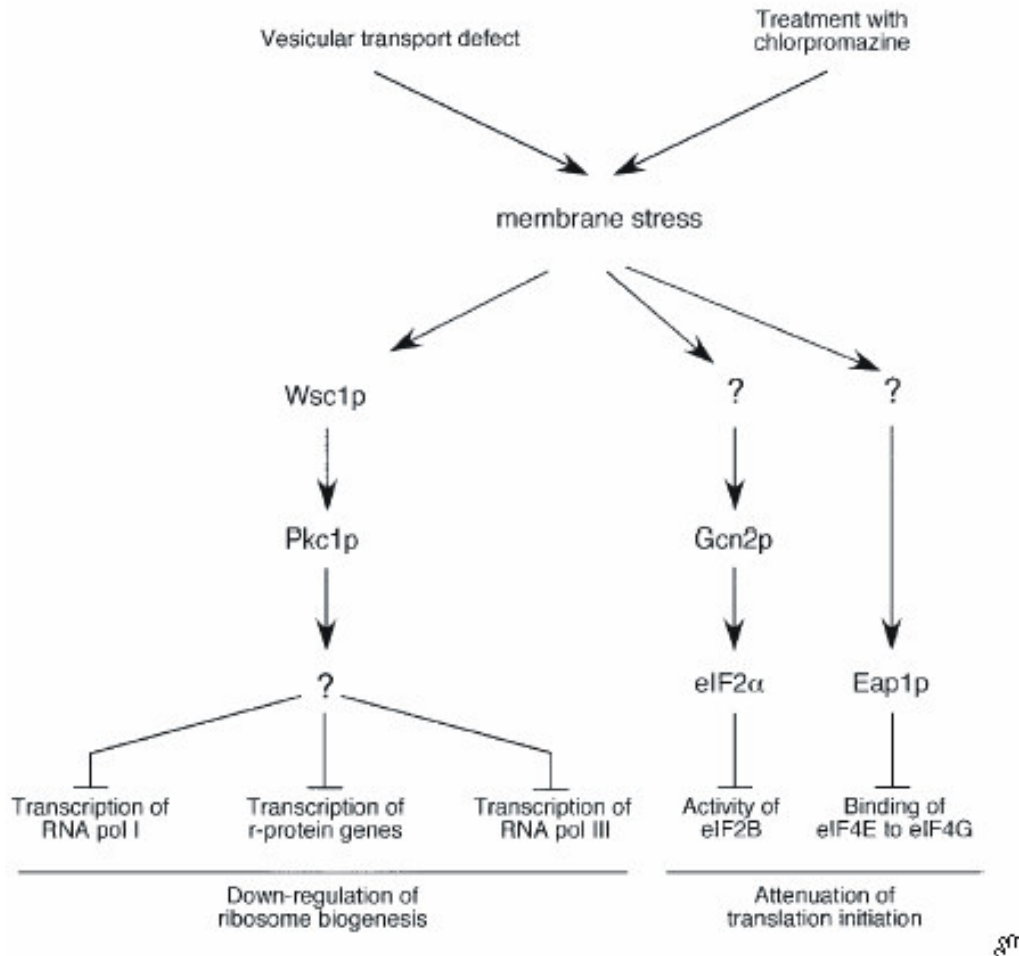


Figure 69 : Modèle proposé par Deloche et collaborateurs en 2004.

Nous avons émis l'hypothèse qu'il existerait un lien entre l'atténuation de la traduction et la cure des prions par la Chlorpromazine.

En d'autres termes, l'effet antiprion de la Chlorpromazine est-il dû à l'activation d'une ou plusieurs de ces voies de transduction du signal ?

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé deux expériences :

1. Utilisation d'une autre molécule qui induit un stress à la membrane : la BrefeldinA
2. Construction du mutant *pkc1 Δ*

I. Effet de la Brefeldin A sur la cure

La Brefeldin A (BFA) induit, comme la Chlorpromazine, un stress à la membrane. Nous avons testé l'activité antiprion potentielle de la Brefeldin A. Effectivement, dans notre test levure, un halo rouge apparaît autour de la pastille où a été déposée la Brefeldin A indiquant que la BFA, tout comme la Chlorpromazine, présente une activité contre le prion [*PSI+*] (figure 70).

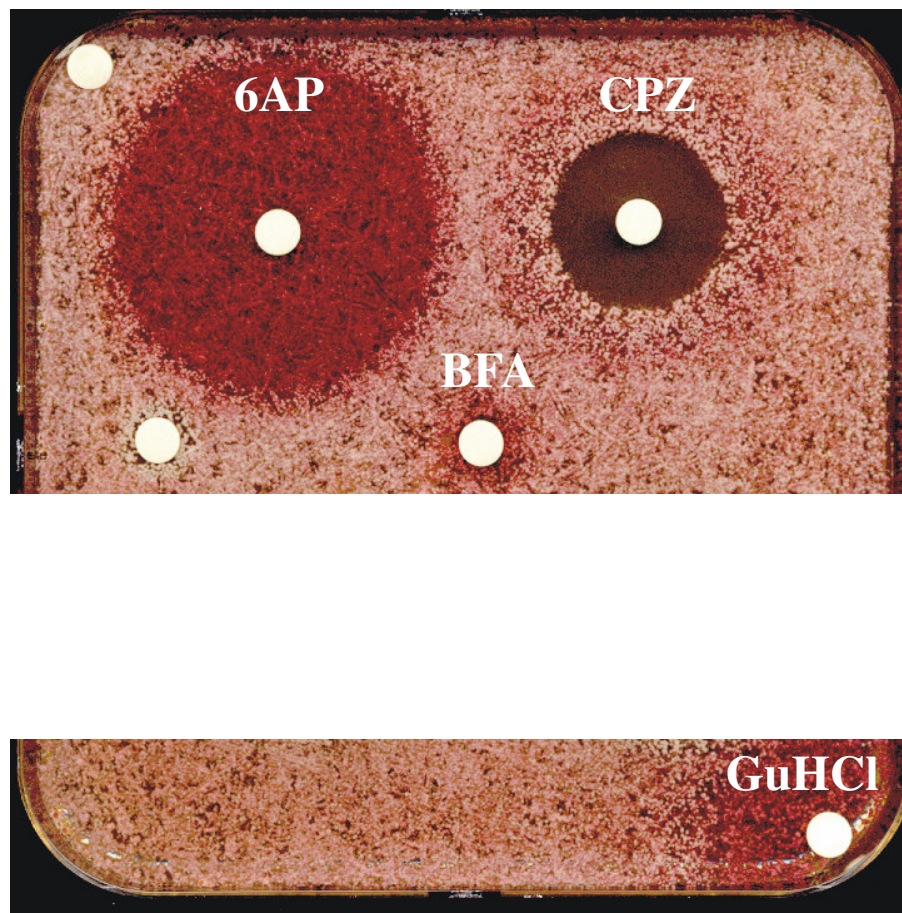


Figure 70 : La Brefeldin A (BFA) cure les prions de levure.

La Brefeldin A (BFA), molécule connue pour créer un stress à la membrane (en inhibant le transport vésiculaire) possède aussi une activité antiprion puisqu'un halo rouge apparaît autour de la pastille où elle a été déposée. Cependant la cure est moins importante qu'avec la 6AP ou la Chlorpromazine (CPZ).

Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle l'effet antiprion de la CPZ implique l'atténuation de la traduction en réponse à un stress membranaire.

II. Effet de la délétion de Pkc1p sur la cure par la Chlorpromazine

La deuxième piste était de déléter le gène *PKC1* : en effet, si le gène *PKC1* est délété, la Chlorpromazine ne pourra plus activer la voie conduisant à l'inhibition de la biogenèse du ribosome. Si un lien existe entre atténuation de la traduction et effet antiprion, nous ne devrions plus observer de cure par la Chlorpromazine dans ces conditions. La figure 71 montre parfaitement l'absence de halo rouge et donc de cure par la Chlorpromazine lorsque le gène *PKC1* est délété. Mais il est à noter que la cure par toutes les autres molécules (6AP, GA, Quinacrine) est aussi diminuée. Toutefois la toxicité de la CPZ est tout à fait similaire sur les deux souches.

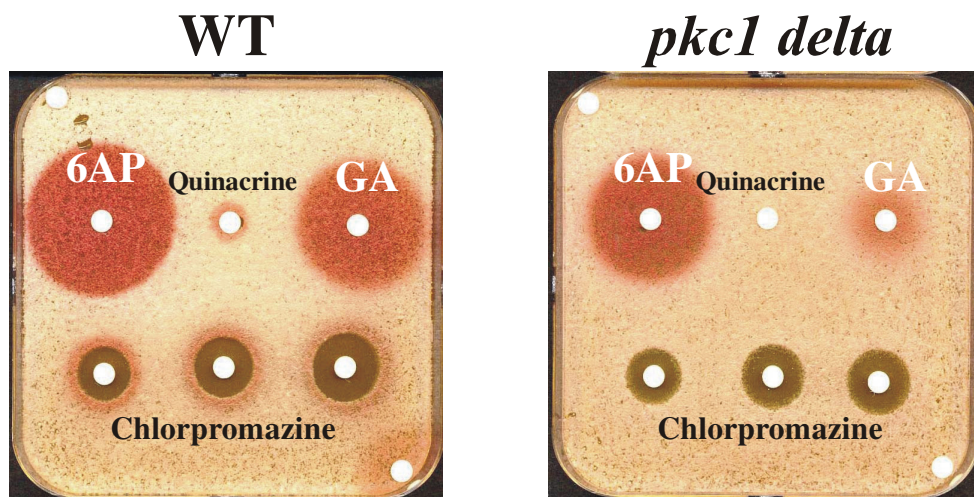


Figure 71 : Effet de la délétion de *PKC1* sur la cure par la Chlorpromazine. Sur le panneau de gauche, les drogues antiprion dont la Chlorpromazine inhibent bien les prions de levure. Par contre, la simple délétion de *PKC1* empêche la cure des prions de levure par la Chlorpromazine (panneau de droite).

III. Modèle final

A partir de nos résultats, nous pouvons tenter de proposer un modèle :

- 1- L'effet antiprion de la Chlorpromazine et de la Brefeldin A passerait sans doute par un stress à la membrane pour activer des voies inhibant la traduction.
- 2- La Quinacrine, une autre molécule antiprion isolée dans un crible mammifère et également active dans le test levure est connue pour interagir physiquement avec les ARNr et pour

perturber la structure générale du ribosome ainsi que pour inhiber la traduction (Ciak et al., 1967).

3- Nos résultats présentés dans l'article 5 de ce manuscrit suggèrent que la 6AP et le GA agissent également directement au niveau des ribosomes, contrairement à la Chlorpromazine (figure 72).

