

## Maladies neurodégénératives et stress oxydant

Elise Lévy

#### ▶ To cite this version:

Elise Lévy. Maladies neurodégénératives et stress oxydant. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT: 2020UPASB028. tel-03185033

## HAL Id: tel-03185033 https://pastel.hal.science/tel-03185033

Submitted on 30 Mar 2021  $\,$ 

**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.



# Maladies neurodégénératives et stress oxydant

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES) Spécialité de doctorat: Biologie moléculaire et cellulaire Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France Référent : AgroParisTech

#### Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 15 décembre 2020, par

## **Elise LEVY**

#### **Composition du Jury**

Pierre AUCOUTURIER	Président	
Professeur, Sorbonne Université - Hôpital St-Antoine		
Véronique PERRIER	Rapporteur & Examinatrice	
Directrice de recherche, CNRS MMDN Montpellier	Rapporteur & Examinative	
Jean-Michel PEYRIN	Rapporteur & Examinateur	
Directeur de recherche, CNRS Institut de Biologie Paris Seine		
Carole CROZET	Evaminatrica	
Chargée de recherche, INSERM, IRMB Montpellier	Examinative	
Vincent BERINGUE	Diversion de thèse	
Directeur de recherche, INRAE Centre IdF-Jouy-en-Josas-Antony	Directeur de these	
Laurence VERNIS	Ca Divertuise de thèse	
Chargée de recherche, INSERM, ICNS Gif-sur-Yvette	Co-Directrice de these	
Davy MARTIN	Co Frankrant & Evaninatour	
Chargé de recherche, INRAE Centre IdF-Jouy-en-Josas-Antony	CO-Encaurant & Examinateur	

# Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASB028

#### Remerciements

Je remercie tout d'abord celle et ceux pour qui j'ai travaillé ces trois dernières années : Vincent Béringue, d'avoir endossé le rôle de directeur de thèse, Laurence Vernis-Béringue, de sa présence au cours de nos réunions mensuelles, et Davy Martin, qui a assuré mon encadrement scientifique dès mon premier stage au laboratoire, de son investissement dans ce projet, dont ses relectures attentives et exigeantes de la totalité du présent manuscrit.

Je remercie sincèrement les membres de mon jury de thèse de l'intérêt qu'ils ont accordé à mes travaux. Merci en particulier à Pierre Aucouturier, qui a assuré la présidence de ce jury, d'avoir proposé de venir à Jouy-en-Josas pour rendre la soutenance aussi normale que possible malgré les circonstances, et d'avoir bouleversé son emploi du temps à la dernière minute de façon à ce que la totalité du jury puisse assister à la soutenance. Un grand merci également à Jean-Michel Peyrin, qui a évalué ce travail en tant que rapporteur, pour ses propositions concrètes d'améliorations et ses questions intéressantes. Merci enfin à Véronique Perrier et à Carole Crozet, pour leur participation à ce jury de thèse dans les meilleures conditions possibles malgré la distance.

Je souhaite remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont participé directement à ce projet de thèse. Tout d'abord, Jérôme Chapuis m'a patiemment formée à la microscopie à fluorescence dès mon premier stage dans l'équipe, puis au travail en laboratoire confiné, et a même tenté de m'initier à la programmation en VBA. Merci Jérôme pour ton soutien scientifique et technique, dont bien sûr ton aide pour les derniers western blots, qui m'a fait gagner un temps précieux à un moment où j'en avais terriblement besoin. Merci surtout pour l'oreille attentive que tu m'as prêtée dans certains des moments les plus difficiles, et pour ta lutte opiniâtre contre les petites et grandes iniquités du quotidien. Merci aussi à Céline Chapuis, qui m'a accueillie et formée à la paillasse tout au long de mon premier stage dans l'équipe, et à Mohammed Moudjou, qui m'a initiée à la PMCA, et avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie Hannah Klute qui a réalisé les images de microscopie à force atomique des fibres de PrP, Human Rezaeï, pour la production des oligomères de PrP, et Justine Godard, pour son investissement dans ce projet au cours de son stage de deuxième année de BTS. Je suis très reconnaissante à Pierre Adenot pour le temps qu'il a consacré à me former à l'utilisation du microscope confocal, pour ses conseils, ses encouragements, et la découverte de l'excellent Statistiques pour statophobes, qui m'a considérablement aidée dans mes travaux ! Merci également à Florence Jaffrezic et Denis Laloë qui m'ont fait bénéficier de leur expertise en statistiques et se sont intéressés à mon travail à un moment où j'en avais bien besoin, ainsi qu'à Eve Leconte, pour sa relecture attentive du volet statistiques de mon manuscrit et son soutien. Je remercie enfin Vincent Andréoletti, Cindy Carpentier et Aurélie Bernard, bien sûr pour leur efficacité redoutable dans l'aide matérielle qu'ils fournissent au quotidien à chacun des projets du laboratoire, mais aussi pour leur gentillesse et leur soutien constant.

Je remercie Meng-Er Huang de son investissement dans mon comité de suivi individuel avec Sophie Mouillet-Richard, et de m'avoir permis de participer à un congrès au cours de ma thèse. Je souhaite également remercier Claire Chéret de m'avoir donné l'opportunité d'encadrer des TP, j'ai réellement apprécié cette expérience d'enseignement à laquelle je regrette de ne pas avoir eu la possibilité de consacrer plus de temps. Merci enfin à Emmanuel Cuervo et Joël Asbusquier pour leur aide précieuse concernant l'organisation technique de cette soutenance en visioconférence partielle.

Je remercie pour leur accueil l'ensemble des membres présents et passés de l'équipe MAP2 d'INRAE et de l'ancienne équipe Stress oxydant de l'Institut Curie. Merci en particulier à Fabienne Reine et Laetitia Herzog, qui m'ont chaleureusement accueillie dès mes premiers jours dans l'équipe et m'ont été d'un grand soutien tout au long de mon séjour à l'INRA·E, Pierre Sibille, qui m'a plus d'une fois évité le trajet à pieds entre Versailles et Jouy-en-Josas, Sandrine Truchet, pour nos conversations passionnantes et motivantes, Michel Dron, Djabir Larkem, Jan Bohl, Dorothée Baïlle, Amélie Heneman et Nadine El Banna : j'ai passé de très bons moments avec vous tous. Je remercie tout particulièrement Christelle Jas et Agnès Le Saux, mes colocataires de bureau successives. Christelle, j'ai beaucoup apprécié ces années passées à tes côtés depuis mon stage de M2, et nos longues conversations. Agnès, j'ai apprécié chaque moment passé avec toi, y compris les messages échangés pendant les confinements et mes périodes de rédaction en ermite. Je te remercie aussi bien sûr pour tes relectures express du manuscrit qui m'ont bien rassurée – j'en avais besoin ! Vous m'avez toutes les deux été d'un grand soutien. Je vous souhaite une poursuite de carrière épanouissante et enfin à la hauteur de votre valeur et de vos compétences.

Je souhaite vivement remercier toute l'équipe de l'école doctorale ABIES, et tout particulièrement son directeur Alexandre Péry. Merci Alexandre pour ton écoute attentive, ton empathie, ton intelligence, ton exceptionnelle réactivité, tes conseils avisés et ton soutien indéfectible qui m'ont énormément aidée, tout particulièrement à partir de mon troisième comité de suivi et pendant les confinements. Merci aussi à Irina Vassileva, Pierre Larraufie, Christine Duvaux-Ponter et Corinne Fiers, ainsi qu'à Gérard Cuvelier. J'ai eu beaucoup de chance de préparer ma thèse de doctorat dans cet établissement exemplaire et attentif à ses doctorants, qui nous écoute, nous prend au sérieux, et cherche constamment à progresser pour nous accompagner au mieux. C'est à vous que je dois d'être arrivée au bout du tunnel en conservant une part de foi en la recherche.

C'est sans doute avec Joëlle Mettier que j'ai le plus partagé au cours de ces trois dernières années. Depuis notre rencontre en classes préparatoires, nous avons traversé côte à côte les moments les plus éprouvants de nos vies d'étudiantes et de jeunes adultes. Merci Joëlle, ta présence m'a rendu moins insupportables les moments les plus difficiles, et notre amitié est certainement la plus belle chose que ce travail de thèse m'ait apportée ! Il est évident que ma santé mentale te doit beaucoup. En attendant de fêter notre double libération, *Vim honoremque* ! (merci à Valentine Lévy pour la traduction en latin). Merci aussi à tous mes collègues doctorants, stagiaires, et autres personnels plus ou moins consommables, avec lesquels j'ai passé de très bons moments : Carole, Catherine, Céline, Emilie, Fiona, Hortense, Lynda, Lucy, Margaux, Olivier, Raphaël, Sébastien, Sylvia, Vincent P...

Enfin, je souhaite remercier ma famille ainsi que mes ami·e·s du monde réel. Je remercie tout particulièrement Julie pour son amitié solide et indéfectible depuis 1998, et qui, parmi mes relecteur·ice·s, détient le record du nombre de fautes de frappe dénichées ! Merci aussi à Aurélie, Agathe, Céline, Clémentine, Sophie et Ben, Julien et Samuel, et tous les autres. Je remercie Cécile et sa famille pour les nombreux déjeuners, goûters et dîners qui ont égayé toute ma période versaillaise, ainsi que Marie-Claire dont la porte m'a toujours été ouverte.

Je pense fort à ceux qui ne sont plus là, tout particulièrement mon grand-père Joseph, ma grand-mère Marie-Claire et mon oncle tonton Bébert, le tonton le plus super, qui ont tous les trois participé à initier et à renforcer mon goût pour les sciences, ma créativité, mais aussi mon idéalisme.

Merci enfin à mon grand-père Jean, à mon père Jean-Michel, à ma mère Marie-Luce, qui a courageusement lu et annoté ce manuscrit, et à mes bizarr'sisters Mathilde et Valentine, qui m'ont toujours soutenue et inspirée. A Roman, merci pour tout.

« Sapience n'entre point en âme malivole, et science sans conscience n'est que ruine de l'âme. » François Rabelais, 1552

## Table des matières

1. INT	RODU	ICTION	17
1.1.	Les ı	naladies à prions et la maladie d'Alzheimer : des protéinopathies	18
1.1	.1.	Maladies à prions et protéine prion	18
1.1	.2.	Maladie d'Alzheimer, protéine tau et peptide amyloïde bêta	40
1.2.	Agré	égation de protéines et stress oxydant	63
1.2	.1.	Le stress oxydant, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox	63
1.2	.2.	Liens fonctionnels entre interaction de protéines et stress oxydant	67
1.3.	Mod	lèles des maladies à prions et de la maladie d'Alzheimer	68
1.3	.1.	Modèles animaux	68
1.3	.2.	Modèles <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	71
1.3	.3.	Perspectives pour les modèles de maladies neurodégénératives	78
1.4.	Mét	hodes de suivi du stress oxydant en cellules	79
1.4	.1.	Sondes chimiques et dosages d'espèces oxydantes ou réductrices	79
1.4	.2.	Sondes peptidiques codées génétiquement	84
1.5.	Obje	ectifs du projet de recherche et stratégie expérimentale	87
2. 1	MATER	RIELS ET METHODES	89
2.1.	Con	struction des modèles cellulaires RK13	89
2.1	.1.	Construction des vecteurs de coexpression inductibles	89
2.1	.2.	Transfections stables des cellules et sous-clonages	97
2.1	.3.	Entretien des lignées cellulaires	100
2.2.	Cara	ctérisation des lignées cellulaires	100
2.2	.1.	Marquage des mitochondries des cellules vivantes	100
2.2	.2.	Immunofluorescence des cellules avec et sans infection	100
2.2	.3.	Acquisition des spectres d'excitation de suspensions de cellules exprimant les sondes	
fluo	oresce	ntes	102
2.3.	Prép	paration des échantillons pour quantification du niveau d'oxydation des sondes par	
weste	rn blo	t rédox	103
2.4.	Suiv	i des sondes en temps réel par microscopie à fluorescence	104

2.5.	Suiv	i de la concentration en $H_2O_2$ avec la sonde chimique Peroxy yellow 1	106
2.6.	Infe	ction prion des cellules	107
2.6.	1.	Infection des cellules par la souche 127S de prion ovin	107
2.6.	2.	Amplification de la protéine prion infectieuse par PMCA	108
2.6.	3.	Digestion par la protéinase K pour analyse par western blot	109
2.7.	Déte	ection et quantification de protéines par western blot	110
2.8.	Prép	paration et caractérisation des assemblages de protéines	111
2.8.	1.	Peptide Aβ <sub>1-40</sub> recombinant monomérique	111
2.8.	2.	Fibres d'Aβ <sub>1-40</sub> recombinant	113
2.8.	3.	Protéine prion recombinante monomérique	113
2.8.	4.	Oligomères de protéine prion recombinante	114
2.8.	5.	Fibres de protéine prion recombinante	115
2.8.	6.	Microscopie à force atomique	116
2.9.	Outi	ls bioinformatiques	118
2.9.	1.	Analyse d'images	118
2.9.	2.	Analyse statistique des courbes	118
3. R	RESUL	TATS	123
3.1.	Etuc	le de l'interaction entre $A\beta_{1-40}$ monomérique et PrP monomérique	123
3.2.	Con	struction de modèles cellulaires pour le suivi du stress oxydant	127
3.2.	1.	Modèles avec expression constitutive des sondes et inductible d'A $eta$ ou PrP	128
3.2.	2.	Modèles avec coexpression inductible des sondes avec PrP ou $A\beta_{1\text{-}40}$	141
3.3.	Opti	misation des conditions d'acquisition en microscopie à fluorescence pour le suivi des	
sonde	s prot	éiques HyPer1 et Grx1-roGFP2	152
3.3.	1.	Principe de l'acquisition et de la quantification des données	153
3.3.	2.	Optimisation des conditions d'acquisition et de culture cellulaire	156
3.4.	Nou	veaux outils pour l'analyse d'image et l'analyse statistique des résultats obtenus	164
3.5.	Effe	t rédox de l'expression endogène de PrP et d'A $\beta_{1-40}$	194
3.5.	1.	Réponse de la sonde HyPer dans le cytoplasme à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	195
3.5.	2.	Réponse de la sonde Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204
3.5.	3.	Contrôle de l'absence d'effet rédox de l'expression des sondes	212

3.5.4.	Conclusion

3.6.	Effet	t de différents assemblages d'A $eta_{1-40}$ et de PrP recombinants sur le stress oxydant	214
3	.6.1.	Production et caractérisation des assemblages de protéines	214
3	.6.2.	Présentation des expériences et analyse globale des résultats	217
3	.6.3.	Présentation des résultats assemblage par assemblage	221
3	.6.4.	Conclusion	240
3.7.	Etud	e temporelle du stress oxydant au cours d'une infection à prions en modèle cellulaire	241
3	.7.1.	Caractérisation de l'infection des cellules	241
3	.7.2.	Evolution de la réponse cellulaire à $H_2O_2$ au cours de l'infection	245
4.	DISCUS	SSION GENERALE	251
4.1.	Mise	en place d'outils innovants pour l'étude fine du stress oxydant	251
4	.1.1.	Modèles cellulaires pour le suivi du stress oxydant en temps réel	251
4	.1.2.	Amélioration et automatisation d'un protocole d'analyse d'images	253
4	.1.3.	Implémentation d'outils pour l'analyse statistique des résultats	254
4.2.	Effe	t sur le stress oxydant de différents assemblages de PrP et d'A $eta_{1-40}$	255
4	.2.1.	Effet de PrP <sup>c</sup> et d'Aβ <sub>1-40</sub> endogènes	256
4	.2.2.	Rôle de la PrP <sup>c</sup> dans la transduction du signal rédox en réponse à différents assembla	ges
d	e PrP et	d'Αβ	261
4.3.	Pers	pectives	267
4.4.	Con	clusion générale	268
5.	REFERI	ENCES	271
6.	ANNEX	XES	312
6.1.	Artio	cle de revue publié dans l'International Journal of Molecular Sciences (CC-BY-NC-ND)	312
6.2.	Artio	cle soumis pour publication au <i>journal of Biological Chemistry</i>	328
6.3.	Expé	eriences de suivi de la concentration en $H_2O_2$ avec une sonde chimique	352

## Table des illustrations

Figure 1 : Caractéristiques neuropathologiques d'une encéphalopathie spongiforme	19
Figure 2 : Structure de la protéine prion cellulaire, de Doppel et de Shadoo	23
Figure 3 : Principales voies de signalisation impliquant la PrP <sup>C</sup>	26
Figure 4 : Mécanisme putatif de propagation de la conformation PrP <sup>sc</sup> par nucléation, conversion d	e la
PrP <sup>c</sup> en PrP <sup>sc</sup> , polymérisation et fragmentation	28
Figure 5 : Cinq modèles du mauvais repliement de la PrP <sup>c</sup> en PrP <sup>sc</sup>	29
Figure 6 : La sous-unité élémentaire à la base de la formation des fibres de PrP <sup>sc</sup>	31
Figure 7 : Caractéristiques de deux souches de prions	34
Figure 8 : Incidence annuelle de l'ESB au Royaume-Uni et dans le monde	38
Figure 9 : La dégénérescence neurofibrillaire est associée à l'agrégation de la protéine tau	41
Figure 10 : Représentation schématique de la protéine tau	43
Figure 11 : Structure des fibres de tau observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie	
d'Alzheimer	45
Figure 12 : Les plaques séniles sont associées à l'agrégation du peptide A $eta$	46
Figure 13 : Formation du peptide A $eta$ monomérique à partir de l'APP	47
Figure 14 : Structure de différents types de fibres d'A $eta_{1-40}$ et d'A $eta_{1-42}$	50
Figure 15 : Diversité de souches dans la maladie d'Alzheimer	54
Figure 16 : Observation de la colocalisation partielle entre A $eta$ et PrP in cellulo	57
Figure 17 : Mécanismes potentiels de toxicité des oligomères d'A $eta$ dépendant ou non de PrP	59
Figure 18 : Phases neurologiques de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer	62
Figure 19 : Production d'ERO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale	64
Figure 20 : Equilibre entre glutathion et disulfure de glutathion	65
Figure 21 : Le stress oxydant, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox	66
Figure 22 : Perspectives dans le développement de nouveaux modèles de maladies	
neurodégénératives	79
Figure 23 : Exemples de molécules pour la quantification d'ERO par fluorescence et luminescence	81
Figure 24 : Exemples de sondes rédox peptidiques codées génétiquement	85
Figure 25 : Spectres d'excitation des sondes HyPer1, rxYFP et roGFP2	86
Figure 26 : Objectifs du projet de thèse et stratégie expérimentale	88
Figure 27 : Construction du vecteur de coexpression de HyPer1 et $A\beta_{1-40}$	90
Figure 28 : Cartes simplifiées des vecteurs d'expression inductibles construits pour coexpression de	s
sondes avec PrP ou Aβ	92
Figure 29 : Cartes des vecteurs d'expression des sondes HyPer et rxYFP sous contrôle du promoteur	-
CMV	98
Figure 30 : Principe du western blot rédox	104

Figure 31 : Schéma du principe de la PMCA	109
Figure 32 : Purification des oligomères de PrP par chromatographie d'exclusion de taille	115
Figure 33 : Principe de fonctionnement du microscope à force atomique	117
Figure 34 : Présentation des paramètres graphiques utilisés pour décrire les courbes	118
Figure 35 : Exemples d'ACP fonctionnelles sur un jeu de données fictif simple et sur un jeu de donn	ıées
expérimentales réelles	120
Figure 36 : Procédure de la correction de Holm-Bonferroni	122
Figure 37 : Effet de l'exposition au monomère d'A $\beta_{1-40}$ des cellules RK13 exprimant ou non la PrP <sup>c</sup> .	
Adapté de (Grznarova et al., en révision)	125
Figure 38 : Stratégie d'expression inductible des protéines d'intérêt et constitutive des sondes	129
Figure 39 : Contrôle de la localisation des protéines d'intérêt dans des populations de cellules	
exprimant A $eta_{1-40}$ ou PrP de façon inductible et les sondes de façon constitutive	131
Figure 40 : Pourcentage d'expression d'A $eta_{1-40}$ et des sondes en fonction du temps	133
Figure 41 : Caractérisation par immunofluorescence des lignées sous clonées présentant les meilles	urs
taux de coexpression des sondes avec $A\beta_{1-40}$	135
Figure 42 : Contrôle de la sensibilité des sondes à un oxydant exogène dans les lignées cellulaires	
utilisées	136
Figure 43 : Effet de la durée d'induction de l'expression d'A $\beta$ sur le niveau d'oxydation des thiols d	lans
les mitochondries	137
Figure 44 : Influence de l'expression d'A $\beta_{1-40}$ ou de PrP sur le niveau d'oxydation des thiols cellulai	res
	138
Figure 45 : Relation entre signal quantifié par western blot et masse de protéines	140
Figure 46 : Stratégie de coexpression inductible des protéines d'intérêt et des sondes	143
Figure 47 : Immunofluorescence de certaines des nouvelles lignées cellulaires	145
Figure 48 : Amélioration de la sensibilité d'un protocole de western blot anti-A $eta$	146
Figure 49 : Détection par western blot des sondes, d'A $eta$ et de PrP dans les modèles cellulaires	148
Figure 50 : Chromatographie d'exclusion de taille sur le milieu de culture de cellules exprimant A $\beta$	1-40
	149
Figure 51 : Cinétique de l'induction de la synthèse de HyPer dans la lignée HyPer cytoplasme P2A	Αβ
	150
Figure 52: Quantification de l'A $\beta_{1-40}$ et de la PrP exprimée par les cellules	151
Figure 53 : Spectres d'excitation des cellules exprimant HyPer1 ou Grx1-roGFP2	153
Figure 54 : Réponse à 40 $\mu$ M d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de cellules exprimant la sonde HyPer	154
Figure 55 : Principe de la quantification du niveau d'oxydation des sondes en fonction du temps	155
Figure 56 : Premières expériences de suivi de la sonde HyPer en réponse à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	157
Figure 57 : Résultats des optimisations expérimentales visant à améliorer le rapport signal/bruit de	es
images	160