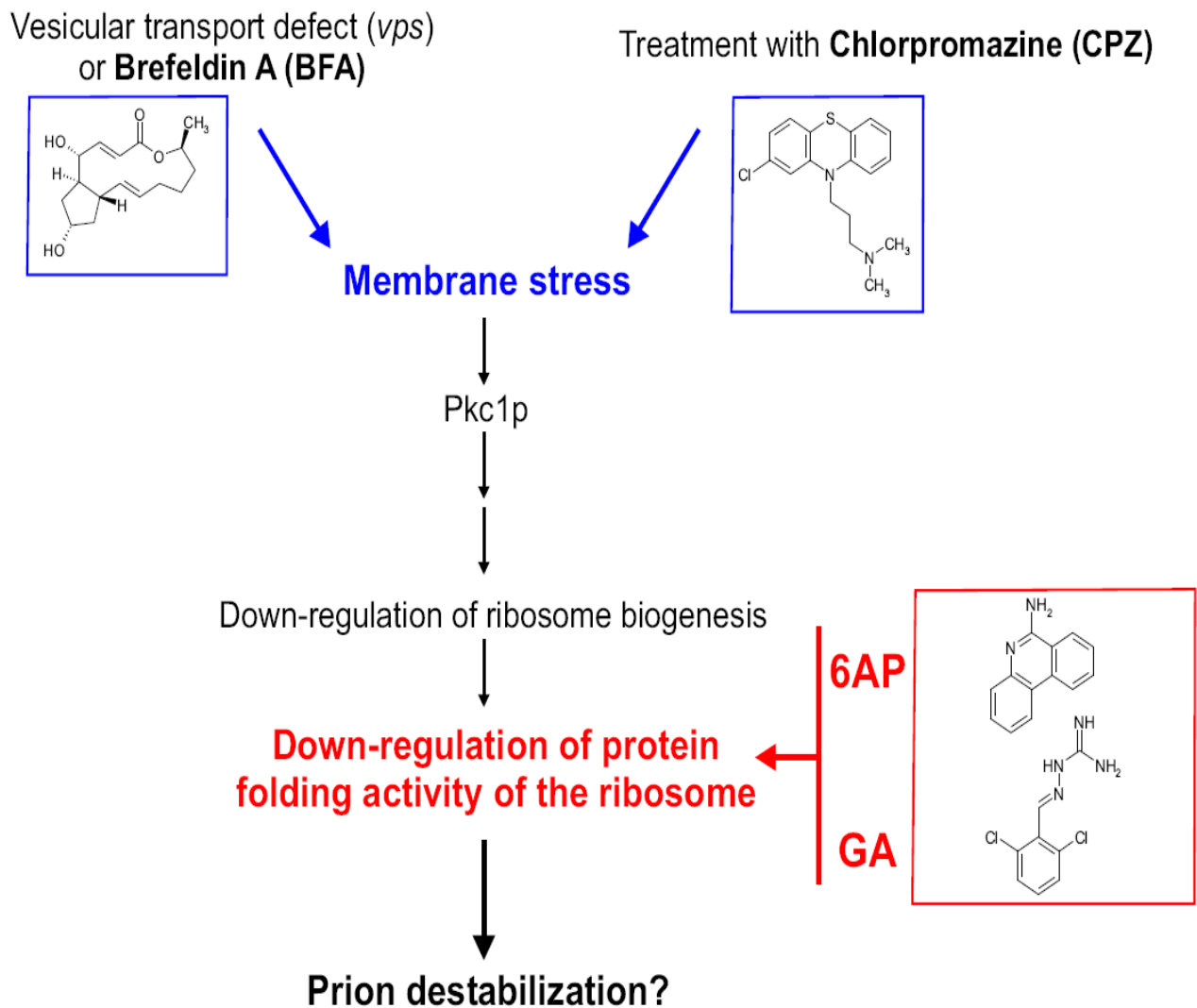


Figure 72 : Modèle proposé issu de l'article 5

CONCLUSION

E. Conclusion et Modèle

I. Conclusion

Au cours de cette thèse, nous sommes « tombés » sur des résultats inattendus et potentiellement importants.

En effet nous sommes partis d'une méthode de criblage en levure dans le but d'identifier des molécules à activité antiprion. Quelques unes ont pu être isolées ; ces dernières se sont également avérées actives contre les prions de mammifères.

L'objectif était ensuite de revenir à la recherche fondamentale afin d'élucider les mécanismes d'apparition et de maintien des prions. Pour cela deux approches ont été utilisées : l'une biochimique et l'autre génétique.

Les deux approches ont révélé que deux types de chaperons de protéines étaient impliqués : les membres de la famille des Hsp70p et le grand ARNr. En effet par deux cribles génétiques différents, nous avons mis en évidence que les chaperons de protéines de la famille des Hsp70p ainsi que les protéines ribosomales étaient reliés à l'effet antiprion de la 6AP. Nous avons tenté d'étudier plus en détail la voie des chaperons de protéines Hsp mais leur rôle exact reste difficile à décrypter du fait des effets contradictoires observés. Par contre, avec l'approche biochimique, nous avons pu approfondir la piste des protéines ribosomales et montrer que nos drogues ciblaient spécifiquement le grand ARN ribosomal et qu'elles inhibaient son activité de repliement des protéines sans affecter son activité dans la traduction. Ainsi en partant de deux molécules antiprion (la 6AP et le GA), isolées à partir d'un crible en levure, nous avons isolé leurs cibles. L'utilisation de dérivés de structures chimiques proches de la 6AP et du GA mais inactifs comme antiprions, tant chez la levure qu'en cellules mammifères montre la spécificité de nos résultats.

II. Modèle

A partir de nos résultats, nous proposons un modèle (figure 73) : Certaines protéines, ayant une tendance naturelle à s'agréger (par exemple : les protéines prion), sont « chaperonnées » en cours et après la traduction, notamment par le ribosome et peuvent ensuite :

- ✚ soit être prises en charge par d'autres protéines chaperons comme les Hsp70p assurant ainsi le repliement correct (natif) de la protéine (voie 1).
- ✚ soit s'agréger et produire des fibres amyloïdes (voie 3) dans des conditions le favorisant.

Ainsi, selon notre modèle, si la 6AP et le GA inhibent certains mécanismes de « chaperoning » co-traductionnel (ou post-traductionnel) du ribosome, la forme non-native sera mal conformée et sera dirigée vers le protéasome empêchant la formation des prions (voie orange sur la figure 73).

Une façon de tester notre modèle et de regarder quelles sont les conséquences de l'inhibition du protéasome 26S. Selon notre modèle, une inhibition du protéasome devrait compéter/antagoniser la cure par les drogues antiprion (voie bleue sur la figure 73). La figure 74 montre qu'en présence de MG 132, un inhibiteur du protéasome, la cure par la 6AP et le GA est effectivement antagonisée. Ceci est à rapprocher du rôle des Hsp70p dans l'effet antiprion de la 6AP : la forme « fermée » (ADP) d'Hsp70p favorise l'effet antiprion de la 6AP. La 6AP, en inhibant certaines activités de chaperon, celle du ribosome par exemple, conduirait les protéines pour qui ce « chaperoning » est crucial (car ayant tendance naturellement à s'agréger) vers la voie de contrôle qualité, impliquant Hsp70p, ubiquitine et protéasome. Ceci expliquerait pourquoi l'activité d'Hsp70p et celle du protéasome sont impliquées dans l'activité antiprion de la 6AP et du GA.

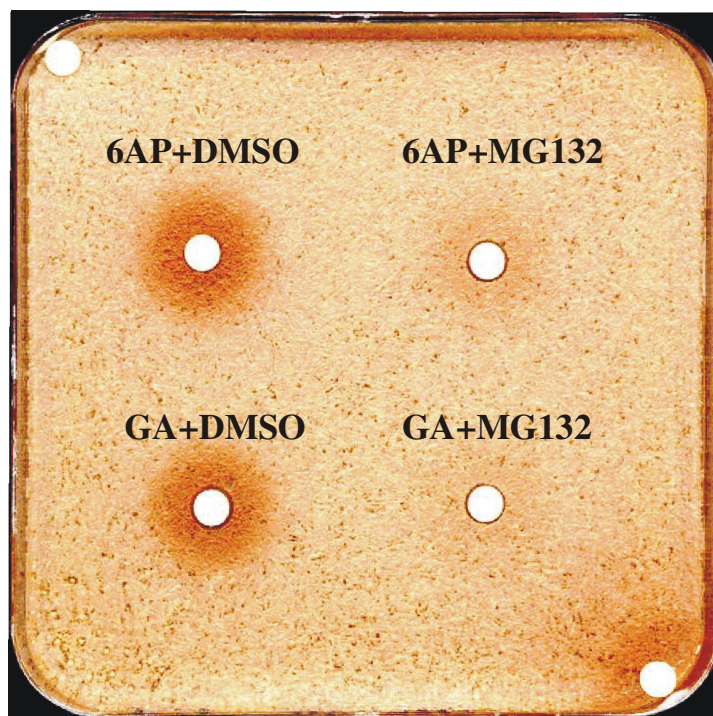


Figure 74 : MG 132 inhibe la cure du prion [PSI^+] par la 6AP et le GA.

Sur les pastilles de gauche, les drogues antiprion 6AP ou GA ainsi que du DMSO ont été déposés : un halo rouge apparaît indiquant la cure du prion [PSI^+]. Sur les pastilles de droite, la 6AP ou le GA ainsi que le MG 132, inhibiteur du protéasome ont été déposés: le halo rouge est nettement réduit, le MG 132 inhibe la cure du prion par la 6AP et le GA.

DISCUSSION/ PERSPECTIVES

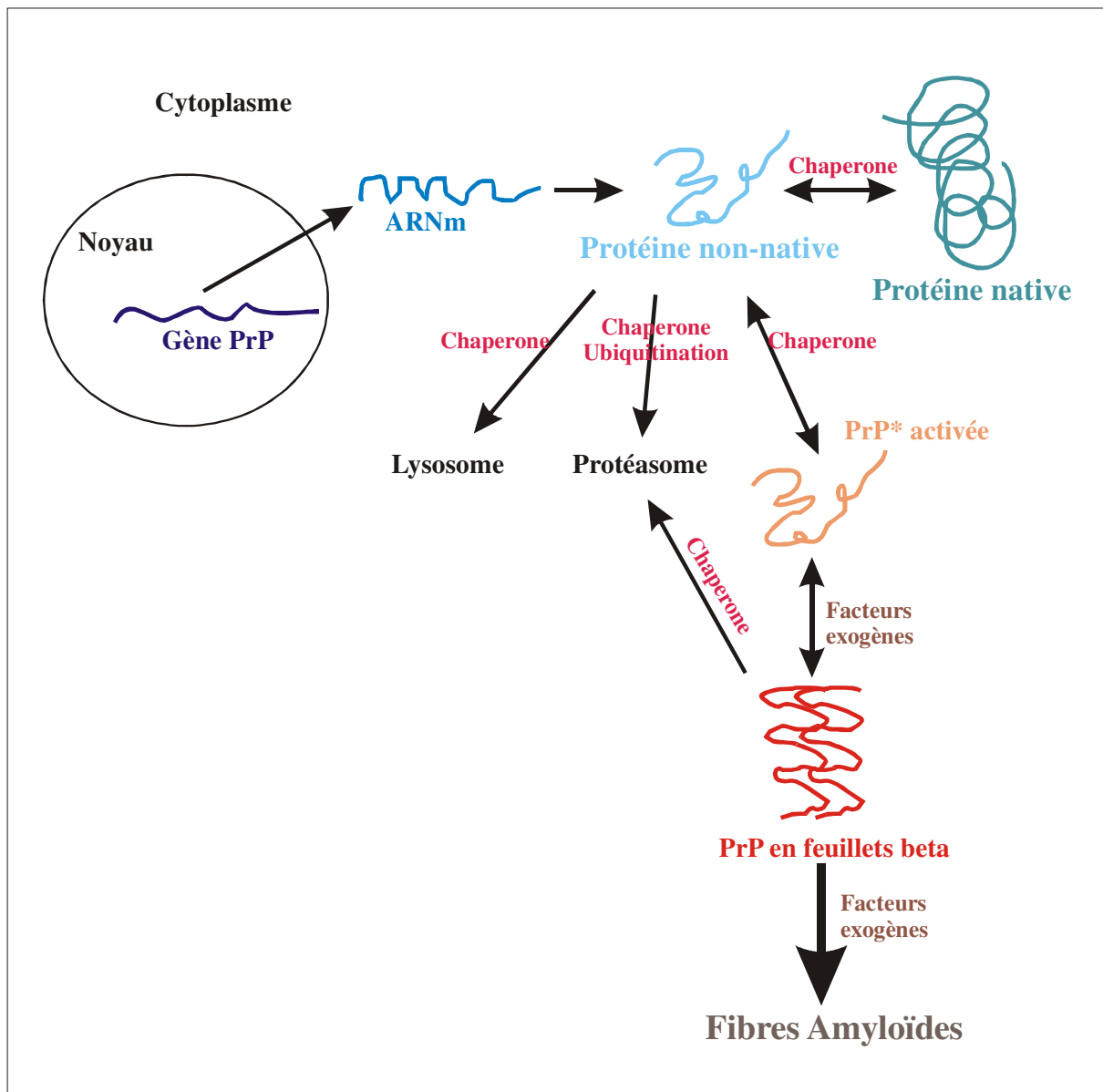


Figure 75 : L'héritité cytoplasmique basée sur des protéines à conformation en feuillets β .

PrP représente le gène codant pour la protéine prion PrP. PrP peut adopter une conformation riche en feuillets β et résistante aux protéases avec l'assistance de chaperones et sous l'influence de facteurs exogènes. L'information spécifique, stockée dans ces protéines riches en feuillets β peut s'auto-perpétuer et peut aussi être transmise aux générations suivantes de cellules de façon indépendante des gènes.

F. Discussion générale

I. Prion : Bouleversement des dogmes

Aujourd'hui, avec l'apparition des maladies à prions et la découverte des deux formes de la protéine PrP, deux dogmes centraux de la biologie moléculaire ont été bouleversés :

1. Le gène est la **seule** unité de stockage et de transmission de l'information génétique.
2. Une protéine se replie d'une façon **unique** afin d'avoir la conformation la plus favorable énergétiquement, conformation uniquement dictée par la séquence primaire (Anfinsen, 1973).