Figure 58 : Réponse à 75 $\mu$ M d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de cellules confluentes exprimant la sonde HyPer	162
Figure 59 : Réponse de la sonde HyPer à $H_2O_2$ avec une très faible densité cellulaire	163
Figure 60 : Développement et implémentations de nouveaux outils	165
Figure 61: Réponse de la sonde HyPer exprimée dans les cellules RK13 à différentes concentratio	ns
d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	166
Figure 62 : Présentation des paramètres graphiques utilisés pour décrire les courbes	166
Figure 63 : Variation de la concentration cytoplasmique en $H_2O_2$ après ajout exogène d' $H_2O_2$ pou	r des
cellules exprimant ou non PrP ou $A\beta_{1-40}$	195
Figure 64 : Résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des variables quantitatives	198
Figure 65 : Concentration initiale en $H_2O_2$ avec et sans expression d'A $eta_{1-40}$ et de PrP	199
Figure 66 : Paramètres descriptifs de la cinétique de l'augmentation de la concentration	
cytoplasmique en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$ et PrP	201
Figure 67 : Paramètres descriptifs de la concentration cytoplasmique en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suite au traitement	, en
différents points clés et de manière globale	203
Figure 68 : Cinétique de l'oxydation du glutathion cytoplasmique en réponse à différentes	
concentrations d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exogène avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$ et PrP	205
Figure 69 : Elimination des données les plus bruitées de cinétique de l'oxydation du glutathion	
cytoplasmique en réponse à différentes concentrations d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	206
Figure 70 : Deux réplicats de suivi de la réponse de Grx1-roGFP2 à 75 $\mu$ M d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	207
Figure 71 : Niveau d'oxydation initial du glutathion avec et sans expression de PrP	208
Figure 72 : Paramètres descriptifs de la cinétique d'oxydation du glutathion dans la réponse préc	oce à
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	209
Figure 73 : Paramètres descriptifs de la proportion de glutathion oxydée, en différents points et e	de
manière globale, après un traitement par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	211
Figure 74 : Corrélation entre score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle et intensité	é de
fluorescence	213
Figure 75 : Observation des fibres d'A $\beta_{1-40}$ et de PrP recombinant par microscopie à force atomiq	ue (H.
Klute)	216
Figure 76 : Expériences de suivi de la sonde HyPer en réponse à des assemblages exogènes d'A $\beta_1$	-40 <b>et</b>
de PrP	217
Figure 77 : Scores sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle après différents temps	
d'exposition aux assemblages de protéines	218
Figure 78 : Paramètres descriptifs des courbes de réponse à $H_2O_2$ en fonction de l'exposition ou r	10n à
des assemblages de protéines	219
Figure 79 : Paramètres descriptifs des courbes de réponse à $H_2O_2$ en fonction de l'expression de l	۲P ou
non	220

	221
Figure 81 : Effet du monomère d'A $eta_{1-40}$ sur la concentration cytoplasmique en $H_2O_2$	224
Figure 82 : Effet de fibres d'A $\beta_{1-40}$ sur la concentration cytoplasmique en $H_2O_2$	228
Figure 83 : Effet du monomère de PrP extracellulaire sur la concentration cytoplasmique en $H_2O_2$	231
Figure 84 : Effet des oligomères de PrP sur la concentration cytoplasmique en $H_2O_2$	235
Figure 85 : Effet de fibres de PrP sur la concentration cytoplasmique en $H_2O_2$	239
Figure 86 : Détection de la PrP <sup>sc</sup> dans les cellules infectées à différents passages post-infection	243
Figure 87 : Caractérisation de l'infection des cellules coexprimant HyPer et PrP <sup>C</sup>	245
Figure 88 : Variation de la concentration cytoplasmique en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> après ajout exogène d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec	et
sans infection	246
Figure 89 : Evolution en fonction du passage post infection des paramètres descriptifs des courbe	s de
réponse de HyPer à 10 $\mu$ M d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	248
Figure 90 : ACP sur les variables quantitatives descriptives des courbes	249
Figure 91 : Mécanismes putatifs de protection vis-à-vis d'H₂O₂ par l'expression endogène de PrP <sup>c</sup>	(à
gauche) ou d'A $\beta_{1-40}$ (à droite)	261
Figure 92 : Proposition de mécanisme pour l'effet pro-oxydant des fibres d'A $\beta_{1-40}$ sur les cellules	
exprimant la PrP <sup>C</sup>	264
Figure 93 : Proposition de mécanismes pour l'effet de la PrP <sup>c</sup> dans la régulation ou la perturbation	n de
l'homéostasie rédox	270
Figure 94 : Caractéristiques de la sonde PY1.	353
Table I : Maladies à prions humaines	37
Table II : Exemple de méthodes de quantification du stress oxydant par dosage d'espèces rédox o	u
utilisation de sondes chimiques	83
Table III : Notation des constructions réalisées	89
Table IV : séquences des oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR des séquences coda	ant
les sondes adressées aux différents compartiments	93
Table V : Plasmides utilisés pour l'amplification par PCR des séquences codant les sondes ou pour	
l'expression constitutive des sondes en cellules eucaryotes	94
Table VI : Protocoles d'amplification d'ADN par PCR	94
Table VII : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence	101
Table VIII : Longueurs d'ondes utilisées pour détecter les différents fluorophores	102
Table IX : Paramètres d'acquisition des spectres d'excitation	103
Table X : Paramètres d'excitation utilisés pour les cellules exprimant HyPer1 ou Grx1 roGFP2	106
Table XI : Paramètres cinétiques des acquisitions en time-lapse	106
Table XII : Paramètres d'acquisition des spectres d'excitation de PY1	107

Table XIII : Composition des tampons de Laemmli 2X utilisés en Western blot	110
Table XIV : Anticorps utilisés pour la détection en western blot des protéines d'intérêt	111
Table XV : Estimation des quantités de protéines produites par les lignées cellulaires	152
Table XVI : Ajustement des paramètres d'acquisition pour minimiser la variabilité	164
Table XVII : Paramètres descriptifs des courbes de réponse des sondes à $H_2O_2$	196
Table XVIII : Conclusions de l'analyse de la réponse à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec et sans exposition au monor	nère
d'A $\beta_{1-40}$ des cellules exprimant ou non PrP	225
Table XIX : Conclusions de l'analyse de la réponse à $H_2O_2$ avec et sans exposition aux fibres $\sigma$	<b>ΊΆ</b> β <sub>1-40</sub>
des cellules exprimant ou non PrP	229
Table XX : Conclusions de l'analyse de la réponse à $H_2O_2$ avec et sans exposition au monomè	ere de PrP
des cellules exprimant ou non PrP	232
Table XXI : Conclusions de l'analyse de la réponse à $H_2O_2$ avec et sans exposition aux oligom	ières de
PrP des cellules exprimant ou non PrP	236
Table XXII : Conclusions de l'analyse de la réponse à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec et sans exposition aux fibres	de PrP des
cellules exprimant ou non PrP	240
Table XXIII : Effet rédox des polypeptides d'intérêt dans les modèles cellulaires RK13	256
Table XXIV : Comparaison des scores sur le premier mode de variation en fonction de l'expo	sition aux
différents assemblages de protéines exogène	266

## Liste des abréviations

Aβ <sub>1-40</sub>	Peptide amyloïde bêta, résidus 1 à 40
Aβ <sub>1-42</sub>	Peptide amyloïde bêta, résidus 1 à 42
Ac	Anticorps
ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	Atomic force microscopy (microscopie à force atomique)
AICD	APP intracellular domain (domaine intracellulaire de l'APP)
APH-1	Anterior pharynx defective 1
APOB	Apolipoprotéine B
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid precursor protein (protéine précurseur de l'amyloïde)
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BACE 1	Beta-site APP cleaving enzyme 1 (bêta-sécrétase 1)
BET	Bromure d'éthidium
BMES	Bis(2-mercaptoéthyl)sulfone
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (albumine de sérum bovin)
BSO	Buthionine Sulphoximine
CMV	Cytomégalovirus
cPLA2	Phospholipase cytoplasmique A2
cpYFP	Yellow fluorescent protein permutée circulairement
C-ter	Extrémité carboxy-terminale
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEL	Diode électroluminescente
DMPO	N-oxyde de 5,5-diméthyl-1-pyrroline
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
dox	Doxycycline
DTT	Dithiothréitol
DMSO	Diméthylsulfoxide
e⁻	Electron
ECL	Enhanced chemiluminescence detection (détection améliorée de la chimilumi-
	nescence)
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique

ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROA	Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
Fn	Flasque de n cm <sup>2</sup> de surface
for	Forward (sens)
G418	Généticine
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Protéine acide fibrillaire gliale)
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Gpx	Glutathion péroxydase
Grx	Glutarédoxine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	High performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute
	performance)
HRP	Horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
λ	Longueur d'onde
$\lambda_{\acute{e}m}$	Longueur d'onde du pic d'émission
$\lambda_{\text{ex}}$	Longueur d'onde du pic d'excitation
LB	Milieu de culture <i>Luria broth</i>
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotéine de basse densité)
LUT	Look-up table
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule-associated protein (protéine associée aux microtubules)
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cells
MEM	Milieu essentiel minimum
MES	Acide 2-(N-Morpholino)-éthanesulfonique
mGluR5	Récepteur métabotrope au glutamate 5
MLS	Mitochondria leading sequence (séquence d'adressage aux mitochondries)
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate

NES	Nuclear exclusion signal (signal d'exclusion du noyau)
NLS	Nuclear localization signal (signal d'adressage au noyau)
NOX	NADPH oxydase
N-ter	Terminaison amine
Orp	<i>Oxygen regulated protein</i> (protéine régulée par l'oxygène)
OxyR-RD	Domaine régulateur d'OxyR (un régulateur de transcription)
pb	Paire de base
PBS	Phosphate-Buffered Saline (tampon phosphate salin)
PBST	PBS + 0,05% Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PDK1	3-phosphoinositide-dependant kinase 1
PEI	Polyethylenimine
PEN-2	Presenilin enhancer 2
PFA	Paraformaldéhyde
Pi	Phosphate inorganique
РК	Protéinase K
PMCA	Protein misfolding cyclic amplification
Pn	Plaque de culture cellulaire à n puits
PrP	Protéine prion
PrP <sup>C</sup>	Protéine prion cellulaire (non pathologique)
PrP <sup>res</sup>	Portion de la protéine prion résistante à la digestion par la protéinase K
PrP <sup>Sc</sup>	Protéine prion « <i>scrapie</i> » (pathologique)
Prx	Péroxyrédoxine
PS	Pénicilline 1U.mL <sup>-1</sup> / streptomycine 100 µg.mL <sup>-1</sup>
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PY1	3'-(Diethylamino)-6'-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-spiro[iso-
	benzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
QI	<i>Quantitative imaging</i> (imagerie quantitative)
RE	Réticulum endoplasmique
rédox	Oxydoréducteur
rNMDA	Récepteur N-méthyl-D-aspartate
RSE	Résonnance de spin électronique
$Q^{ox}/QH_2^{red}$	Ubiquinone réduite/ ubiquinone oxydée
rev	<i>Reverse</i> (antisens)
roGFP	Reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein
roGFP2	roGFP de deuxième génération
rpm	Rotation par minute
RT	Room temperature (température ambiante)

rxYFP	Redox sensitive yellow fluorescent protein
sAPPα	Soluble amyloïde precursor protein $lpha$
sAPPβ	Soluble amyloïde precursor protein $\beta$
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SMC	Site multiple de clonage
sMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TACE	Tumor necrosis factor $lpha$ -converting enzyme
TAE	Tris acétate EDTA
Таq	Thermus aquaticus
TE	Tampon Tris EDTA
ThT	Thioflavine T
TL1	Tampon de lyse des cellules
TRE	Tetracycline response element
Tris	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
Trx	Thiorédoxine
u.a.	Unité arbitraire
U	Unité
UV	Ultraviolet
vMCJ	Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
VRQ	Allèle V136 R154 Q171 de la protéine prion ovine
WT	<i>Wild type</i> (de type sauvage)
2xYT	Milieu de croissance microbienne Tryptone – extrait de levure 2X
YFP	Yellow fluorescent protein

#### 1. Introduction

La maladie d'Alzheimer est la première cause de démence dans le monde. Sa prévalence en continuelle augmentation et l'absence de traitement curatif en font un enjeu majeur de santé publique (Scheltens et al., 2016). Cette maladie présente de nombreuses similitudes avec les maladies à prions, qui sont également des maladies neurodégénératives incurables. Toutes deux sont associées à la transconformation et à l'agrégation d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques : la protéine prion (PrP) pour les maladies à prions (Prusiner, 1982) et le peptide bêta amyloïde (Aβ) ainsi que la protéine tau pour la maladie d'Alzheimer (Glenner and Wong, 1984). Ces polypeptides mal repliés s'assemblent en une grande variété d'agrégats de tailles et de structures diverses, dont certains sont toxiques. Le mauvais repliement se propage aux protéines saines suivant des mécanismes de nucléation / polymérisation similaires pour les deux maladies (Aoyagi et al., 2019; Olsson et al., 2018). Les agrégats toxiques s'accumulent alors dans le cerveau et conduisent à la neurodégénérescence. Par ailleurs, la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions sont caractérisées par un stress oxydant cellulaire chronique qui apparaît avant les premiers symptômes et participe à l'évolution de la maladie (Kim et al., 2015; Pamplona et al., 2008), sans que la relation de causalité entre agrégation de protéines et stress oxydant ne soit élucidée. Ainsi, certains agrégats favorisent le stress oxydant et, réciproquement, le stress oxydant peut favoriser l'agrégation de protéines. Le déclencheur de ce cercle vicieux et les assemblages impliqués sont encore mal documentés (Cheignon et al., 2017; Lévy et al., 2019; Zou et al., 2002). De plus, la protéine prion cellulaire normalement repliée, décrite comme antioxydante et neuroprotectrice (Castle and Gill, 2017; Vassallo and Herms, 2003), est nécessaire pour que les assemblages infectieux de protéine prion soient toxiques (Brandner et al., 1996; Mallucci et al., 2003). Elle agit également comme un récepteur à certains assemblages oligomériques d'Aβ, et pourrait ainsi médier leur cytotoxicité dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Laurén et al., 2009; Salazar and Strittmatter, 2017), ce qui constitue un lien fonctionnel entre les deux maladies.

L'objet de cette thèse est donc une étude combinée des perturbations rédox induites par différents assemblages d'Aβ et de PrP, dans le but (i) d'identifier les assemblages les plus perturbateurs et (ii) d'étudier le rôle de la PrP cellulaire dans ce processus. L'objectif à long terme est de mieux comprendre les dysfonctionnements neuronaux précoces dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et des maladies à prions. Dans ce but, j'ai commencé par mettre en place des modèles cellulaires permettant un suivi dynamique du stress oxydant. Ces modèles sont basés sur la lignée épithéliale RK13, modèle pour les maladies à prions. Puis, j'ai développé de nouveaux outils pour quantifier le stress oxydant en temps réel dans ces cellules et analyser statistiquement les résultats obtenus. J'ai ensuite exploité ces outils pour étudier l'influence sur l'homéostasie rédox, soit de l'expression endogène d'Aß et de PrP, soit de l'ajout dans le milieu de culture de PrP infectieuse ou de différents assemblages d'Aß et de PrP produits *in vitro*.

La première partie du présent manuscrit introduit les connaissances et données de la littérature à partir desquelles le projet de thèse s'est construit. Dans un second temps, les matériels et méthodes mis en œuvre pour mener le projet sont présentés. Les résultats obtenus font l'objet de la troisième partie, qui détaille (i) les modèles cellulaires construits, (ii) les outils méthodologiques développés dans le cadre de ce travail, et (iii) l'influence sur l'homéostasie rédox de l'expression d'A $\beta$  ou de PrP, puis de l'exposition exogène à des assemblages de PrP (infectieux ou non) ou d'A $\beta$ . Le manuscrit se clôt par une discussion générale des résultats obtenus et des perspectives de recherche ouvertes par ce travail.

#### 1.1. Les maladies à prions et la maladie d'Alzheimer : des protéinopathies

#### 1.1.1. Maladies à prions et protéine prion

#### 1.1.1.1. La protéine prion *scrapie*, un agent infectieux non conventionnel

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives irréversibles qui touchent de nombreux mammifères (Wopfner et al., 1999). Ce sont des encéphalopathies spongiformes : la neurodégénérescence confère au cerveau un aspect spongieux (Figure 1, colonne de gauche). Cette spongiose est accompagnée d'une prolifération anormale des cellules gliales (Figure 1, colonne du milieu) et de l'accumulation de dépôts de type amyloïde de la protéine prion (Figure 1, colonne de droite). Par analogie avec la structure en hélice de l'amidon, stabilisée par de multiples liaisons hydrogènes, un assemblage de protéines dit amyloïde présente une structure quaternaire fibrillaire visible en microscopie électronique, une figure de diffraction des rayons X caractéristique d'une structure en feuillets  $\beta$  croisés, et une affinité pour le rouge Congo associée à une biréfringence (Westermark et al., 2005). Ces protéines sont capables de s'associer en protofilaments, puis plusieurs protofilaments peuvent s'associer sous forme de fibres amyloïdes, puis de plaques (Fändrich, 2007).



**Figure 1 : Caractéristiques neuropathologiques d'une encéphalopathie spongiforme** Observation de coupes de cortex frontal d'un patient décédé sans maladie neurodégénérative (ligne du haut) et d'un patient décédé de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (ligne du bas).

Colonne de gauche : coloration hématoxyline-éosine.

Colonne du milieu : immunomarquage de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), spécifique des astrocytes.

Colonne de droite : immunomarquage de la protéine prion (PrP). Figure adaptée de (Aguzzi, 2001) (CC BY-NC-ND 3.0).

La première maladie à prions décrite est la tremblante du mouton, *scrapie* en anglais, connue en Angleterre depuis le XVIII<sup>e</sup> siècle (Woolhouse et al., 2001). Son caractère transmissible a été démontré dès 1936 par les vétérinaires français Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle, après une période d'incubation silencieuse pouvant atteindre deux ans chez les animaux inoculés (Barrairon, 1989). La période d'incubation silencieuse très longue de ces maladies a conduit à l'hypothèse d'une infection par un virus lent (Fuccillo et al., 1974). Cependant, l'agent infectieux responsable de la tremblante résiste à la plupart des traitements inactivants conventionnels, comme la formaline (solution aqueuse de formaldéhyde) (Patti-

son, 1965), les températures élevées et l'exposition aux rayons ultraviolets (UV) à des lonqueurs d'onde capables d'altérer les acides nucléiques (Alper et al., 1966). Sa petite taille n'est de plus pas compatible avec un agent infectieux conventionel, dont la réplication est basée sur une séquence codante d'acides nucléigues (Alper et al., 1966). Ces faits ont conduit à l'émergence de l'hypothèse d'un agent infectieux constitué uniquement d'une protéine (Griffith, 1967; Pattison and Jones, 1967). Cette hypothèse a été démontrée entre autres par les travaux de Stanley Prusiner, récompensé en 1997 par le prix Nobel de médecine, et de ses collègues, qui montrent (i) que l'agent infectieux contient une protéine, nommée prion pour *proteinaceous infectious particle* (Prusiner, 1982), (ii) que cette protéine infectieuse est partiellement résistante à la digestion par la protéinase K (Bolton et al., 1982) et (iii) qu'elle est codée par l'hôte. En effet, la protéine infectieuse, appelée protéine prion scrapie (PrP<sup>Sc</sup>), a la même structure primaire que la protéine prion cellulaire (PrP<sup>C</sup>), qui est une protéine de l'hôte, non pathogène et ubiquitaire (Locht et al., 1986; Oesch et al., 1985). La maladie se propage par conversion de la PrP<sup>C</sup> de l'hôte en PrP<sup>Sc</sup>. Ainsi, des souris transgéniques PrP<sup>0/0</sup>, n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup>, sont résistantes aux maladies à prions, tandis que des souris PrP<sup>+/0</sup> présentent un temps d'incubation plus long que les souris PrP<sup>+/+</sup> après inoculation de PrP<sup>Sc</sup> purifiée à partir de cerveaux de souris malades (Prusiner et al., 1993). De plus, des modèles de souris modifiées génétiquement pour exprimer la PrP<sup>C</sup> de hamster deviennent sensibles à l'infection par de la PrP<sup>Sc</sup> de hamster, ce qui n'est pas le cas des souris sauvages (Scott et al., 1989) ; ce type de modèles de rongeurs transgéniques pour la PrP est d'ailleurs très utilisé pour l'étude des maladies à prions. Enfin, certains assemblages constitués uniquement de protéine prion recombinante sont infectieux, c'est-à-dire capable d'induire une maladie à prions chez l'animal (Elezgarai et al., 2017; Eraña et al., 2019), ce qui valide cette théorie d'un agent infectieux constitué de la seule protéine (Kocisko et al., 1994).