Nous allons étayer la remise en cause de ces deux dogmes de la biologie :

1. Le dogme selon lequel les acides nucléiques sont les seuls médiateurs de l'information héréditaire est clairement remis en cause par le modèle « protéine seule » proposé pour les prions. Dans le cadre de cette hypothèse, nous avons vu que les prions sont des protéines infectieuses : le changement de conformation de la protéine (donc la modification de son activité et donc en définitive le phénotype résultant) est autocatalytique et ne dépend pas d'un changement au niveau du gène. Les protéines sont donc, aussi capables de stocker et transmettre une information sans passer par le gène. L'information est ainsi stockée dans des protéines riches en feuillets β de conformation prion, créant une mémoire moléculaire cytoplasmique à long terme (Maury, 2006) (figure 75). Cette mémoire à long terme, due à l'extraordinaire résistance aux protéases de ces protéines riches en feuillets β , peut être transmise aux prochaines générations cellulaires indépendamment de l'ADN. Cette hérédité non nucléaire a été abondamment documentée chez la levure et pourrait, en fait, représenter une ancienne forme de l'hérédité hautement conservée au cours de l'évolution.

De façon intéressante, certains polymorphismes dans le gène de la protéine prion sont associés à de meilleures performances concernant la mémoire à long terme (Papassotiropoulos et al., 2005).

En outre, la présence de cette mémoire non nucléaire pourrait aussi expliquer les problèmes rencontrés lors du clonage. En effet, le principe est de transférer le noyau d'une cellule donneuse dans un ovocyte énucléé receveur. Nous savons que l'efficacité du clonage est faible, due à divers problèmes qui ne sont pas encore connus. Nous pouvons émettre l'hypothèse que lors du clonage, la mémoire basée sur

la conformation de protéine et localisée dans le cytoplasme de la cellule donneuse est perdue. Si cette mémoire est importante, cela peut contribuer à expliquer la faible efficacité du clonage.

L'autre question qui peut-être soulevée et sur laquelle nous reviendrons plus tard concerne les macromolécules à l'origine de la vie : acides nucléiques ou protéines ?

2. Une protéine donnée peut exister sous deux formes distinctes menant à deux phénotypes différents sans toucher au gène. Ce mécanisme inattendu et novateur, soulève la question de la régulation de l'expression des protéines ; celle-ci peut-être augmentée, diminuée ou encore inhibée suivant que la protéine est sous forme agrégée ou non. Ce point est fondamental car il pose le problème de l'avantage bénéfique des protéines se comportant comme des prions, puisqu'en effet, dans certains cas l'agrégation de la protéine mènera à la pathologie, l'exemple concret est la maladie de Creutzfeldt-Jacob mais dans d'autres cas elle favorisera l'organisme dans lequel la protéine se trouve ; les exemples sont nombreux : la protéine CPEB chez l'aplysie, sous forme agrégée augmente l'expression d'ARNm dormants impliqués dans la mémoire à long terme, la protéine Curli chez la bactérie, sous forme agrégée favorise l'adhésion au substrat.

Le cas de la maladie de Creutzfeldt-Jacob n'a-t-il pas permis de lever un coin du voile sur un mécanisme qui existe probablement depuis très longtemps dans l'évolution et qui est sans doute beaucoup plus répandu qu'initialement anticipés!!

En outre, la conservation des protéines prions au cours de l'évolution pose la question de l'origine biologique des prions : permettent-ils un avantage sélectif ou bien au contraire représentent-ils des accidents évolutifs ?

II. Prion : Origine de la vie

Revenons à la question fondamentale de l'origine de la vie. Au début de la vie, les cellules vivantes devaient synthétiser de l'ADN mais pour cela les enzymes (soit des protéines) étaient nécessaires, de même, pour synthétiser les protéines, les acides nucléiques étaient indispensables!!! C'est un peu le problème de qui est venue en premier : l'œuf ou la poule ? Aujourd'hui, de nombreux scientifiques considèrent que la molécule d'ARN est probablement

à l'origine de la vie. Cette hypothèse « ARN », est supportée par le fait que comme l'ADN, l'ARN est capable de stocker, transmettre et dupliquer l'information génétique mais qu'en plus, il agit comme un ribozyme, une enzyme faite d'acide ribonucléique. Elle peut donc effectuer les fonctions des acides nucléiques et des protéines. On pourrait penser que le problème est résolu : Les ARN sont à l'origine de la vie mais, l'autre problème est que dans le monde d'aujourd'hui, les molécules d'ARN sont très fragiles et nous savons que les conditions présentes dans le monde prébiotique étaient très hostiles. Il paraît donc peu plausible que les ARN soient à l'origine de la vie. Les protéines sont aussi sensibles mais beaucoup moins que l'ARN et nous savons maintenant que les protéines se comportant comme des prions sont très résistantes aux protéases et autres traitements drastiques et qu'en plus, tous les prions ne sont pas forcément dangereux (nous pouvons citer l'exemple d'HET-S qui adopte la forme prion pour une sélection positive de l'évolution). Ainsi selon Yury Chernoff, les structures assemblées comme des prions pourraient être impliquées dans les étapes initiales de la compartimentalisation biologique à l'origine de la vie (Chernoff, 2004). Au cours de l'évolution, ces mécanismes basés sur les protéines « prion » auraient pu disparaître au profit des mécanismes basés sur l'ARN/ADN, et l'existence des prions n'est reconnue aujourd'hui que comme une modulation épigénétique chez les champignons et une maladie létale chez les mammifères. Peut-être que les prions représentent la réminiscence d'un très ancien mode de transmission de l'information génétique, peut être aussi répandu à l'origine que le mode de transmission *via* les acides nucléiques de nos jours (Lupi et al., 2006).

III. Prion : Questions sans réponses

Si nous revenons au cas des maladies à prions, beaucoup de questions restent partiellement ou totalement sans réponse. Nous pouvons en citer quelques unes : Quelle est la nature physique du prion ? Quelle est la structure tridimensionnelle du prion ? Quel est le mécanisme de conversion de PrP^C en PrP^{Sc} ? Quelle est l'identité et l'action cellulaire de la protéine PrP neurotoxique ? Quelles sont les mécanismes biochimiques à la base des souches de prion ? Pourquoi est-ce que différentes souches provoquent des lésions différentes avec des zones touchées du cerveau aussi différentes ? Quels sont les facteurs déterminants les phénomènes de barrière d'espèce ? Quels sont les facteurs de susceptibilité de l'hôte qui favorisent l'infection ? Pourquoi les TSE sont transmissibles ? Quels sont les mécanismes moléculaires

de prionisation ? Quelle est la fonction physiologique de PrP^C ? Quel est le rôle des prions dans l'évolution et dans les autres processus biologiques ?

Répondre à ces questions permettrait de développer des diagnostics précoces ainsi que des thérapies. Il existe actuellement quelques embryons de réponses : l'agent causant les maladies à prions est la protéine PrP qui peut exister sous deux formes, une forme non pathologique PrP^C et une forme pathologique PrP^{Sc}. La conversion d'une forme à l'autre impliquerait certainement différents facteurs cellulaires puisque *in vitro* la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} est très lente mais si un homogénat de cerveau infecté est ajouté, la conversion est beaucoup plus rapide. Ces facteurs seraient des chaperons de protéines tels que les Hsp ou l'ARN ribosomal lui-même qui dans un contexte favorable à la formation de fibres amyloïdes favoriseraient la transconversion de PrP^C en PrP^{Sc} et/ou l'agrégation de PrP^{Sc}. Ces facteurs seraient spécifiques de l'hôte, expliquant en parti les phénomènes de souche et de barrière d'espèce. La séquence du domaine prion (riche en Q (glutamine), N (asparagine), R (arginine) et qui forme le cœur de la fibre) serait très importante dans les phénomènes de barrière d'espèce (Chien and Weissman, 2001; Chien et al., 2004). Les différentes glycosylations possibles pourraient expliquer les différentes zones touchées du cerveau selon les souches (DeArmond et al., 1997). Et pour ce qui est de la toxicité, les travaux récents de Bruce Chesebro semblent montrer que l'ancre GPI est indispensable à la toxicité du prion.

Ainsi, de nombreux efforts restent à faire pour tenter de découvrir les différentes faces cachées de ces protéines prion.

IV. Prion : Utilité de la levure

La recherche sur le prion a énormément avancé au cours de ces 25 dernières années. Aujourd'hui la théorie « protein-only » est communément acceptée et l'utilisation des prions de levures montre la généralité du phénomène prion et permet de nouvelles approches expérimentales. En effet, pour aller plus loin dans la compréhension de tous les mécanismes impliqués, il est indispensable de développer de nouveaux modèles et outils. La levure est clairement un des bons modèles les plus appropriés. Il faut se rappeler que la levure est à l'origine de nombreuses découvertes telles que le concept 1 gène-1 enzyme par Beadle et Tatum dans les années 1940, l'hérédité non mendélienne qui a permis la découverte du génome mitochondrial et depuis que Wickner, en 1994, a ouvert le monde des prions à la

levure, le voile s'est en parti levé sur les mécanismes et concepts, les réseaux de prions, le rôle des amyloïdes dans la propagation, la notion de souches et encore bien d'autres choses encore. Par ailleurs, non seulement la levure est un excellent modèle pour le crible de molécules antiprion mais elle permet aussi de réaliser des cribles inverses afin de mieux comprendre les mécanismes de prionisation (voir les articles 4 et 5 de ce manuscrit). Le développement de ces techniques ouvrira de nouvelles perspectives et favorisera la compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies à prions, mais aussi dans les autres maladies neurodégénératives. Nous pouvons même aller plus loin en incluant les maladies à mauvais repliements de protéines telles que certaines formes de mucoviscidose, le diabète de type II et bien d'autres. Les perspectives sont donc nombreuses.

Une certaine logique de travail en trois étapes doit être respectée pour identifier de manière claire et définitive les cibles intracellulaires des drogues. **1-** Tout d'abord, il faut identifier les acteurs cellulaires interagissant avec les drogues antiprion étudiées. **2-** Il faut ensuite déterminer si cette interaction a un effet sur la cible : d'inhibition ou d'activation. En effet, une interaction physique ne signifie pas automatiquement un effet sur l'activité de la cible. **3-** Enfin, il reste à lier cet effet sur la cible à l'effet antiprion. En effet, ces drogues antiprion peuvent très bien interagir avec et inactiver une enzyme, par exemple, sans que cela ne soit relié à l'effet antiprion.

V. Prion : Apports de cette thèse

Au cours de cette thèse nous avons isolé essentiellement deux molécules qui se sont avérées actives contre les prions de levure mais aussi contre les prions de mammifère *ex vivo* et *in vivo*. En revenant à la recherche fondamentale, nous avons montré que ces drogues ciblaient spécifiquement la fonction chaperone du ribosome, sans toucher à la fonction de traduction. Ce résultat est important à deux niveaux. Premièrement, nous avons identifié une cible potentielle impliquée dans les mécanismes de prionisation. Deuxièmement, il n'existe actuellement aucun inhibiteur spécifique de la fonction chaperone du ribosome. Les seuls qui existent inhibent aussi la fonction de traduction du ribosome, ce qui engendre fatalement des gros dégâts dans la cellule puisque cela inhibe complètement la synthèse des protéines. Ainsi, la découverte de ces petites molécules inhibitrices de la fonction chaperone du ribosome ouvre la voie vers une compréhension de cette fonction très mal connue du ribosome mais aussi d'un point de vue thérapeutique elles peuvent constituer des pistes thérapeutiques prometteuses et nouvelles pour le traitement de maladies à mauvais repliements de protéines.

VI. Prion : Champs d'investigations présents et futurs pour la recherche sur les prions

De nombreux champs d'études méritent d'être explorés pour avancer encore plus loin dans la connaissance des maladies à prions et de façon plus large, des maladies du mauvais repliement de protéines :

- ✚ Un point très important dans la régulation des maladies neurodégénératives concerne le cuivre. Il a été montré que le cuivre était impliqué aussi bien dans les maladies à prions que dans la maladie d'Alzheimer. En effet la protéine PrP et le peptide amyloïde β possèdent des séquences communes permettant la liaison du cuivre (Barnham et al., 2006). Cette liaison favoriserait l'agrégation des protéines mais nous savons aussi que la liaison du cuivre permet l'internalisation de la protéine PrP pour réguler l'homéostasie du cuivre et séquestrer la protéine à l'intérieur de la cellule afin d'empêcher son interaction avec PrP^{Sc} qui favoriserait son agrégation. Le rôle du cuivre est donc complexe, et mérite amplement d'être exploré car cela ouvrirait la porte vers d'éventuelles thérapies contre plusieurs maladies à fibres amyloïdes.
- ✚ L'étude des fibres amyloïdes est aussi un domaine très important. Selon Chris Dobson, toute protéine a la capacité de former des fibres amyloïdes sous certaines conditions. Mais tout amyloïde n'est pas forcément un prion (exemple : la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington...) et tout prion (protéine infectieuse) n'est pas forcément un amyloïde (par exemple, la prion [C]). Qu'est-ce qui distingue les prions d'autres protéines mal repliées ? La question est encore non résolue mais il semble que des interactions entre les chaînes principales favoriseraient le passage de l'état mal replié à l'état prion et la probabilité qu'une protéine amyloïde devienne un prion dépendrait de son interaction avec des chaperons de protéines. Peu de choses sont connues sur le rôle des chaperons de protéines de mammifères dans les mécanismes de prionisation : ce devrait être un domaine important dans le futur. En effet les chaperons de protéines sont importants pour la transmission du prion (*via* la fragmentation) mais aussi pour la propagation comme le montre les résultats d'études *in vitro* dans lesquelles, lorsque l'on rajoute ces chaperons à une préparation de PrP^C et PrP^{Sc} seuls, la conversion est accélérée (Deleault et al., 2003).

Les amyloïdes qui sont des agrégats riches en feuillets β ont reçu une grande attention avec l'émergence des maladies du mauvais repliement de protéines telles que les maladies neurodégénératives ou encore les amyloïdoses systémiques mais elles peuvent avoir d'autres fonctions qui ne sont pas forcément mauvaises comme nous avons pu déjà le constater.

- ✚ Une étude plus approfondie pourrait être aussi très intéressante à mener pour tenter de percer un peu plus les mystères des prions. Nous savons que Ure2p et Sup35p ont un domaine riche en Q/N contrairement à PrP et HET-s, Sup35p et PrP ont des répétitions d'octapeptides, et la composition en acides aminés est plus importante que la séquence elle-même. Peut-être des caractéristiques communes à tous les prions restent à découvrir et leur caractérisation permettrait de trouver d'autres prions. En effet, il est à peu près certain qu'il reste encore à découvrir de nombreuses protéines se comportant comme des prions.

Il se peut aussi que de nombreuses personnes possèdent la forme prion dans une forme « latente » et que dans quelques années la maladie se déclarera. Ceci pose le problème des populations vieillissantes où les systèmes de réparation de protéines sont moins performants. Le risque de développer ce type de maladies augmente clairement avec l'âge. La situation est très préoccupante ! Nous devons agir et avancer dans la compréhension de ces maladies.

- ✚ Une autre idée d'étude : nous avons pu voir que [PIN⁺] interagit positivement avec [PSI⁺] mais que [URE3] interagit négativement avec [PSI⁺] et que [PSI⁺] interagit négativement avec [URE3]. Les mécanismes moléculaires de ces interactions négatives ne sont pas encore connus mais la découverte de ces réseaux de prions dans lesquels différentes protéines amyloïdes sont en interaction est fascinant d'un point de vue fondamental mais pourrait aussi être très relevant pour la compréhension de maladies humaines.

- ✚ Enfin, récemment, le groupe de Claudio Soto a mis en évidence un cercle vicieux où PrP^{Sc} induit un stress dans le RE qui lui-même augmente la réplication du prion (Hetz et al., 2007). L'altération de l'homéostasie du RE influence le repliement de PrP, formant un intermédiaire plus propice à la conversion en PrP^{Sc}. Ainsi, le RE n'a pas seulement un rôle dans la synthèse et la maturation de PrP mais est aussi impliqué

dans la toxicité de PrP et dans la formation des protéines mal repliées associées à de nombreuses maladies. En effet, le rôle du RE dans d'autres maladies neurodégénératives telles que PD, ALS, HD et AD a été montré (Schroder and Kaufman, 2005). Cette voie de recherche sur l'implication du RE pourrait donc aussi ouvrir des portes vers de nouvelles thérapies.

Ainsi, de nombreux champs d'études restent à explorer pour comprendre en intégralité ces phénomènes curieux et fascinants que sont les prions, pouvant déboucher soit vers la maladie soit vers la régulation d'expression d'une protéine.

C'est donc pour cela que je tiens à continuer dans ce domaine si exaltant et plein de promesses en termes de découvertes. Je continuerais donc mon cursus scientifique dans le laboratoire du Dr Bruce Chesebro aux « *Rocky Mountain Laboratories (RML)* » à Hamilton dans le Montana, aux Etats-Unis.

BIBLIOGRAPHIE

G. Bibliographie

- Adjou, K.T., Simoneau, S., Sales, N., Lamoury, F., Dormont, D., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Deslys, J.P. and Lasmezas, C.I. (2003) A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol*, **84**, 2595-2603.
- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kascsak, R., Rubenstein, R. and Grossman, A. (2003) Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *J Mol Biol*, **332**, 47-57.
- Aigle, M. and Lacroute, F. (1975) Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet*, **136**, 327-335.
- Allen, K.D., Chernova, T.A., Tennant, E.P., Wilkinson, K.D. and Chernoff, Y.O. (2007) Effects of ubiquitin system alterations on the formation and loss of a yeast prion. *J Biol Chem*, **282**, 3004-3013.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A. and Clarke, M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J.L. and Laude, H. (2004) Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol*, **78**, 482-490.
- Arnold, J.E., Tipler, C., Laszlo, L., Hope, J., Landon, M. and Mayer, R.J. (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol*, **176**, 403-411.
- Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G.P., Meeker, H.C., Kascsak, R., Carp, R.I. and Wisniewski, T. (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, **108**, 703-708.
- Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C. and Blondel, M. (2003) Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*, **21**, 1075-1081.
- Bach, S., Tribouillard, D., Talarek, N., Desban, N., Gug, F., Galons, H. and Blondel, M. (2006) A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods*, **39**, 72-77.
- Bagriantsev, S. and Liebman, S. (2006) Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol*, **4**, 32.
- Bai, M., Zhou, J.M. and Perrett, S. (2004) The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms. *J Biol Chem*, **279**, 50025-50030.
- Bailleul, P.A., Newnam, G.P., Steenbergen, J.N. and Chernoff, Y.O. (1999) Genetic study of interactions between the cytoskeletal assembly protein sla1 and prion-forming domain of the release factor Sup35 (eRF3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **153**, 81-94.
- Barnham, K.J., Cappai, R., Beyreuther, K., Masters, C.L. and Hill, A.F. (2006) Delineating common molecular mechanisms in Alzheimer's and prion diseases. *Trends Biochem Sci*.
- Barnhart, M.M. and Chapman, M.R. (2006) Curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol*.
- Baron, G.S., Wehrly, K., Dorward, D.W., Chesebro, B. and Caughey, B. (2002) Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *Embo J*, **21**, 1031-1040.
- Basu, U., Southron, J.L., Stephens, J.L. and Taylor, G.J. (2004) Reverse genetic analysis of the glutathione metabolic pathway suggests a novel role of PHGPX and URE2 genes

- in aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, **271**, 627-637.
- Bate, C., Rutherford, S., Gravenor, M., Reid, S. and Williams, A. (2002) Cyclo-oxygenase inhibitors protect against prion-induced neurotoxicity in vitro. *Neuroreport*, **13**, 1933-1938.
- Baxa, U., Speransky, V., Steven, A.C. and Wickner, R.B. (2002) Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5253-5260.
- Beekes, M. and McBride, P.A. (2007) The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *Febs J*, **274**, 588-605.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-1555.
- Benkemoun, L., Sabate, R., Malato, L., Reis, S.D., Dalstra, H., Saupe, S.J. and Maddelein, M.L. (2006) Methods for the in vivo and in vitro analysis of [Het-s] prion infectivity. *Methods*, **39**, 61-67.
- Ben-Zaken, O., Tzaban, S., Tal, Y., Horonchik, L., Esko, J.D., Vlodaysky, I. and Taraboulos, A. (2003) Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. *J Biol Chem*, **278**, 40041-40049.
- Bera, A.K., Das, B., Chattopadhyay, S. and Dasgupta, C. (1994) Refolding of denatured restriction endonucleases with ribosomal preparations from *Methanosarcina barkeri*. *Biochem Mol Biol Int*, **32**, 315-323.
- Beringue, V., Adjou, K.T., Lamoury, F., Maignien, T., Deslys, J.P., Race, R. and Dormont, D. (2000) Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol*, **74**, 5432-5440.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, **68**, 729-777.
- Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.T. and Caughey, B. (1995) Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature*, **375**, 698-700.
- Birrell, G.W., Giaever, G., Chu, A.M., Davis, R.W. and Brown, J.M. (2001) A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12608-12613.
- Blanquaert, F., Saffar, J.L., Colombier, M.L., Carpentier, G., Barritault, D. and Caruelle, J.P. (1995) Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone*, **17**, 499-506.
- Blondel, M., Bach, S., Bamps, S., Dobbelaere, J., Wiget, P., Longaretti, C., Barral, Y., Meijer, L. and Peter, M. (2005) Degradation of Hof1 by SCF(Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *Embo J*, **24**, 1440-1452.
- Blondel, M., Galan, J.M., Chi, Y., Lafourcade, C., Longaretti, C., Deshaies, R.J. and Peter, M. (2000) Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. *Embo J*, **19**, 6085-6097.
- Bockman, J.M., Prusiner, S.B., Tateishi, J. and Kingsbury, D.T. (1987) Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins: host species-specific epitopes. *Ann Neurol*, **21**, 589-595.
- Bosque, P.J. and Prusiner, S.B. (2000) Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol*, **74**, 4377-4386.
- Bottger, E.C. (2006) The ribosome as a drug target. *Trends Biotechnol.*
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G. and LeBlanc, A. (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 39145-39149.

- Bousset, L., Belrhali, H., Melki, R. and Morera, S. (2001) Crystal structures of the yeast prion Ure2p functional region in complex with glutathione and related compounds. *Biochemistry*, **40**, 13564-13573.
- Brachmann, A., Toombs, J.A. and Ross, E.D. (2006) Reporter assay systems for [URE3] detection and analysis. *Methods*, **39**, 35-42.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, **379**, 339-343.
- Brown, D.R. and Besinger, A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J*, **334 (Pt 2)**, 423-429.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687.
- Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J. and Jones, I.M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*, **344 Pt 1**, 1-5.
- Bruce, M.E. (1993) Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, **49**, 822-838.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M. and Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582.
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994) High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, **1**, 19-30.
- Butler, D.A., Scott, M.R., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T. and Prusiner, S.B. (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol*, **62**, 1558-1564.
- Capellari, S., Zaidi, S.I., Long, A.C., Kwon, E.E. and Petersen, R.B. (2000) The Thr183Ala Mutation, Not the Loss of the First Glycosylation Site, Alters the Physical Properties of the Prion Protein. *J Alzheimers Dis*, **2**, 27-35.
- Capellari, S., Zaidi, S.I., Urig, C.B., Perry, G., Smith, M.A. and Petersen, R.B. (1999) Prion protein glycosylation is sensitive to redox change. *J Biol Chem*, **274**, 34846-34850.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S. and Caramelli, M. (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3065-3070.
- Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R.J., Bolton, D.C. and Bendheim, P.E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, **61**, 185-192.
- Caspi, S., Halimi, M., Yanai, A., Sasson, S.B., Taraboulos, A. and Gabizon, R. (1998) The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem*, **273**, 3484-3489.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. and Soto, C. (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, **121**, 195-206.
- Caughey, B. (2001) Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem Sci*, **26**, 235-242.
- Caughey, B., Caughey, W.S., Kocisko, D.A., Lee, K.S., Silveira, J.R. and Morrey, J.D. (2006) Prions and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) chemotherapeutics: A common mechanism for anti-TSE compounds? *Acc Chem Res*, **39**, 646-653.
- Caughey, B. and Race, R.E. (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem*, **59**, 768-771.

- Caughey, B. and Raymond, G.J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*, **266**, 18217-18223.
- Caughey, B. and Raymond, G.J. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, **67**, 643-650.
- Caughey, B., Raymond, G.J. and Bessen, R.A. (1998a) Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem*, **273**, 32230-32235.
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F. and Caughey, W.S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **30**, 7672-7680.
- Caughey, W.S., Raymond, L.D., Horiuchi, M. and Caughey, B. (1998b) Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12117-12122.
- Chabry, J., Caughey, B. and Chesebro, B. (1998) Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem*, **273**, 13203-13207.
- Chacinska, A., Szczesniak, B., Kochneva-Pervukhova, N.V., Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D. and Boguta, M. (2001) Ssb1 chaperone is a [PSI⁺] prion-curing factor. *Curr Genet*, **39**, 62-67.
- Chan, T.F., Carvalho, J., Riles, L. and Zheng, X.F. (2000) A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13227-13232.
- Chandler, R.L. (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, **1**, 1378-1379.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. and Hultgren, S.J. (2002) Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, **295**, 851-855.
- Chattopadhyay, S., Das, B., Bera, A.K., Dasgupta, D. and Dasgupta, C. (1994) Refolding of denatured lactate dehydrogenase by Escherichia coli ribosomes. *Biochem J*, **300** (Pt 3), 717-721.
- Chattopadhyay, S., Das, B. and Dasgupta, C. (1996) Reactivation of denatured proteins by 23S ribosomal RNA: role of domain V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8284-8287.
- Chattopadhyay, S., Pal, S., Pal, D., Sarkar, D., Chandra, S. and Das Gupta, C. (1999) Protein folding in Escherichia coli: role of 23S ribosomal RNA. *Biochim Biophys Acta*, **1429**, 293-298.
- Chernoff, Y.O. (2004) Amyloidogenic domains, prions and structural inheritance: rudiments of early life or recent acquisition? *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 665-671.
- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S.W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science*, **268**, 880-884.
- Chernoff, Y.O., Newnam, G.P., Kumar, J., Allen, K. and Zink, A.D. (1999) Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone ssb in formation, stability, and toxicity of the [PSI] prion. *Mol Cell Biol*, **19**, 8103-8112.
- Chesebro, B. (1998) BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*, **279**, 42-43.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M. and et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
- 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. (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, **308**, 1435-1439.