#### 1.1.1.2. Structure et fonctions de la protéine prion cellulaire

La protéine prion normale, également appelée protéine prion cellulaire (PrP<sup>C</sup>), est une protéine ubiquitaire, codée par le gène *PRNP*, et particulièrement abondante dans les neurones (Bendheim et al., 1992). La Figure 2A résume ses principales caractéristiques et la Figure 2B présente sa structure tridimensionnelle.

La région carboxy-terminale (C-ter) de la PrP<sup>C</sup> présente une structure globulaire comprenant trois hélices  $\alpha$  et deux feuillets  $\beta$ , tandis que sa région amino-terminale (N-ter) est non structurée et flexible (James et al., 1997; Riek et al., 1996). Cette protéine présente deux sites potentiels de glycosylation (Caughey et al., 1989) et un pont disulfure intramoléculaire (Turk et al., 1988). Un peptide signal N-terminal, coupé au cours de la maturation de la protéine, permet son adressage au réticulum endoplasmique (RE). Un peptide signal C-terminal permet son ancrage à la surface externe des cellules, après coupure du peptide et liaison d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Stahl et al., 1987). La région N-terminale contient 4 répétitions en tandem de 8 acides aminés, encadrée par deux régions polybasiques. Cette région octapeptide répété, très conservée parmi les mammifères (Harris et al., 1991; Kim et al., 2008), est capable de lier des cations métalliques, en particulier l'ion cuivre II (Aronoff-Spencer et al., 2000; Brown et al., 1997a; Viles et al., 1999). Ces ions métalliques favorisent la formation de liaisons électrostatiques entre les domaines N-ter et C-ter de la protéine, qui lui confèrent une structure plus compacte et permettent de réguler ses fonctions physiologiques (Evans and Millhauser, 2017).

Dans les conditions physiologiques, la  $PrP^{C}$  peut être coupée suivant deux voies : d'une part, la coupure  $\alpha$ , à l'interface entre domaine polybasique et région hydrophobe (résidus 110 – 111 pour la PrP humaine), qui produit les fragments N-terminal N1 et C-terminal C1, et, d'autre part, la coupure  $\beta$ , au niveau de la région octapeptide répété entre une histidine et une glycine, qui produit les fragments N2 et C2 (Chen et al., 1995; McDonald et al., 2014). Les mécanismes de ces coupures ne sont pas élucidés avec précision, mais des métalloprotéases de la famille ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) pourraient être impliquées, avec un rôle de cofacteur pour les ions Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>, et donc une régulation de ces coupures par les cycles rédox de ces métaux (McDonald et al., 2014). Ces coupures pourraient avoir un rôle neuroprotecteur (Fluharty et al., 2013; Guillot-Sestier et al., 2009, 2012; McDonald and Millhauser, 2014).

Deux autres glycoprotéines appartiennent à la même famille que la PrP : Doppel (Moore et al., 1999) et Shadoo (Premzl et al., 2003). Ces protéines transmembranaires N-glycosylées sont similaires à la partie globulaire C-terminale de la PrP pour Doppel (Figure 2C) et au domaine N-terminal non structuré de la PrP pour Shadoo (Figure 2D). Le polymor-phisme de Shadoo a une influence sur le risque de développer la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) (Beck et al., 2008), ce qui peut s'expliquer par l'interaction existante entre PrP et Shadoo, qui semble avoir une influence sur le repliement et la dynamique structurale de la PrP (Ciric et al., 2015).

Les souris modifiées génétiquement pour ne pas exprimer la PrP sont viables et se développent sans phénotype particulier (Büeler et al., 1992; Prusiner et al., 1993) ni anomalie majeure au niveau de leur transcriptome à l'âge adulte (Khalifé et al., 2011). Ces modèles animaux n'ont donc pas permis d'élucider les fonctions physiologiques de la PrP<sup>C</sup> qui ne sont, encore aujourd'hui, probablement pas connues de façon exhaustive (Castle and Gill, 2017), bien que la forte homologie de séquence et de structure de la PrP<sup>C</sup> de différents mammifères suggère que son rôle est essentiel (Wopfner et al., 1999).

De manière générale, la PrP<sup>C</sup> est décrite comme protectrice contre un stress endogène ou environnemental, en particulier contre le stress oxydant, dans différents modèles de cellules neuronales ou non, dans des levures modifiées pour exprimer PrP de façon hétérologue, et *in vivo* (Westergard et al., 2007). Ainsi, sa surexpression protège les cellules de l'apoptose induite par la voie Bax, importante dans les neurones (Yuan and Yankner, 2000), en cellules de mammifères (Roucou et al., 2005) et dans des modèles de levures modifiées pour exprimer la PrP (Li and Harris, 2005).



#### Figure 2 : Structure de la protéine prion cellulaire, de Doppel et de Shadoo

A : Principales caractéristiques de la PrP<sup>C</sup> humaine (Aguzzi et al., 2008; Castle and Gill, 2017; Evans and Millhauser, 2017). Les nombres correspondent aux positions des acides aminés. Le peptide signal N-terminal permet l'adressage au réticulum endoplasmique (RE). La région octapeptide répété peut interagir avec des ions divalents, dont le Cu<sup>2+</sup>. Les deux régions polybasiques sont représentées en bleu clair et la région hydrophobe (RH) en jaune. La région structurée présente trois hélices  $\alpha$  (h $\alpha$ ) et deux feuillets  $\beta$  ( $\beta$ ), représentés en rouge et en bleu, respectivement. Un pont disulfure (S-S) se forme entre les acides aminés 179 et 214. La protéine présente deux sites de glycosylation accessoires aux positions 181 et 197. Le peptide signal C-terminal est coupé dans le RE, et une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) est ajoutée. Les sites de coupure  $\alpha$  et  $\beta$  sont indiqués par les pointillés en bleu clair. B : Structure en ruban de la PrP<sup>C</sup> humaine. Adapté de (Castle and Gill, 2017) (CC BY 4.0). C : Principales caractéristiques de Doppel (Castle and Gill, 2017; Westaway et al., 2011). D : Principales caractéristiques de Shadoo (Castle and Gill, 2017; Westaway et al., 2011).

La fonction la plus décrite de la PrP<sup>C</sup> concerne l'homéostasie du cuivre. Les ions cuivre et zinc (Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>) sont des cofacteurs essentiels à la dismutation de l'anion radicalaire  $O_2$ <sup>--</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> catalysée par la superoxyde dismutase 1 (Zelko et al., 2002), mais une concentration trop importante en Cu<sup>2+</sup> est neurotoxique et participe à la pathogénèse de maladies neurodégénératives (Mezzaroba et al., 2019; Waggoner et al., 1999). La région Nterminale de la PrP<sup>C</sup> est capable de fixer les ions Cu<sup>2+</sup> (Brown et al., 1997a) au niveau de son domaine octapeptide répété (Walter et al., 2006), induisant un changement de conformation de sa partie N-terminale flexible associé à une plus grande accessibilité de ce domaine au solvant, mise en évidence par une approche de spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium (Lu et al., 2018). Cette régulation de l'homéostasie du cuivre par la PrP<sup>C</sup> est associée à une activité protectrice vis-à-vis du stress oxydant (Vassallo and Herms, 2003). La carbonylation des protéines et la péroxydation des lipides, qui sont des dommages oxydatifs, sont plus importantes dans les cerveaux de souris n'exprimant pas la PrP que chez des souris sauvages (Wong et al., 2001). Des neurones primaires de souris n'exprimant pas la PrP sont également plus sensibles que des neurones de souris sauvages à des traitements par des oxydants comme la xantine oxydase (Brown et al., 1997b). Cette fonction antioxydante semble protectrice vis-à-vis de certains pathogènes comme le virus de la grippe (Chida et al., 2018; Sakaguchi and Chida, 2020). Outre la capacité de la PrP à réguler l'homéostasie du cuivre, cette activité antioxydante s'explique par la régulation positive de certaines superoxyde dismutases : en effet, les superoxydes dismutases à cuivre-zinc ont une activité réduite chez des souris n'exprimant pas la PrP par rapport à des souris sauvages (Brown et al., 1997b). Une étude plus récente montre que l'expression et l'activité de la SOD2, une superoxyde dismutase mitochondriale à manganèse, sont augmentées par les fragments N1 et N2, produits N-terminaux des coupures  $\alpha$  et  $\beta$  de la PrP<sup>C</sup> (Collins et al., 2018). La PrP pourrait de plus avoir une activité superoxyde dismutase après coupure  $\beta$ , conditionnée par l'interaction du domaine octapeptide répété avec Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> (Stańczak and Kozlowski, 2007).

La PrP joue également un rôle dans l'adhésion cellulaire *via* son interaction avec la protéine d'adhésion cellulaire du système neuro-musculaire N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) (Santuccione et al., 2005; Schmitt-Ulms et al., 2001), avec la laminine (Graner et al., 2000) et avec son récepteur (Hundt et al., 2001). Elle participe ainsi à la transmission synaptique, à la formation des neurites et des synapses (Kanaani et al., 2005), mais aussi, par exemple, au maintien de l'intégrité de l'épithélium bronchique (Kouadri et al., 2018). Ce rôle d'adhésion est essentiel au développement embryonnaire des poissons zèbre, qui possèdent deux homologues de la PrP dont l'expression est indispensable à la viabilité des animaux (Málaga-Trillo et al., 2011). Ce rôle dans le développement existe également chez les mammifères (Halliez et al., 2014; Khalifé et al., 2011). La PrP<sup>C</sup> pourrait ainsi être capable de réguler la voie Notch, qui intervient dans le développement, mais aussi dans le maintien des cellules souches neurales (Martin-Lannerée et al., 2017). Ainsi, la PrP<sup>C</sup> apparaît impliquée dans l'homéostasie des cellules souches, au cours du développement comme à l'âge adulte (Le Corre et al., 2019; Lopes and Santos, 2012; Zhang et al., 2006a). Cette fonction physiologique de la PrP<sup>C</sup> pourrait jouer un rôle dans l'oncogenèse, en favorisant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Le Corre et al., 2019), mais également en les protégeant vis-à-vis de l'apoptose (Martin-Lannerée et al., 2014).