- Chiarini, L.B., Freitas, A.R., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R. and Linden, R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J*, **21**, 3317-3326.
- Chien, P. and Weissman, J.S. (2001) Conformational diversity in a yeast prion dictates its seeding specificity. *Nature*, **410**, 223-227.
- Chien, P., Weissman, J.S. and DePace, A.H. (2004) Emerging Principles of Conformation-Based Prion Inheritance. *Annu Rev Biochem*, **73**, 617-656.
- Chiesa, R. and Harris, D.A. (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis*, **8**, 743-763.
- Choi, C.J., Kanthasamy, A., Anantharam, V. and Kanthasamy, A.G. (2006) Interaction of metals with prion protein: Possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. *Neurotoxicology*.
- Choi, J.H., Lou, W. and Vancura, A. (1998) A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 29915-29922.
- Clarke, M.C. and Haig, D.A. (1970) Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture. *Nature*, **225**, 100-101.
- Cohen, F.E. and Kelly, J.W. (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature*, **426**, 905-909.
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J. and Prusiner, S.B. (1994) Structural clues to prion replication. *Science*, **264**, 530-531.
- Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 519-550.
- Collinge, J. (2005) Molecular neurology of prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **76**, 906-919.
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J. and Hill, A.F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, **383**, 685-690.
- Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D.J. and Alpers, M.P. (2006) Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet*, **367**, 2068-2074.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. and Jefferys, J.G. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297.
- Collins, S.J., Lewis, V., Brazier, M., Hill, A.F., Fletcher, A. and Masters, C.L. (2002) Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol*, **52**, 503-506.
- Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M.A., Brentani, R.R., Foguel, D. and Silva, J.L. (2001) DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem*, **276**, 49400-49409.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. and Begueret, J. (1997) The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9773-9778.
- Coustou-Linares, V., Maddelein, M.L., Begueret, J. and Saupe, S.J. (2001) In vivo aggregation of the HET-s prion protein of the fungus *Podospora anserina*. *Mol Microbiol*, **42**, 1325-1335.
- Couzin, J. (2002) Molecular biology. In yeast, prions' killer image doesn't apply. *Science*, **297**, 758-761.
- Cox, B.S. (1971) A recessive lethal super-suppressor mutation in yeast and other psi phenomena. *Heredity*, **26**, 211-232.
- Craig, E.A. and Jacobsen, K. (1984) Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell*, **38**, 841-849.

- Das, B., Chattopadhyay, S., Bera, A.K. and Dasgupta, C. (1996) In vitro protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA. *Eur J Biochem*, **235**, 613-621.
- Das, B., Chattopadhyay, S. and Das Gupta, C. (1992) Reactivation of denatured fungal glucose 6-phosphate dehydrogenase and *E. coli* alkaline phosphatase with *E. coli* ribosome. *Biochem Biophys Res Commun*, **183**, 774-780.
- Daude, N., Marella, M. and Chabry, J. (2003) Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci*, **116**, 2775-2779.
- DeArmond, S.J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Daggett, V., Camerino, A.P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Scott, M.R., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1997) Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron*, **19**, 1337-1348.
- DeBurman, S.K., Raymond, G.J., Caughey, B. and Lindquist, S. (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13938-13943.
- Deleault, N.R., Lucassen, R.W. and Supattapone, S. (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, **425**, 717-720.
- Deloche, O., de la Cruz, J., Kressler, D., Doere, M. and Linder, P. (2004) A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **13**, 357-366.
- Demaimay, R., Adjou, K.T., Beringue, V., Demart, S., Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Seman, M. and Dormont, D. (1997) Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol*, **71**, 9685-9689.
- Demaimay, R., Chesebro, B. and Caughey, B. (2000) Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red and other Congo Red analogs. *Arch Virol Suppl*, 277-283.
- DeMarco, M.L. and Daggett, V. (2005) Local environmental effects on the structure of the prion protein. *C R Biol*, **328**, 847-862.
- DePace, A.H., Santoso, A., Hillner, P. and Weissman, J.S. (1998) A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion. *Cell*, **93**, 1241-1252.
- DePace, A.H. and Weissman, J.S. (2002) Origins and kinetic consequences of diversity in Sup35 yeast prion fibers. *Nat Struct Biol*, **9**, 389-396.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Hong, J.Y. and Liebman, S.W. (2001) Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)]. *Cell*, **106**, 171-182.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., Chernoff, Y.O. and Liebman, S.W. (1997) Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**, 507-519.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P. and Liebman, S.W. (1999) The PNM2 mutation in the prion protein domain of SUP35 has distinct effects on different variants of the [PSI⁺] prion in yeast. *Curr Genet*, **35**, 59-67.
- Derkatch, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S.W. (1996) Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **144**, 1375-1386.
- Dickinson, A.G. and Outram, G.W. (1988) Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp*, **135**, 63-83.
- Diringer, H. (1991) Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) virus-induced amyloidoses of the central nervous system (CNS). *Eur J Epidemiol*, **7**, 562-566.
- Diringer, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M. and Ironside, J.W. (1997) Highly infectious purified preparations of disease-specific

- amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology*, **40**, 238-246.
- Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci*, **24**, 329-332.
- Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*, **426**, 884-890.
- Doh-Ura, K., Iwaki, T. and Caughey, B. (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol*, **74**, 4894-4897.
- Dollinger, S., Lober, S., Klingenstein, R., Korth, C. and Gmeiner, P. (2006) A Chimeric Ligand Approach Leading to Potent Antiprion Active Acridine Derivatives: Design, Synthesis, and Biological Investigations. *J Med Chem*, **49**, 6591-6595.
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13452-13457.
- Dormont, D., Delpech, B., Delpech, A., Courcel, M.N., Viret, J., Markovits, P. and Court, L. (1981) [Hyperproduction of glial fibrillary acidic protein (GFA) during development of experimental scrapie in mice]. *C R Seances Acad Sci III*, **293**, 53-56.
- Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Begueret, J. and Saupe, S.J. (2002) The HET-s prion protein of the filamentous fungus *Podospora anserina* aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. *J Biol Chem*, **277**, 5703-5706.
- Driscaldi, B., Stewart, R.S., Adles, C., Stewart, L.R., Quaglio, E., Biasini, E., Fioriti, L., Chiesa, R. and Harris, D.A. (2003) Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol Chem*, **278**, 21732-21743.
- Dworkin, J.P., Lazcano, A. and Miller, S.L. (2003) The roads to and from the RNA world. *J Theor Biol*, **222**, 127-134.
- Eaglestone, S.S., Cox, B.S. and Tuite, M.F. (1999) Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *Embo J*, **18**, 1974-1981.
- Ehlers, B. and Diringler, H. (1984) Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol*, **65 (Pt 8)**, 1325-1330.
- Enari, M., Flechsig, E. and Weissmann, C. (2001) Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9295-9299.
- Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., Codogno, P., Kellermann, O. and Botti, J. (2003) Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie*, **85**, 33-45.
- Farquhar, C.F. and Dickinson, A.G. (1986) Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol*, **67 (Pt 3)**, 463-473.
- Ferreiro, E., Resende, R., Costa, R., Oliveira, C.R. and Pereira, C.M. (2006) An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity. *Neurobiol Dis*.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J*, **15**, 1255-1264.
- Ford, M.J., Burton, L.J., Li, H., Graham, C.H., Frobert, Y., Grassi, J., Hall, S.M. and Morris, R.J. (2002) A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience*, **111**, 533-551.

- Forloni, G. (1996) Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides. *Curr Opin Neurol*, **9**, 492-500.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. and Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **362**, 543-546.
- Fournier, J.G., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T. and Robain, O. (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III*, **318**, 339-344.
- Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, **70**, 603-647.
- Gabus, C., Derrington, E., Leblanc, P., Chnaiderman, J., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W.K., Marc, D., Nandi, P. and Darlix, J.L. (2001) The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem*, **276**, 19301-19309.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. and Alpers, M. (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**, 794-796.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Jr. and Alpers, M. (1967) Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science*, **155**, 212-214.
- Gambetti, P., Parchi, P. and Chen, S.G. (2003) Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clin Lab Med*, **23**, 43-64.
- Ganusova, E.E., Ozolins, L.N., Bhagat, S., Newnam, G.P., Wegrzyn, R.D., Sherman, M.Y. and Chernoff, Y.O. (2006) Modulation of prion formation, aggregation, and toxicity by the actin cytoskeleton in yeast. *Mol Cell Biol*, **26**, 617-629.
- Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J*, **20**, 5863-5875.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Gianni, L., Bellotti, V., Gianni, A.M. and Merlini, G. (1995) New drug therapy of amyloidoses: resorption of AL-type deposits with 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Blood*, **86**, 855-861.
- Gibbs, C.J., Jr., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M. and Matthews, W.B. (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, **161**, 388-389.
- Gilch, S., Kehler, C. and Schatzl, H.M. (2005) The prion protein requires cholesterol for cell surface localization. *Mol Cell Neurosci*.
- Gilch, S., Winklhofer, K.F., Groschup, M.H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J. and Schatzl, H.M. (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *Embo J*, **20**, 3957-3966.

- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M. and Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell*, **15**, 5383-5398.
- Glatzel, M., Abela, E., Maissen, M. and Aguzzi, A. (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, **349**, 1812-1820.
- Glover, J.R., Kowal, A.S., Schirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell*, **89**, 811-819.
- Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, **94**, 73-82.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Goldberg, A.L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **426**, 895-899.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8342-8347.
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R. and Brentani, R.R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res*, **76**, 85-92.
- Griffith, J.S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044.
- Hadlow, W.J. (1959) Myopathies of livestock. *Lab Invest*, **8**, 1478-1498.
- Hara, H., Nakayashiki, T., Crist, C.G. and Nakamura, Y. (2003) Prion domain interaction responsible for species discrimination in yeast [PSI⁺] transmission. *Genes Cells*, **8**, 925-939.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D.R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A. and et al. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*, **274**, 1-13.
- Hardesty, B. and Kramer, G. (2001) Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **66**, 41-66.
- Harris, D.A. (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull*, **66**, 71-85.
- Harris, D.A., Huber, M.T., van Dijken, P., Shyng, S.L., Chait, B.T. and Wang, R. (1993) Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry*, **32**, 1009-1016.
- Harris, D.A. and True, H.L. (2006) New insights into prion structure and toxicity. *Neuron*, **50**, 353-357.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-1858.
- Hauw, J.J., Lazarini, F., Sazdovitch, V., Seilhean, D., Suarez, S., Colle, M.A., Boularand, S., Delasnerie-Laupretre, N. and Duyckaerts, C. (1998) [Diseases transmitted by non-conventional agents ("prions"): nosology and diagnosis]. *Rev Neurol (Paris)*, **154**, 131-137.
- Hauw, J.J., Sazdovitch, V., Laplanche, J.L., Peoc'h, K., Kopp, N., Kemeny, J., Privat, N., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J.P., Deslys, J.P., Dormont, D. and Alperovitch, A. (2000) Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology*, **54**, 1641-1646.