Beaucoup des fonctions décrites pour la PrP<sup>C</sup>, dont ses rôles dans l'adhésion, la prolifération, la migration et la survie des cellules, sont associées à son rôle dans différentes voies de signalisation impliquant des kinases de la famille Src (Ochs and Málaga-Trillo, 2014). La Figure 3A présente de manière simplifiée ces différentes voies de signalisation. La Figure 3B présente plus en détails l'activation par la PrP<sup>C</sup> des kinases ERK1/2 (*extracellular signal*regulated kinases), qui jouent un rôle dans la prolifération, la croissance et la survie des cellules (Grewal et al., 1999), dans le contexte neuronal et non-neuronal. Au niveau des neurites des neurones sérotoninergiques et noradrénergiques différenciés, la liaison à la PrP<sup>C</sup> d'un anticorps mimant un ligand physiologique active la tyrosine kinase Fyn via la cavéoline 1 (Mouillet-Richard et al., 2000). Comme pour d'autres récepteurs membranaires, cette fonction paraît dépendante de la dimérisation de la PrP induite par l'anticorps mimant le ligand, première étape pour la transduction du signal (Roucou, 2014). Cette voie de signalisation n'est retrouvée que dans les neurones, mais, dans tous les types cellulaires étudiés, la stimulation de la PrP<sup>C</sup> conduit à la formation transitoire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), espèces oxydantes dérivées de l'oxygène. Ce phénomène dépend de la NADPH oxydase (NOX), qui catalyse l'oxydation de la NADPH, libérant l'anion superoxyde O2.-. Ces ERO jouent un rôle de seconds messagers et recrutent les protéines ERK1/2 dans l'ensemble des types cellulaires étudiés (Schneider et al., 2003).



#### Figure 3 : Principales voies de signalisation impliquant la PrP<sup>C</sup>

A : Bilan des principales voies de signalisation médiées par la PrP impliquant la phosphorylation de kinases de la famille de Src (SFK), activant en aval différentes voies impliquées dans l'adhésion, la différentiation, la prolifération et la migration des cellules, l'apoptose, l'endocytose et l'immunité (Ochs and Málaga-Trillo, 2014).

B : Activation des kinases ERK par des voies de signalisation dépendant de la PrP<sup>C</sup> via la production d'ERO comme seconds messagers, avec médiation par la Src kinase Fyn dans les neurones (en haut), ou via des intermédiaires différents dans les cellules non neuronales (en bas) (Schneider et al., 2003, 2004).

AP-2 : *activating protein 2*, BACE1 : β-sécrétase 1, ERK1/2 : *extracellular signal-regulated kinases*, Hakai : ubiquitine ligase E3, MBP : *myelin basic protein*, mGluR5 : *metabotropic glutamate receptor 5* (récepteur métabotrope au glutamate 5), NCAM : *neural cell adhesion molecule*, PKB : protéine kinase B, PSD95 : *postsynaptic density protein 95*, rEGF : récepteur de l'*epidermal growth factor* (facteur de croissance épidermique), rNMDA : récepteur N-méthyl-D-aspartate.

Le rôle de signalisation de la PrP<sup>C</sup> favorise donc la survie cellulaire, mais une surstimulation des voies utilisant des ERO comme seconds messagers pourrait être toxique. Ainsi, des études indiquent que certains anticorps dirigés contre la partie globulaire C-terminale de la PrP pourraient être associés à une augmentation massive de la concentration en ERO dans les neurones, aboutissant à leur mort (Reimann and Aguzzi, 2018). Cette toxicité pourrait être due à une suractivation de la NADPH oxydase 2 par le domaine N-terminal de la PrP, qui conduirait à une libération trop importante d' $O_{2^{-}}$  (Sonati et al., 2013). Les auteurs suggèrent ainsi que la fonction exécutive du domaine N-terminal de la PrP puisse être régulée par son domaine C-terminal, ce qui a été confirmé par des travaux plus récents (Evans and Millhauser, 2017; Wu et al., 2017).

#### 1.1.1.3. Propagation de la conformation PrP<sup>Sc</sup> et neurodégénérescence

De manière générale, les maladies à prions se transmettent bien plus facilement entre individus d'une même espèce qu'entre individus d'espèces différentes : c'est la barrière d'espèce. Une importante homologie de séquence primaire entre la PrP<sup>C</sup> de l'hôte et la PrP<sup>Sc</sup> infectante facilite la transmission de la maladie (Béringue et al., 2008a; Prusiner et al., 1990; Scott et al., 1993). Pour que la barrière d'espèce soit franchie, la PrP<sup>C</sup> de l'hôte doit pouvoir adopter la même conformation que la PrP<sup>Sc</sup> infectante (Béringue et al., 2008a). Même si le mécanisme de la conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> reste putatif, des données de modélisation mathématique ainsi que l'analogie avec la polymérisation des prions de levure suggèrent qu'il s'agit d'un mécanisme auto-entretenu divisé en deux étapes : mépliement et polymérisation de la PrP<sup>C</sup> par contact avec un noyau oligomérique de PrP<sup>Sc</sup> généré spontanément ou introduit accidentellement, puis fragmentation de l'assemblage amyloïde ainsi formé, libérant de nouveaux noyaux de conversion capables à leur tour de recruter et convertir des monomères de PrP<sup>C</sup>, entretenant ainsi la réaction (MacLea, 2017; O'Carroll et al., 2020; Wang and Wu, 2017) (Figure 4).



# Figure 4 : Mécanisme putatif de propagation de la conformation PrP<sup>sc</sup> par nucléation, conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>, polymérisation et fragmentation

Des noyaux de polymérisation constitués d'oligomères de PrP<sup>Sc</sup> sont générés spontanément (cas des maladies à prions sporadiques ou génétiques) ou introduits accidentellement (cas des maladies à prions transmises, par exemple par voie alimentaire). Ils sont capables de séquestrer des monomères de PrP<sup>C</sup>, qui adoptent alors la conformation PrP<sup>Sc</sup>. Ainsi, la taille de l'agrégat augmente par incorporation et conversion de molécules de PrP<sup>C</sup>. A partir d'une certaine taille, l'agrégat libère des fragments oligomériques de PrP<sup>Sc</sup>, qui deviennent donc autant de nouveaux noyaux de polymérisation. Il s'agit ainsi d'une réaction auto-entretenue (Beringue, 2017; O'Carroll et al., 2020).

Les structures tertiaire et quaternaire de la PrP<sup>Sc</sup> ne sont connues qu'à faible résolution (Diaz-Espinoza and Soto, 2012). En effet, l'étude à haute résolution de la structure de la PrP<sup>Sc</sup> est difficile en raison de son insobubilité et de sa propension à s'agréger (Wille and Requena, 2018). Des techniques biophysiques ont permis d'établir qu'elle est fortement enrichie en feuillets  $\beta$  (43% de feuillets  $\beta$  dans la Prp<sup>Sc</sup> contre 3% dans la PrP<sup>C</sup>) (Pan et al., 1993) et agrégée, avec une polydispersité de tailles chez un même individu (Laferrière et al., 2013; Tixador et al., 2010) et d'un individu à l'autre (Collinge and Clarke, 2007). Plusieurs modèles ont été proposés pour la structure de la PrP<sup>Sc</sup> (Figure 5), dont aucun ne peut expliquer à lui seul l'ensemble des données expérimentales, dont l'hétérogénéité des assemblages observés : une coexistence entre ces modèles est envisageable (Diaz-Espinoza and Soto, 2012; Wille and Requena, 2018).





A : Le modèle de l'hélice  $\beta$  (Govaerts et al., 2004) est basé sur des données de microscopie électronique. Il consiste en un repliement de la partie N-terminale de la PrP<sup>C</sup> (résidus 90 à 177) en une hélice gauche formée de feuillets  $\beta$ . Les trois hélices  $\alpha$  de la PrP<sup>C</sup> sont conservées. Les molécules de PrP<sup>Sc</sup> s'assemblent en trimères qui sont empilés pour former des fibres.

B : Le modèle de la spirale  $\beta$  (DeMarco and Daggett, 2004) est basé sur des simulations des modifications conformationnelles de la PrP<sup>C</sup> à faible pH. Comme pour le modèle de l'hélice  $\beta$ , les trois hélices  $\alpha$  sont conservées et la partie N-terminale est repliée en feuillets  $\beta$ . De courts brins  $\beta$  sont également formés entre les résidus 116-119, 129-132, 135-140 et 160-164. Les monomères s'assemblent sous forme de spirale.

C : Dans le modèle feuillets  $\beta$  *in-register*, basé sur l'étude structurale par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse de PrP recombinante (Cobb et al., 2007) et extractive (Smirnovas et al., 2011), aucune des caractéristiques structurales de la PrP<sup>C</sup> n'est conservée. L'ensemble de la protéine est réarrangé sous forme de feuillets  $\beta$ , reliés par des boucles courtes et empilés entre eux.

D : Le modèle en  $\beta$ -solénoïde est fondé sur une étude par cryo-microscopie électronique qui a permis d'identifier des fibrilles formées de deux protofilaments (à gauche). Le schéma de droite indique la configuration potentielle des monomères, réarrangés en feuillets  $\beta$ . Ce modèle ne fournit pas d'information structurale au niveau atomique.

E : Ce modèle est basé sur la structure de fibres de PrP humaine recombinante, obtenue par cryo-microscopie électronique à l'échelle atomique.

A, B, C : adapté de (Diaz-Espinoza and Soto, 2012) (CC BY 2.0). D : adapté de (Vázquez-Fernández et al., 2016) (CC BY 4.0). E : adapté avec l'autorisation de Springer Nature de (Wang et al., 2020b) (© 2020, Springer Nature).

A l'exception du modèle feuillets  $\beta$  *in-register*, tous ces modèles sont fondés sur la répétition périodique d'une structure oligomérique, qui pourrait correspondre au motif répété visible en microscopie à force atomique au niveau de la structure de certaines fibres de PrP recombinante (Figure 6A). Cette sous-unité élémentaire (suPrP), de l'ordre du trimère, paraît nécessaire et suffisante pour la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Igel-Egalon et al., 2017). Les fibres de PrP<sup>Sc</sup> seraient ainsi constituées de sous-unités élémentaires reliées entre elles par des liaisons faibles. Il existerait un équilibre dynamique entre ces deux niveaux d'assemblage (Figure 6B). Le mécanisme d'élongation des fibres de PrP<sup>Sc</sup> n'est pas connu : les monomères pourraient être intégrés un à un, ou de façon concertée (Figure 6C). Toutefois, la structure atomique de fibres obtenues *in vitro* à partir de protéine prion humaine recombinante a été publiée récemment (Wang et al., 2020b). Ces fibres ont un cœur amyloïde formé de deux protofibrilles entrelacées en une hélice gauche, et chaque protomère de PrP est entièrement réarrangé sous forme de feuillets  $\beta$ . Cette structure est compatible avec le modèle *in register*, et partiellement compatible avec le modèle  $\beta$ -solénoïde (Wang et al., 2020b), et ne correspond pas à un empilement de sous-unités oligomériques.



#### Figure 6 : La sous-unité élémentaire à la base de la formation des fibres de PrP<sup>sc</sup>

A : Cliché en microscopie à force atomique (AFM) d'une fibre de PrP humaine recombinante. B : La suPrP (en rouge) est constituée de 3±1 trois monomères de PrP reliés entre eux par des interactions fortes. Cet état est en équilibre avec les fibres de PrP<sup>Sc</sup>, constituées de sousunités élémentaires reliées par des interactions plus faibles.

C : Schématisation de deux hypothèses pour l'intégration des monomères de PrP<sup>C</sup> (en bleu) : intégration séquentielle des monomères au niveau d'une interface de polymérisation impliquant le changement de conformation de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (jaune) (ligne du haut) et intégration concertée de n=3 monomères (ligne du bas).

Adapté d'une figure d'Angélique Igel-Egalon et Davy Martin (CC BY-NC 2.0).

Les mécanismes de la neurodégénérescence intervenant dans les maladies à prions ne sont pas entièrement élucidés, mais le mépliement en PrP<sup>Sc</sup> de la PrP<sup>C</sup> endogène en est un élément clé. Suite à l'infection prion de souris transgéniques PrP<sup>0/0</sup> dans le cerveau desquelles a été greffé du tissu neural surexprimant la PrP<sup>C</sup>, la PrP<sup>Sc</sup> s'accumule dans les greffons, qui développent les caractéristiques histopathologiques de l'infection. La PrP<sup>Sc</sup> est également capable de migrer dans le reste du cerveau, mais, même dans les zones au voisinage du greffon, le tissu PrP<sup>0/0</sup> n'est pas endommagé par l'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> (Brandner et al., 1996). Une autre étude montre que l'inhibition de l'expression de la PrP<sup>C</sup> chez des souris présentant une infection prion avancée conduit, non seulement à l'arrêt de la progression de la maladie, mais également à la régression de la spongiose : les souris survivent, alors que les niveaux de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau restent aussi élevés qu'au stade terminal de la maladie (Mallucci et al., 2003). Ainsi, ces deux études démontrent sans ambiguité que la PrP<sup>Sc</sup> n'est pas toxique *per se*, mais uniquement en présence de PrP<sup>C</sup>. Il est de plus nécessaire que la PrP<sup>C</sup> soit convertible en PrP<sup>Sc</sup> : en effet, l'infection par une souche de tremblante du mouton de neurones et d'astrocytes primocultivés exprimant la PrP<sup>C</sup> ovine conduit à leur mort, tandis que les mêmes modèles cellulaires exprimant une PrP<sup>C</sup> murine ou humaine, non convertible par l'inoculum de PrP<sup>Sc</sup> ovine, ne présentent pas de cytotoxicité après inoculation (Cronier et al., 2012). Ainsi, la toxicité de la PrP<sup>Sc</sup> passe par l'expression d'une PrP<sup>C</sup> convertible.

L'interaction de la PrP<sup>C</sup> avec la PrP<sup>Sc</sup> pourrait lever la régulation par le domaine Cterminal de l'activité pro-oxydante et cytotoxique du domaine N-terminal (Evans and Millhauser, 2017; Sorce et al., 2014; Wu et al., 2017) : la fonction physiologique de signalisation cellulaire de la PrP<sup>C</sup>, qui passe par l'activation de la NADPH oxydase NOX2 et la libération d'ERO, serait dérégulée, conduisant à une surproduction d'ERO, toxiques en trop grande quantité (Schneider et al., 2004; Sorce et al., 2014). Un stress oxydant cellulaire, associé à une altération de l'homéostasie des métaux, est ainsi observé au cours de la pathogénèse précoce des maladies à prions (Waggoner et al., 1999). Les protéines du cerveau des patients présentent des altérations oxydatives (Pamplona et al., 2008) et ce stress oxydant participe à la neurodégénérescence (Singh et al., 2010).

Les mécanismes de maintien de la protéostasie cellulaire, en particulier l'UPR (*un-folded protein response*), qui déclenche à terme l'apoptose, jouent un rôle déterminant dans la neurodégénérescence. En effet, cette voie est suractivée dans le cas des maladies à prions, et, chez la souris, son inhibition est associée à une augmentation de la durée de survie et à une atténuation des signes cliniques (Moreno et al., 2013). Ce mécanisme apparaît commun à un grand nombre de maladies neurodégénératives, dont les maladies à prions, mais aussi la maladie d'Alzheimer, et de manière générale les protéinopathies (Freeman and Mallucci, 2016).

Il apparaît que les espèces les plus neurotoxiques *in vitro* et *in vivo* ne sont pas les fibres de PrP<sup>Sc</sup>, mais des oligomères subfibrillaires, plus mobiles (Kazlauskaite et al., 2005; Silveira et al., 2005; Simoneau et al., 2007).

#### 1.1.1.4. Notion de souches dans les maladies à prions

Malgré ce mécanisme de propagation de l'agent infectieux commun à toutes les maladies à prions, elles peuvent, chez une même espèce hôte, être associées à des phénotypes physiopathologiques très différents au niveau du temps d'incubation de la maladie (Figure 7A) et du profil des lésions observées : distribution des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> et morphologie des vacuoles observées dans le cerveau (Figure 7B). Par analogie avec les agents infectieux conventionnels, ces différentes maladies sont appelées souches de prions (Collinge and Clarke, 2007). Au niveau biochimique, les souches sont caractérisées par des différences au niveau du profil électrophorétique de la PrP<sup>Sc</sup>, qui traduisent des variations dans les proportions relatives des trois glycoformes et dans le degré de résistance à la dégradation par la protéinase K (Figure 7C), et au niveau de la distribution de taille des agrégats de PrP<sup>Sc</sup> présents dans le cerveau (Figure 7D).

De plus, même au sein du même patient, les assemblages de PrP<sup>sc</sup> sont hétérogènes entre eux, au niveau non seulement de leur taille, mais également de leurs propriétés biochimiques, dont la résistance à la protéinase K, et de leur structure : cela pourrait se rapprocher de la notion de quasi-espèce (Igel-Egalon et al., 2019). Il est difficile de prédire quels assemblages sont les plus neurotoxiques. L'une des premières études menées dans ce sens démontre que, concernant la souche 263K, ce sont des assemblages de 14 à 28 protomères (Silveira et al., 2005). Cependant, pour les souches lentes (pour lesquelles le temps d'inubation est élevé chez la souris), ce sont les plus gros assemblages qui apparaissent les plus toxiques (Igel-Egalon et al., 2019). Pour la souche LA21K *fast*, les assemblages les plus toxiques sont les plus résistants à la protéinase K, mais cela pourrait également être souchedépendant (Igel-Egalon et al., 2019).



#### Figure 7 : Caractéristiques de deux souches de prions

Les souches de prions se distinguent par leurs caractéristiques biologiques, comme le temps d'incubation de la maladie (A), la distribution des agrégats de PrP<sup>Sc</sup> et des vacuoles dans le cerveau (B). Ces différences sont associées à la variabilité des propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup>, comme la proportion des trois glycoformes, visible sur les profils élecrophorétiques (C) ou la distribution de tailles des agrégats, visible par vélocité de sédimentation (technique décrite par (Tixador et al., 2010)) (D).

Figure adaptée de (Beringue, 2017) (CC BY-NC-ND 4.0).

#### 1.1.1.5. Les maladies à prions : enjeux majeurs de santé publique

#### 1.1.1.5.1. Etiologie des maladies à prions humaines

Chez l'homme, les maladies à prions sont très rares, avec des taux de mortalité annuels compris entre 1 par million entre 2004 et 2006 et 1,4 par million en 2013 (Maddox et al., 2020). La Table I présente les maladies à prions humaines classées en fonction de leur étiologie : sporadique, génétique, alimentaire ou iatrogène. La maladie de Creutzfeldt Jakob sporadique (sMCJ) représente 85% des cas de maladies à prions humaines diagnostiqués. Après une incubation silencieuse de plusieurs années, la phase clinique dure en moyenne 5 à 6 mois. Les symptômes peuvent inclure troubles de la mémoire et du langage, vertiges, troubles du sommeil, dépression, troubles visuels, et évoluent généralement vers un mutisme akinétique. L'âge moyen du décès est de 68 ans (Wadsworth and Collinge, 2007). Environ 15% des maladies à prions sont d'origine génétique, dues à une mutation du gène codant la PrP : la MCJ génétique diffère de la sMCJ par le plus jeune âge des patients et une phase clinique plus longue, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker se manifeste par des troubles proches de ceux de la maladie de Parkinson, et l'insomnie fatale familiale se traduit par des insomnies progressivement accompagnées de troubles cognitifs et d'hallucinations, avec une phase clinique de 15 mois environ (Takada and Geschwind, 2013). Les maladies à prions peuvent enfin être transmises par voie alimentaire ou iatrogène. Une épidémie de kuru, maladie qui se manifeste par une ataxie cérebelleuse progressive, a été décrite dans une population aborigène de Papouasie Nouvelle Guinée au début du XX<sup>e</sup> siècle (Gajdusek and Zigas, 1957). Le caractère infectieux de cette maladie a été démontré sans ambiguïté par transmission expérimentale à différents primates non humains par Daniel Carleton Gajdusek, récompensé pour ces travaux par le prix Nobel de médecine, et ses collègues (Gajdusek et al., 1966, 1968). Des pratiques de cannibalisme rituel étaient à l'origine de cette épidémie (Mathews et al., 1968), qui a été enrayée par l'interdiction de la consommation des défunts et a causé au total 2700 décès environ (Liberski et al., 2012). Dans les années 1980, le passage de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), ou « maladie de la vache folle » à l'homme par voie alimentaire a conduit à l'émergence du variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob (vMCJ), causant une crise sanitaire sans précédent (Will et al., 1996). Le vMCJ se
distingue de la sMCJ par des patients plus jeunes (27 ans en moyenne), une phase clinique plus longue (15 mois en moyenne), une prédominance des symptômes psychiatriques par rapport à la démence, et la présence de plaques florides, c'est-à-dire entourées de microvacuoles (Ferrer, 2002; Will et al., 1996). Les principaux cas de transmission iatrogène de la MCJ rapportés sont dûs à des greffes de cornée ou de dure-mère (Lang et al., 1998) ou des traitements avec de l'hormone de croissance purifiée à partir de glandes pituitaires de cadavres et non décontaminée. En France, 1443 personnes ont été traitées par cette hormone de croissance extractive entre 1982 et 1985, dont 119 avaient déclaré la maladie en 2018 (Peckeu et al., 2018). D'autres voies de transmission ont été démontrées, comme la transfusion sanguine (Andréoletti et al., 2012; Peden et al., 2004), avec 3 décès associés à la MCJ identifiés en Grande Bretagne sur 67 receveurs transfusés avec des produits sanguins issus de donneurs alors en phase d'incubation de cette maladie (Urwin et al., 2016). Aujourd'hui, les dons du sang sont protégés par des mesures d'exclusion sur des critères géographiques : en France, les donneurs ayant séjourné au Royaume-Uni entre 1980 et 1996 sont exclus (Etablissement français du sang, 2020), et, au Canada, c'est également le cas des donneurs ayant séjourné en France pendant la même période (Société canadienne du sang, 2020). La déleucocytation systématique des produits sanguins à usage thérapeutique permet également de réduire le risque associé (Krailadsiri et al., 2006).