- Hegde, R.S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R. (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature*, **402**, 822-826.
- Heppner, F.L., Prinz, M. and Aguzzi, A. (2001) Pathogenesis of prion diseases: possible implications of microglial cells. *Prog Brain Res*, **132**, 737-750.
- Hermann, T. (2005) Drugs targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 355-366.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hetz, C., Castilla, J. and Soto, C. (2007) Perturbation of endoplasmic reticulum homeostasis facilitates prion replication. *J Biol Chem*.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. and Soto, C. (2003) Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *Embo J*, **22**, 5435-5445.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J. and Lantos, P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-450, 526.
- Hill, A.F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P.L. and Collinge, J. (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10248-10253.
- Holscher, C., Delius, H. and Burkler, A. (1998) Overexpression of nonconvertible PrP^c delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol*, **72**, 1153-1159.
- Horiuchi, M. and Caughey, B. (1999) Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure*, **7**, R231-240.
- Hortells, P., Monzon, M., Monleon, E., Acin, C., Vargas, A., Bolea, R., Lujan, L. and Badiola, J.J. (2006) Pathological findings in retina and visual pathways associated to natural Scrapie in sheep. *Brain Res*.
- Huang, F.P., Farquhar, C.F., Mabbott, N.A., Bruce, M.E. and MacPherson, G.G. (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*, **83**, 267-271.
- Huang, Z., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E. (1996) Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*, **207**, 49-67.
- Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J*, **20**, 5876-5886.
- Hunter, C.L., Lloyd, E., Eltis, L.D., Rafferty, S.P., Lee, H., Smith, M. and Mauk, A.G. (1997) Role of the heme propionates in the interaction of heme with apomyoglobin and apocytochrome b5. *Biochemistry*, **36**, 1010-1017.
- Ivanova, L., Barmada, S., Kummer, T. and Harris, D.A. (2001) Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **276**, 42409-42421.
- Jahn, T.R. and Radford, S.E. (2005) The Yin and Yang of protein folding. *Febs J*, **272**, 5962-5970.
- 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. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10086-10091.
- Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, **73**, 1055-1058.

- Jensen, M.A., True, H.L., Chernoff, Y.O. and Lindquist, S. (2001) Molecular population genetics and evolution of a prion-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **159**, 527-535.
- Jiang, Y., Li, H., Zhu, L., Zhou, J.M. and Perrett, S. (2004) Amyloid nucleation and hierarchical assembly of Ure2p fibrils. Role of asparagine/glutamine repeat and nonrepeat regions of the prion domains. *J Biol Chem*, **279**, 3361-3369.
- Jones, G., Song, Y., Chung, S. and Masison, D.C. (2004) Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] prion is impaired by factors that regulate Hsp70 substrate binding. *Mol Cell Biol*, **24**, 3928-3937.
- Jones, G.W. and Masison, D.C. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect [PSI⁺] prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of [PSI⁺]. *Genetics*, **163**, 495-506.
- Jones, G.W. and Tuite, M.F. (2005) Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays*, **27**, 823-832.
- Kajava, A.V., Baxa, U., Wickner, R.B. and Steven, A.C. (2004) A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7885-7890.
- Kaneko, K., Wille, H., Mehlhorn, I., Zhang, H., Ball, H., Cohen, F.E., Baldwin, M.A. and Prusiner, S.B. (1997) Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. *J Mol Biol*, **270**, 574-586.
- Kellings, K., Prusiner, S.B. and Riesner, D. (1994) Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **343**, 425-430.
- King, C.Y. and Diaz-Avalos, R. (2004) Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*, **428**, 319-323.
- Kishimoto, A., Hasegawa, K., Suzuki, H., Taguchi, H., Namba, K. and Yoshida, M. (2004) beta-Helix is a likely core structure of yeast prion Sup35 amyloid fibers. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 739-745.
- Klingenstein, R., Lober, S., Kujala, P., Godsave, S., Leliveld, S.R., Gmeiner, P., Peters, P.J. and Korth, C. (2006) Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J Neurochem*.
- Kochneva-Pervukhova, N.V., Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Cox, B.S., Tuite, M.F. and Ter-Avanesyan, M.D. (1998) Mechanism of inhibition of Psi⁺ prion determinant propagation by a mutation of the N-terminus of the yeast Sup35 protein. *Embo J*, **17**, 5805-5810.
- Kocisko, D.A. and Caughey, B. (2006) Mefloquine, an antimalaria drug with antiprion activity in vitro, lacks activity in vivo. *J Virol*, **80**, 1044-1046.
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T. and Caughey, B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, **370**, 471-474.
- Kong, Q. (2006) RNAi: a novel strategy for the treatment of prion diseases. *J Clin Invest*, **116**, 3101-3103.
- Korth, C., Kaneko, K. and Prusiner, S.B. (2000) Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(Sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J Gen Virol*, **81**, 2555-2563.
- Korth, C., May, B.C., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9836-9841.

- Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. and Oesch, B. (1997) Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, **390**, 74-77.
- Kretzschmar, H. (2000) [Interesting not only as differential Alzheimer dementia diagnosis. Bovine spongiform encephalopathy and other prion diseases]. *MMW Fortschr Med*, **142**, 34-38.
- Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G. and Hardesty, B. (1997) Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins. *Fold Des*, **2**, 101-108.
- Kurschner, C. and Morgan, J.I. (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res*, **30**, 165-168.
- Kushnirov, V.V., Alexandrov, I.M., Mitkevich, O.V., Shkundina, I.S. and Ter-Avanesyan, M.D. (2006) Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. *Methods*, **39**, 50-55.
- Kushnirov, V.V. and Ter-Avanesyan, M.D. (1998) Structure and replication of yeast prions. *Cell*, **94**, 13-16.
- Lacroute, F. (1971) Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J Bacteriol*, **106**, 519-522.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J. and Dormont, D. (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, **275**, 402-405.
- Lee, K.S., Magalhaes, A.C., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R. and Prado, M.A. (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem*, **79**, 79-87.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.
- Lehmann, S. and Harris, D.A. (1997) Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J Biol Chem*, **272**, 21479-21487.
- Lian, H.Y., Zhang, H., Zhang, Z.R., Loovers, H.M., Jones, G.W., Rowling, P.J., Itzhaki, L.S., Zhou, J.M. and Perrett, S. (2007) Hsp40 interacts directly with the native state of the yeast prion protein Ure2 and inhibits formation of amyloid-like fibrils. *J Biol Chem*.
- Lima, L.M., Cordeiro, Y., Tinoco, L.W., Marques, A.F., Oliveira, C.L., Sampath, S., Kodali, R., Choi, G., Foguel, D., Torriani, I., Caughey, B. and Silva, J.L. (2006) Structural Insights into the Interaction between Prion Protein and Nucleic Acid. *Biochemistry*, **45**, 9180-9187.
- Liu, H., Krizek, J. and Bretscher, A. (1992) Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics*, **132**, 665-673.
- Liu, J.J. and Lindquist, S. (1999) Oligopeptide-repeat expansions modulate 'protein-only' inheritance in yeast. *Nature*, **400**, 573-576.
- Liu, J.J., Sondheimer, N. and Lindquist, S.L. (2002a) Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI⁺]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16446-16453.
- Liu, M., Yu, S., Yang, J., Yin, X. and Zhao, D. (2006) RNA and CuCl₂ induced conformational changes of the recombinant ovine prion protein. *Mol Cell Biochem*.
- Liu, T., Li, R., Pan, T., Liu, D., Petersen, R.B., Wong, B.S., Gambetti, P. and Sy, M.S. (2002b) Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, **277**, 47671-47678.
- Loovers, H.M., Guinan, E. and Jones, G.W. (2006) Importance of Hsp70 ATPase domain in yeast prion propagation. *Genetics*.

- Lopez, N., Aron, R. and Craig, E.A. (2003) Specificity of class II Hsp40 Sis1 in maintenance of yeast prion [RNQ+]. *Mol Biol Cell*, **14**, 1172-1181.
- Lundmark, K., Westermark, G.T., Nystrom, S., Murphy, C.L., Solomon, A. and Westermark, P. (2002) Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6979-6984.
- Lupi, O., Dadalti, P., Cruz, E. and Sanberg, P.R. (2006) Are prions related to the emergence of early life? *Med Hypotheses*, **67**, 1027-1033.
- Ma, J. and Lindquist, S. (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14955-14960.
- Ma, J., Wollmann, R. and Lindquist, S. (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*, **298**, 1781-1785.
- Mabbott, N.A., Mackay, F., Minns, F. and Bruce, M.E. (2000) Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, **6**, 719-720.
- Mabbott, N.A. and Macpherson, G.G. (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*.
- Maddelein, M.L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Couлары-Salin, B. and Saupe, S.J. (2002) Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7402-7407.
- Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R. (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *Embo J*, **18**, 6917-6926.
- Magalhaes, A.C., Silva, J.A., Lee, K.S., Martins, V.R., Prado, V.F., Ferguson, S.S., Gomez, M.V., Brentani, R.R. and Prado, M.A. (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem*, **277**, 33311-33318.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S. and Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871-874.
- Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G. and Collinge, J. (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo J*, **21**, 202-210.
- Mange, A., Nishida, N., Milhavel, O., McMahon, H.E., Casanova, D. and Lehmann, S. (2000) Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J Virol*, **74**, 3135-3140.
- Manuelidis, L., Fritch, W. and Zaitsev, I. (1998) Dapsone to delay symptoms in Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **352**, 456.
- Manuelidis, L., Sklaviadis, T. and Manuelidis, E.E. (1987) Evidence suggesting that PrP is not the infectious agent in Creutzfeldt-Jakob disease. *Embo J*, **6**, 341-347.
- Marella, M. and Chabry, J. (2004) Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci*, **24**, 620-627.
- Marella, M., Lehmann, S., Grassi, J. and Chabry, J. (2002) Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem*, **277**, 25457-25464.
- Martins, V.R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., de Souza, S.J., Mercadante, A.F., Veiga, S.S., Zanata, S.M., Neto, V.M. and Brentani, R.R. (1997) Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med*, **3**, 1376-1382.
- Masison, D.C. and Wickner, R.B. (1995) Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science*, **270**, 93-95.
- Mattson, M.P. (1997) Advances fuel Alzheimer's conundrum. *Nat Genet*, **17**, 254-256.

- Maury, C.P. (2006) Molecular mechanism based on self-replicating protein conformation for the inheritance of acquired information in humans. *Med Hypotheses*, **67**, 1164-1169.
- May, B.C., Govaerts, C. and Cohen, F.E. (2006) Developing therapeutics for the diseases of protein misfolding. *Neurology*, **66**, S118-122.
- May, B.C., Zorn, J.A., Witkop, J., Sherrill, J., Wallace, A.C., Legname, G., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E. (2007) Structure-activity relationship study of prion inhibition by 2-aminopyridine-3,5-dicarbonitrile-based compounds: parallel synthesis, bioactivity, and in vitro pharmacokinetics. *J Med Chem*, **50**, 65-73.
- Mayer, M.P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T. and Bukau, B. (2000) Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol*, **7**, 586-593.
- Meddahi, A., Bree, F., Papy-Garcia, D., Gautron, J., Barritault, D. and Caruelle, J.P. (2002) Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J Biomed Mater Res*, **62**, 525-531.
- Meyer, R.K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A. and Vandevelde, M. (2000) A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP. *J Biol Chem*, **275**, 38081-38087.
- Meyer, R.K., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Braunfeld, M.B., Barry, R.A. and Prusiner, S.B. (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2310-2314.
- Michelitsch, M.D. and Weissman, J.S. (2000) A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11910-11915.
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N. and Suroolia, A. (2006) N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci*.
- Miura, T., Hori-i, A. and Takeuchi, H. (1996) Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett*, **396**, 248-252.
- Monaco, S., Zanusso, G., Mazzucco, S. and Rizzuto, N. (2006) Cerebral amyloidoses: molecular pathways and therapeutic challenges. *Curr Med Chem*, **13**, 1903-1913.
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M.A., Mackay, F., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, **288**, 1257-1259.
- Moore, R.A., Herzog, C., Errett, J., Kocisko, D.A., Arnold, K.M., Hayes, S.F. and Priola, S.A. (2006) Octapeptide repeat insertions increase the rate of protease-resistant prion protein formation. *Protein Sci*.
- Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E. and Westaway, D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*, **292**, 797-817.
- Moriyama, H., Edskes, H.K. and Wickner, R.B. (2000) [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol Cell Biol*, **20**, 8916-8922.
- Moscardini, M., Pistello, M., Bendinelli, M., Ficheux, D., Miller, J.T., Gabus, C., Le Grice, S.F., Surewicz, W.K. and Darlix, J.L. (2002) Functional interactions of nucleocapsid protein of feline immunodeficiency virus and cellular prion protein with the viral RNA. *J Mol Biol*, **318**, 149-159.

- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. and Kellermann, O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science*, **289**, 1925-1928.
- Muchowski, P.J., Ning, K., D'Souza-Schorey, C. and Fields, S. (2002) Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 727-732.
- Muller-Hellwig, S., Groschup, M.H., Pichner, R., Gareis, M., Martlbauer, E., Scherer, S. and Loessner, M.J. (2006) Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrP(sc) in hamster brain homogenates by foodborne bacteria. *Syst Appl Microbiol*, **29**, 165-171.
- Nakajima, M., Yamada, T., Kusuhara, T., Furukawa, H., Takahashi, M., Yamauchi, A. and Kataoka, Y. (2004) Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **17**, 158-163.
- Nandi, P.K., Leclerc, E., Nicole, J.C. and Takahashi, M. (2002) DNA-induced partial unfolding of prion protein leads to its polymerisation to amyloid. *J Mol Biol*, **322**, 153-161.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. and Taraboulos, A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem*, **272**, 6324-6331.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. and Craig, E.A. (1992) The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, **71**, 97-105.
- Ness, F., Ferreira, P., Cox, B.S. and Tuite, M.F. (2002) Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast. *Mol Cell Biol*, **22**, 5593-5605.
- Newnam, G.P., Wegrzyn, R.D., Lindquist, S.L. and Chernoff, Y.O. (1999) Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol Cell Biol*, **19**, 1325-1333.
- Nishida, N., Harris, D.A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavet, O. and Lehmann, S. (2000) Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol*, **74**, 320-325.
- Nitrini, R., Rosemberg, S., Passos-Bueno, M.R., da Silva, L.S., Iughetti, P., Papadopoulos, M., Carrilho, P.M., Caramelli, P., Albrecht, S., Zatz, M. and LeBlanc, A. (1997) Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann Neurol*, **42**, 138-146.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E. and et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746.
- Orlowska-Matuszewska, G. and Wawrzycka, D. (2006) A novel phenotype of eight spores asci in deletants of the prion-like Rnq1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 190-193.
- Osherovich, L.Z., Cox, B.S., Tuite, M.F. and Weissman, J.S. (2004) Dissection and design of yeast prions. *PLoS Biol*, **2**, E86.
- Ozel, M., Xi, Y.G., Baldauf, E., Diringer, H. and Pocchiari, M. (1994) Small virus-like structure in brains from cases of sporadic and familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **344**, 923-924.
- Paitel, E., Alves da Costa, C., Vilette, D., Grassi, J. and Checler, F. (2002) Overexpression of PrP^C triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem*, **83**, 1208-1214.

- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. and et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10962-10966.
- Pan, T., Colucci, M., Wong, B.S., Li, R., Liu, T., Petersen, R.B., Chen, S., Gambetti, P. and Sy, M.S. (2001) Novel differences between two human prion strains revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **276**, 37284-37288.
- Papassotiropoulos, A., Wollmer, M.A., Aguzzi, A., Hock, C., Nitsch, R.M. and de Quervain, D.J. (2005) The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet*, **14**, 2241-2246.
- Paramithiotis, E., Pinard, M., Lawton, T., LaBoissiere, S., Leathers, V.L., Zou, W.Q., Estey, L.A., Lamontagne, J., Lehto, M.T., Kondejewski, L.H., Francoeur, G.P., Papadopoulos, M., Haghghat, A., Spatz, S.J., Head, M., Will, R., Ironside, J., O'Rourke, K., Tonelli, Q., Ledebur, H.C., Chakrabarty, A. and Cashman, N.R. (2003) A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med*, **9**, 893-899.
- Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A. and Raeber, A.J. (2001) Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *J Biol Chem*, **276**, 44627-44632.
- Parkin, E.T., Watt, N.T., Turner, A.J. and Hooper, N.M. (2004) Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, **279**, 11170-11178.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, **372**, 475-478.
- Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R. and Lindquist, S. (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*, **273**, 622-626.
- Pauly, P.C. and Harris, D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*, **273**, 33107-33110.
- Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I.R., Legname, G., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R. and Prusiner, S.B. (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, **412**, 739-743.
- Perovic, S., Pergande, G., Ushijima, H., Kelve, M., Forrest, J. and Muller, W.E. (1995) Flupirtine partially prevents neuronal injury induced by prion protein fragment and lead acetate. *Neurodegeneration*, **4**, 369-374.
- Perrier, V., Solassol, J., Crozet, C., Frobert, Y., Mourton-Gilles, C., Grassi, J. and Lehmann, S. (2004) Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem*, **89**, 454-463.
- Perry, V.H., Cunningham, C. and Boche, D. (2002) Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol*, **15**, 349-354.
- Perutz, M.F., Finch, J.T., Berriman, J. and Lesk, A. (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5591-5595.
- Peters, P.J., Mironov, A., Jr., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S.J., Burton, D.R., Williamson, R.A., Vey, M. and Prusiner, S.B. (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol*, **162**, 703-717.
- Pfeifer, A., Eigenbrod, S., Al-Khadra, S., Hofmann, A., Mitteregger, G., Moser, M., Bertsch, U. and Kretzschmar, H. (2006) Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest*, **116**, 3204-3210.
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B.A., Lopez-Buesa, P., Walter, W.A., Wiedmann, M. and Craig, E.A. (1998) The molecular chaperone Ssb from

- Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J*, **17**, 3981-3989.
- Piccardo, P., Manson, J.C., King, D., Ghetti, B. and Barron, R.M. (2007) Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4712-4717.
- Pocchiari, M., Schmittinger, S. and Masullo, C. (1987) Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol*, **68 (Pt 1)**, 219-223.
- Podrabsky, J.E., Carpenter, J.F. and Hand, S.C. (2001) Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**, R123-131.
- Porter, D.D., Porter, H.G. and Cox, N.A. (1973) Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, **111**, 1407-1410.
- Priller, J., Prinz, M., Heikenwalder, M., Zeller, N., Schwarz, P., Heppner, F.L. and Aguzzi, A. (2006) Early and rapid engraftment of bone marrow-derived microglia in scrapie. *J Neurosci*, **26**, 11753-11762.
- Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M.A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K. and Aguzzi, A. (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 919-924.
- Priola, S.A., Raines, A. and Caughey, W. (2003) Prophylactic and therapeutic effects of phthalocyanine tetrasulfonate in scrapie-infected mice. *J Infect Dis*, **188**, 699-705.
- Priola, S.A., Raines, A. and Caughey, W.S. (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, **287**, 1503-1506.
- Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Winnacker, E.L. and Famulok, M. (2002) Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *ChemBiochem*, **3**, 717-725.
- Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science*, **252**, 1515-1522.
- Prusiner, S.B. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13363-13383.
- Prusiner, S.B. (2001) Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*, **344**, 1516-1526.
- Race, R. and Chesebro, B. (1998) Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature*, **392**, 770.
- Race, R., Oldstone, M. and Chesebro, B. (2000) Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*, **74**, 828-833.
- Race, R.E., Fadness, L.H. and Chesebro, B. (1987) Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*, **68 (Pt 5)**, 1391-1399.
- Raeber, A.J., Brandner, S., Klein, M.A., Benninger, Y., Musahl, C., Frigg, R., Roeckl, C., Fischer, M.B., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1998) Transgenic and knockout mice in research on prion diseases. *Brain Pathol*, **8**, 715-733.
- Rai, R., Tate, J.J. and Cooper, T.G. (2003) Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. *J Biol Chem*, **278**, 12826-12833.
- Raymond, G.J., Olsen, E.A., Lee, K.S., Raymond, L.D., Bryant, P.K., 3rd, Baron, G.S., Caughey, W.S., Kocisko, D.A., McHolland, L.E., Favara, C., Langeveld, J.P., van Zijderveld, F.G., Mayer, R.T., Miller, M.W., Williams, E.S. and Caughey, B. (2006) Inhibition of protease-resistant prion protein formation in a transformed deer cell line infected with chronic wasting disease. *J Virol*, **80**, 596-604.

- Rice, K., Peralta, R., Bast, D., de Azavedo, J. and McGavin, M.J. (2001) Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect Immun*, **69**, 159-169.
- Richardson, E.P., Jr. and Masters, C.L. (1995) The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. *Brain Pathol*, **5**, 33-41.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med*, **3**, 1383-1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, **382**, 180-182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*, **413**, 282-288.
- Riesner, D. (2003) Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull*, **66**, 21-33.
- Ritossa, P. (1962) [Problems of prophylactic vaccinations of infants.]. *Riv Ist Sieroter Ital*, **37**, 79-108.
- Ritter, C., Maddelein, M.L., Siemer, A.B., Luhrs, T., Ernst, M., Meier, B.H., Saupe, S.J. and Riek, R. (2005) Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature*, **435**, 844-848.
- Rizet, G. and Esser, K. (1953) [Phenomena of incompatibility between strains of different origins in *Podospora anserina*.]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, **237**, 760-761.
- Roberts, B.T., Moriyama, H. and Wickner, R.B. (2004) [URE3] prion propagation is abolished by a mutation of the primary cytosolic Hsp70 of budding yeast. *Yeast*, **21**, 107-117.
- Roberts, B.T. and Wickner, R.B. (2003) Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes Dev*, **17**, 2083-2087.
- Rohwer, R.G. (1991) The scrapie agent: "a virus by any other name". *Curr Top Microbiol Immunol*, **172**, 195-232.
- Ross, C.A. and Pickart, C.M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*, **14**, 703-711.
- Ross, E.D., Baxa, U. and Wickner, R.B. (2004) Scrambled prion domains form prions and amyloid. *Mol Cell Biol*, **24**, 7206-7213.
- Ross-Macdonald, P., Coelho, P.S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K.H., Sheehan, A., Symoniatis, D., Umansky, L., Heidtman, M., Nelson, F.K., Iwasaki, H., Hager, K., Gerstein, M., Miller, P., Roeder, G.S. and Snyder, M. (1999) Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*, **402**, 413-418.
- Roucou, X. and LeBlanc, A.C. (2005) Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J Mol Med*, **83**, 3-11.
- Rubenstein, R., Gray, P.C., Wehlburg, C.M., Wagner, J.S. and Tisone, G.C. (1998) Detection and discrimination of PrPSc by multi-spectral ultraviolet fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 100-106.
- Ryou, C., Legname, G., Peretz, D., Craig, J.C., Baldwin, M.A. and Prusiner, S.B. (2003) Differential inhibition of prion propagation by enantiomers of quinacrine. *Lab Invest*, **83**, 837-843.
- Saborio, G.P., Permanne, B. and Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813.

- Sabuncu, E., Petit, S., Le Dur, A., Lan Lai, T., Vilotte, J.L., Laude, H. and Vilette, D. (2003) PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells. *J Virol*, **77**, 2696-2700.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*, **4**, 1157-1165.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994) No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, **77**, 967-968.
- Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di Giamberardino, L. and Moya, K.L. (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci*, **10**, 2464-2471.
- Sanghera, N. and Pinheiro, T.J. (2002) Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J Mol Biol*, **315**, 1241-1256.
- Santoso, A., Chien, P., Osherovich, L.Z. and Weissman, J.S. (2000) Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell*, **100**, 277-288.
- Sanyal, S.C., Pal, S., Chowdhury, S. and DasGupta, C. (2002) 23S rRNA assisted folding of cytoplasmic malate dehydrogenase is distinctly different from its self-folding. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2390-2397.
- Saupe, S.J. (2000) Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 489-502.
- Schatzl, H.M., Laszlo, L., Holtzman, D.M., Tatzelt, J., DeArmond, S.J., Weiner, R.I., Mobley, W.C. and Prusiner, S.B. (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol*, **71**, 8821-8831.
- Scheibel, T. and Lindquist, S.L. (2001) The role of conformational flexibility in prion propagation and maintenance for Sup35p. *Nat Struct Biol*, **8**, 958-962.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, **400**, 173-177.
- Schiffer, N.W., Broadley, S.A., Hirschberger, T., Tavan, P., Kretzschmar, H.A., Giese, A., Haass, C., Hartl, U.F. and Schmid, B. (2006) Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model. *J Biol Chem*.
- Schlumpberger, M., Prusiner, S.B. and Herskowitz, I. (2001) Induction of distinct [URE3] yeast prion strains. *Mol Cell Biol*, **21**, 7035-7046.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M.A., Ball, H.L., Bradon, N., Bosque, P.J., Crossin, K.L., Edelman, G.M., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol*, **314**, 1209-1225.
- Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barritault, D. and Taraboulos, A. (2003) Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 473-479.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, **569**, 29-63.
- Schwartz, A.L. and Ciechanover, A. (1999) The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med*, **50**, 57-74.
- Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S. (2000) A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol*, **18**, 1257-1261.

- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J. and et al. (1989) Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, **59**, 847-857.
- Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15137-15142.
- Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F. and Lindquist, S.L. (2000) Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, **289**, 1317-1321.
- Serio, T.R. and Lindquist, S.L. (1999) [PSI⁺]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 661-703.
- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H. and Kretzschmar, H. (2002) Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet*, **360**, 229-230.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Shkundina, I.S., Kushnirov, V.V., Tuite, M.F. and Ter-Avanesyan, M.D. (2005) The Role of the N-Terminal Ologopeptide Repeats of the Yeast Sup35 Prion Protein in Propagation and Transmission of Prion Variants. *Genetics*.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*, **93**, 203-214.
- Shorter, J. and Lindquist, S. (2004) Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science*, **304**, 1793-1797.
- Shorter, J. and Lindquist, S. (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat Rev Genet*, **6**, 435-450.
- Shyng, S.L., Lehmann, S., Moulder, K.L. and Harris, D.A. (1995) Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem*, **270**, 30221-30229.
- Si, K., Giustetto, M., Etkin, A., Hsu, R., Janisiewicz, A.M., Miniaci, M.C., Kim, J.H., Zhu, H. and Kandel, E.R. (2003a) A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell*, **115**, 893-904.
- Si, K., Lindquist, S. and Kandel, E.R. (2003b) A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell*, **115**, 879-891.
- Silar, P., Haedens, V., Rossignol, M. and Lalucque, H. (1999) Propagation of a novel cytoplasmic, infectious and deleterious determinant is controlled by translational accuracy in *Podospira anserina*. *Genetics*, **151**, 87-95.
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F. and Caughey, B. (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature*, **437**, 257-261.
- Solfrosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, E., Gilden, D., Oldstone, M.B., Conti, B. and Williamson, R.A. (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*, **303**, 1514-1516.
- Sondheimer, N. and Lindquist, S. (2000) Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell*, **5**, 163-172.
- Sondheimer, N., Lopez, N., Craig, E.A. and Lindquist, S. (2001) The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ⁺] prion. *Embo J*, **20**, 2435-2442.

- Sparrer, H.E., Santoso, A., Szoka, F.C., Jr. and Weissman, J.S. (2000) Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI⁺] factor by in vitro- converted Sup35 protein. *Science*, **289**, 595-599.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. and Prusiner, S.B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, **51**, 229-240.
- Stefani, M. (2004) Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta*, **1739**, 5-25.
- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J. and Davis, R.W. (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*, **31**, 400-404.
- Stewart, R.S., Drisaldi, B. and Harris, D.A. (2001) A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell*, **12**, 881-889.
- Stone, D.E. and Craig, E.A. (1990) Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**, 1622-1632.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M.W. and Morris, R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J*, **22**, 3591-3601.
- Supattapone, S., Geoghegan, J.C. and Rees, J.R. (2006) On the horizon: a blood test for prions. *Trends Microbiol*, **14**, 149-151.
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Scott, M.R. (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol*, **75**, 3453-3461.
- Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., De Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O. and Salmona, M. (2000) Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol*, **300**, 1309-1322.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R. and Weissman, J.S. (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature*, **428**, 323-328.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. and Prusiner, S.B. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, **129**, 121-132.
- Taylor, K.L., Cheng, N., Williams, R.W., Steven, A.C. and Wickner, R.B. (1999) Prion domain initiation of amyloid formation in vitro from native Ure2p. *Science*, **283**, 1339-1343.
- Tenson, T. and Mankin, A. (2006) Antibiotics and the ribosome. *Mol Microbiol*, **59**, 1664-1677.
- Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Didichenko, S.A., Chernoff, Y.O., Inge-Vechtomov, S.G. and Smirnov, V.N. (1993) Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol Microbiol*, **7**, 683-692.
- Thual, C., Komar, A.A., Bousset, L., Fernandez-Bellot, E., Cullin, C. and Melki, R. (1999) Structural characterization of *Saccharomyces cerevisiae* prion-like protein Ure2. *J Biol Chem*, **274**, 13666-13674.
- Tilly, G., Chapuis, J., Vilette, D., Laude, H. and Vilotte, J.L. (2003) Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem Biophys Res Commun*, **305**, 548-551.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, **380**, 639-642.

- Tribouillard, D., Bach, S., Gug, F., Desban, N., Beringue, V., Andrieu, T., Dormont, D., Galons, H., Laude, H., Vilette, D. and Blondel, M. (2006) Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnol J*, **1**, 58-67.
- True, H.L. and Lindquist, S.L. (2000) A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature*, **407**, 477-483.
- Tuite, M.F. and Cox, B.S. (2003) Propagation of yeast prions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 878-890.
- Tuite, M.F. and Koloteva-Levin, N. (2004) Propagating prions in fungi and mammals. *Mol Cell*, **14**, 541-552.
- Turcq, B., Deleu, C., Denayrolles, M. and Begueret, J. (1991) Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospira anserina* are not essential for cell viability. *Mol Gen Genet*, **228**, 265-269.
- Turk, E., Teplow, D.B., Hood, L.E. and Prusiner, S.B. (1988) Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem*, **176**, 21-30.
- Tutar, Y., Song, Y. and Masison, D.C. (2005) Primate chaperones Hsc70 (constitutive) and Hsp70 (induced) differ functionally in supporting growth and prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.
- Umland, T.C., Taylor, K.L., Rhee, S., Wickner, R.B. and Davies, D.R. (2001) The crystal structure of the nitrogen regulation fragment of the yeast prion protein Ure2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1459-1464.
- Uptain, S.M. and Lindquist, S. (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol*, **56**, 703-741.
- Uptain, S.M., Sawicki, G.J., Caughey, B. and Lindquist, S. (2001) Strains of [PSI(+)] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion. *Embo J*, **20**, 6236-6245.
- Varela-Nallar, L., Gonzalez, A. and Inestrosa, N.C. (2006) Role of copper in prion diseases: deleterious or beneficial? *Curr Pharm Des*, **12**, 2587-2595.
- Verhoef, L.G., Lindsten, K., Masucci, M.G. and Dantuma, N.P. (2002) Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet*, **11**, 2689-2700.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A. and Prusiner, S.B. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14945-14949.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2042-2047.
- Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M.F., Vilotte, J.L., Lehmann, S. and Laude, H. (2001) Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4055-4059.
- Vilotte, J.L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M.G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M.F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D. and Laude, H. (2001) Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol*, **75**, 5977-5984.

- Vogtherr, M., Grimme, S., Elshorst, B., Jacobs, D.M., Fiebig, K., Griesinger, C. and Zahn, R. (2003) Antimalarial drug quinacrine binds to C-terminal helix of cellular prion protein. *J Med Chem*, **46**, 3563-3564.
- Volkov, K.V., Aksenova, A.Y., Soom, M.J., Osipov, K.V., Svitin, A.V., Kurischko, C., Shkundina, I.S., Ter-Avanesyan, M.D., Inge-Vechtomo, S.G. and Mironova, L.N. (2002) Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **160**, 25-36.
- Vorberg, I., Raines, A., Story, B. and Priola, S.A. (2004) Susceptibility of common fibroblast cell lines to transmissible spongiform encephalopathy agents. *J Infect Dis*, **189**, 431-439.
- Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J. and Collinge, J. (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*, **358**, 171-180.
- Wagner, H. (2002) Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 62-69.
- Walmsley, A.R., Zeng, F. and Hooper, N.M. (2001) Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *Embo J*, **20**, 703-712.
- Warner, R.G., Hundt, C., Weiss, S. and Turnbull, J.E. (2002) Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem*, **277**, 18421-18430.
- Webster, R.V., Craig, J.C., Shyamala, V., Kirby, G.C. and Warhurst, D.C. (1991) Antimalarial activity of optical isomers of quinacrine dihydrochloride against chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Biochem Pharmacol*, **42 Suppl**, S225-227.
- Wegrzyn, R.D., Bapat, K., Newnam, G.P., Zink, A.D. and Chernoff, Y.O. (2001) Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 4656-4669.
- Werner-Washburne, M. and Craig, E.A. (1989) Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 multigene family. *Genome*, **31**, 684-689.
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E. and Craig, E.A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **7**, 2568-2577.
- Westaway, D. and Prusiner, S.B. (1986) Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids Res*, **14**, 2035-2044.
- Wickner, R.B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **264**, 566-569.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., Roberts, B.T., Pierce, M. and Baxa, U. (2002) Prions of yeast as epigenetic phenomena: high protein "copy number" inducing protein "silencing". *Adv Genet*, **46**, 485-525.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., Ross, E.D., Pierce, M.M., Baxa, U., Brachmann, A. and Shewmaker, F. (2004) Prion Genetics: New Rules for a New Kind of Gene. *Annu Rev Genet*.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K. and Shewmaker, F. (2006) How to find a prion: [URE3], [PSI(+)] and [beta]. *Methods*, **39**, 3-8.
- Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A. and Prusiner, S.B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3563-3568.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann,

- M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. and Davis, R.W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.
- Wong, B.S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Petersen, R.B., Jones, I.M., Gambetti, P., Brown, D.R. and Sy, M.S. (2000) Prion disease: A loss of antioxidant function? *Biochem Biophys Res Commun*, **275**, 249-252.
- Wong, C., Xiong, L.W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B. and Caughey, B. (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Embo J*, **20**, 377-386.
- Wright, C.F., Teichmann, S.A., Clarke, J. and Dobson, C.M. (2005) The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature*, **438**, 878-881.
- Wu, Y.X., Greene, L.E., Masison, D.C. and Eisenberg, E. (2005) Curing of yeast [PSI⁺] prion by guanidine inactivation of Hsp104 does not require cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12789-12794.
- Xu, S., Bevis, B. and Arnsdorf, M.F. (2001) The assembly of amyloidogenic yeast sup35 as assessed by scanning (atomic) force microscopy: an analogy to linear colloidal aggregation? *Biophys J*, **81**, 446-454.
- Yedidia, Y., Horonchik, L., Tzaban, S., Yanai, A. and Taraboulos, A. (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J*, **20**, 5383-5391.
- Yonath, A. (2005) Ribosomal crystallography: peptide bond formation, chaperone assistance and antibiotics activity. *Mol Cells*, **20**, 1-16.
- Yoshida, H. (2007) ER stress and diseases. *Febs J*, **274**, 630-658.
- Yu, S., Yin, S., Li, C., Wong, P., Chang, B., Xiao, F., Kang, S.C., Yan, H., Xiao, G., Tien, P. and Sy, M.S. (2006) Aggregation of prion protein with insertion mutations is proportional to the number of inserts. *Biochem J*.
- Yuan, J., Xiao, X., McGeehan, J., Dong, Z., Cali, I., Fujioka, H., Kong, Q., Kneale, G., Gambetti, P. and Zou, W.Q. (2006) Insoluble aggregates and protease-resistant conformers of prion protein in uninfected human brains. *J Biol Chem*.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 145-150.
- Zanusso, G., Ferrari, S., Cardone, F., Zampieri, P., Gelati, M., Fiorini, M., Farinazzo, A., Gardiman, M., Cavallaro, T., Bentivoglio, M., Righetti, P.G., Pocchiari, M., Rizzuto, N. and Monaco, S. (2003) Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, **348**, 711-719.
- Zhang, C.C., Steele, A.D., Lindquist, S. and Lodish, H.F. (2006) Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Zhang, H.Y. (2006) Same causes, same cures. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Zou, W.Q., Zheng, J., Gray, D.M., Gambetti, P. and Chen, S.G. (2004) Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1380-1385.

Résumé

Identification de cibles intracellulaires de molécules à activité antiprion isolées dans un crible en levure au laboratoire.

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives touchant l'homme ainsi que l'animal et dont l'issue est toujours fatale.

Notre objectif était d'utiliser la 6AP et le GA, deux drogues antiprion isolées au laboratoire comme des « hameçons » moléculaires pour identifier leurs cibles cellulaires afin de mieux comprendre leur mode d'action ainsi que les phénomènes de prionisation.

Deux criblages, l'un génétique et l'autre biochimique ont révélé que les chaperons de protéines et les ribosomes sont impliqués. Les drogues antiprion testées ciblent spécifiquement la fonction de repliement des protéines portée par l'ARNr 23S/25S/28S. Ceci suggère que l'activité de chaperon de protéines de l'ARNr 23S/25S/28S est nécessaire pour le maintien et la propagation des prions.

Ces molécules semblent aussi être actives contre d'autres maladies liées à des problèmes de repliement et d'agrégation des protéines ; telles la maladie de Huntington ou certaines formes de mucoviscidose. Nos molécules ont donc un avenir potentiel dans le traitement de ces maladies.

Mots clés : prion, fibres amyloïdes, chaperons de protéines, ribosome, levure, criblage.

Abstract

Determining intracellular targets of antiprion drugs isolated using a yeast-based assay.

Prion-based diseases are fatal neurodegenerative disorders for which no efficient treatment is currently available.

We focussed our work on the identification of the intracellular biochemical targets of two drugs 6AP and GA, isolated in the laboratory as antiprion drugs using a yeast-based assay to uncover biochemical pathways controlling prion formation.

Using both genetic and biochemical approaches, we show an RNA-dependent interaction of 6AP and GA with ribosomes. 6AP and GA specifically inhibit the protein folding activity of the large ribosomal RNA of the large ribosome subunit. We thus propose that the ribosomal RNA protein folding activity is required for prion maintenance.

These drugs are also efficient against other protein misfolding diseases: Huntington disease or cystic fibrosis. 6AP and GA could have much wider applications than in prion diseases.

Keywords: prion, Amyloid fibers, protein folding, protein chaperone, ribosome, yeast, screening.