Une étude épidémiologique réalisée en Grande-Bretagne sur les appendices de 32 441 individus nés entre 1941 et 1985 indique que 16 sont porteurs de la PrP<sup>Sc</sup> associée au vMCJ, ce qui correspond à une prévalence comprise entre  $282 \times 10^{-6}$ , soit  $\frac{1}{3 546'}$  et  $801 \times 10^{-6}$ , soit  $\frac{1}{1248}$  (Gill et al., 2013). Environ une personne sur 2000 serait donc aujourd'hui porteuse saine de la maladie en Grande-Bretagne. Parmi ces individus, certains sont hétéro-zygotes ou homozygotes pour la valine au codon 129 de la PrP. Or, la plupart des malades recensés sont homozygotes pour la méthionine (Kaski et al., 2009). Il est possible que les individus hétérozygotes ou homozygotes pour la valine aient une période d'incubation de la maladie plus longue (Bishop et al., 2006; Takada and Geschwind, 2013). Certains de ces porteurs asymptomatiques pourraient donc être en phase d'incubation, et ils pourraient transmettre la maladie de façon iatrogène. La France est le deuxième pays le plus touché par

l'épidémie de vMCJ : l'exposition au risque y est estimée comme environ dix fois plus faible qu'au Royaume-Uni (Hewitt and Will, 2019).

Etiologie	Maladie	Spécificités
Sporadique	MCJ spora-	- Phase clinique de 5 à 6 mois
(≈85% des cas)	dique	- Âge moyen au décès : 68 ans
Génétique (≈15% des cas)	MCJ génétique	<ul> <li>Phase clinique plus longue que pour la MCJ</li> <li>sporadique</li> <li>Âge moyen au décès : &lt; 55 ans</li> </ul>
	Syndrôme de Gerstmann- Sträussler- Scheinker	<ul> <li>Symptômes proches de la maladie de Parkinson</li> <li>Phase clinique de 3 à 8 ans</li> </ul>
	Insomnie fa- tale familiale	<ul> <li>Insomnies progressivement accompagnées de troubles cognitifs et d'hallucinations</li> <li>Phase clinique de 15 mois environ</li> </ul>
Transmission par voie alimentaire	Kuru	<ul> <li>Ataxie cérébelleuse progressive</li> <li>Incubation très longue</li> <li>Transmission par cannibalisme rituel</li> </ul>
	Variant de la MCJ	<ul> <li>Symptômes psychiatriques prédominants</li> <li>Phase clinique de 15 mois environ</li> <li>Âge moyen au décès : 27 ans</li> <li>Transmission par consommation de viande is- sue de bovins contaminés par l'ESB</li> </ul>
Iatrogène	MCJ iatrogène	<ul> <li>Modes de transmission décrits :</li> <li>Greffes de cornée ou de dure-mère</li> <li>Traitement par hormone de croissance extrac- tive</li> <li>Transfusion sanguine</li> </ul>

Table I : Maladies à prions humaines

### 1.1.1.5.2. Risque zoonotique associé aux maladies à prions animales

Bien que l'incidence de l'ESB dans les élevages ait fortement diminué dans le monde entier, notamment suite à l'interdiction de l'utilisation comme complément alimentaire de farines animales de viandes et d'os, des cas épisodiques, potentiellement sporadiques, sont encore recensés aujourd'hui (Figure 8) (Corona et al., 2017). Certains de ces cas sont atypiques et présentent un potentiel zoonotique particulièrement préoccupant, en raison d'une barrière d'espèce moindre (Béringue et al., 2008b; Jaumain et al., 2016).



#### Figure 8 : Incidence annuelle de l'ESB au Royaume-Uni et dans le monde

Nombre de cas autochtones rapportés par million de bovins âgés de plus de 24 mois entre 1989 et 2016, au Royaume-Uni et dans les 27 autres pays membres de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE). Données issues de (Organisation mondiale de la santé animale, 2016).

Même si l'ESB reste la seule maladie à prions non humaine dont la transmissibilité à l'homme est établie de manière certaine, d'autres maladies à prions animales présentent un potentiel zoonotique. Ainsi, la tremblante du mouton classique est transmissible à un modèle primate, avec un temps d'incubation environ quatre fois plus long que l'ESB (Comoy et al., 2015), et à des modèles de souris transgéniques exprimant la PrP<sup>C</sup> humaine (Cassard et al., 2014). Cela ne semble pas être le cas de la tremblante atypique (Comoy et al., 2015), qui représente la majorité des cas de tremblante détectés aujourd'hui (Tortereau, 2013). Deux autres maladies à prions animales sont préoccupantes. La maladie du dépérissement chronique des cervidés, connue en Amérique du Nord depuis la fin des années 1960, est une encéphalopathie spongiforme transmissible qui touche les cerfs, les rennes et les élans (Williams and Young, 1980). L'agent infectieux est excrété dans les urines des animaux et persiste fortement dans l'environnement, ce qui conduit à une dissémination difficile à contrôler (Almberg et al., 2011). Le premier cas européen a été décrit en Norvège en 2016 (Benestad et al., 2016). Cette maladie est préoccupante en raison de sa forte contagiosité et de l'incertitude concernant un potentiel risque zoonotique, en particulier pour les consommateurs de viande de renne (Mysterud and Edmunds, 2019). C'est également le cas de la « camel-prion *disease* », qui touche les dromadaires. La fréquence de cette maladie a été estimée à 3,1% dans deux abattoirs algériens, et les premiers cas auraient été observés dès les années 1980. La PrP<sup>sc</sup> des dromadaires atteints est particulièrement concentrée dans les organes lymphoïdes périphériques, ce qui pourrait indiquer un pouvoir de dissémination important. La consommation de viande et de lait de dromadaire pourrait être associée à un risque zoonotique pour les populations concernées (Babelhadj et al., 2018).

#### 1.1.1.5.3. Des maladies aujourd'hui incurables

Les maladies à prions sont aujourd'hui incurables. Les stratégies thérapeutiques envisagées sont basées sur une diminution de l'expression de la PrP<sup>C</sup> ou de son interaction avec la PrP<sup>Sc</sup>, sur une inhibition de l'agrégation de PrP<sup>Sc</sup> ou encore sur la modulation de voies de signalisation associées à la PrP<sup>C</sup>. Les molécules envisagées comme potentiellement inhibitrices de la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> ont des effets différents selon le modèle considéré (Beringue et al., 2000) : les molécules prometteuses *in cellulo* ou même en modèles animaux se révèlent ainsi décevantes lors d'essais cliniques (Geschwind et al., 2013; Zafar et al., 2019). L'immunothérapie pourrait être une approche prometteuse, dans la mesure où la conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> semble se produire à la surface des cellules et est donc potentiellement accessible aux anticorps, mais la difficulté est de cibler des épitopes spécifiques de la PrP<sup>Sc</sup> (Ma and Ma, 2020). De plus, certains anticorps ciblant la partie C-terminale de la PrP se sont avérés neurotoxiques (Reimann and Aguzzi, 2018). Aujourd'hui, les études qui semblent les plus prometteuses chez l'animal sont basées sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens, capables d'inhiber la synthèse de la PrP<sup>C</sup> (Minikel Vallabh, 2019; Raymond et al., 2019; Reidenbach et al., 2020).

Les études menées chez l'homme sont difficiles à interpréter du fait des effectifs faibles dus à la rareté de la maladie, de l'absence de diagnostic à des stades précliniques et de la conception des expériences, qui sont le plus souvent des études observationnelles, comme des études cas-témoin, plutôt que des essais cliniques randomisés en double aveugle. Aucune des études menées chez l'homme n'a permis d'identifier avec certitude une stratégie thérapeutique permettant de prolonger le temps de survie (Varges et al., 2017). Aujourd'hui, la prise en charge médicale des patients atteints de ces maladies est palliative et a pour but de préserver l'autonomie du malade autant que possible, puis d'atténuer ses souffrances physiques et psychiques (Assistance publique hôpitaux de Paris, 2019).

#### 1.1.2. Maladie d'Alzheimer, protéine tau et peptide amyloïde bêta

Avec plus d'un million de malades en France, la maladie d'Alzheimer représente environ 70% des démences diagnostiquées (France Alzheimer, 2020). Au niveau biochimique, les deux lésions principales associées à cette maladie sont la dégénérescence neurofibrillaire, due à l'agrégation dans les neurones de la protéine tau hyperphosphorylée sous forme de faisceaux de filaments appariés en hélice, et les plaques séniles extracellulaires, constituées principalement du peptide amyloïde bêta (Aβ) (Alzheimer, 1911; Brion et al., 1985; Glenner and Wong, 1984).

# 1.1.2.1. Maladie d'Alzheimer et protéine tau

La dégénérescence neurofibrillaire associée à la maladie d'Alzheimer a été observée dès 1911 par Alois Alzheimer grâce à un marquage par la technique d'imprégnation argentique de Bielschowsky (Figure 9A) (Alzheimer, 1911). Cette lésion est associée à l'accumulation dans les neurones de filaments hélicoïdaux appariés (Kidd, 1963). La protéine tau hyperphosphorylée est le constituant majoritaire de ces dépôts (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986) (Figure 9B).



# Figure 9 : La dégénérescence neurofibrillaire est associée à l'agrégation de la protéine tau

A : Dessin par Alois Alzheimer de la dégénérescence neurofibrillaire d'après des observations de coupes de cortex d'un patient au stade final de la maladie marquées par la technique d'imprégnation argentique de Bielschowsky. Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature de (Alzheimer, 1911), © 1911, Springer Nature.

B : Immunomarquage de la protéine tau dans le cortex entorhinal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. La dégénérescence neurofibrillaire est indiquée par les flèches rouges. Adapté avec l'autorisation de Springer Nature de (Morales et al., 2012), © 2012, Springer Nature.

La protéine tau est la protéine associée aux microtubules la plus abondante dans les neurones matures (Iqbal et al., 2010). L'épissage alternatif de l'ARN messager codant tau conduit à la coexistence de six protéines isoformes dans le cerveau (Šimić et al., 2016) (Figure 10A). Toutes comportent trois domaines : un domaine N-terminal filamenteux, appelé domaine de projection, qui assure des fonctions de signalisation cellulaire (Morris et al., 2011), un domaine riche en prolines capable d'interagir avec l'actine (He et al., 2009) et un domaine de liaison aux microtubules constitué de trois ou quatre régions répétées (Šimić et al., 2016). La protéine tau stabilise ainsi les microtubules (Figure 10B), qui jouent à la fois un rôle de maintien de l'architecture axonale, et de rails pour le transport de vésicules (Kevenaar and Hoogenraad, 2015). Il s'agit d'une phosphoprotéine qui a d'autant moins d'affinité pour les microtubules que son niveau de phosphorylation est élevé. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la protéine tau est jusqu'à huit fois plus concentrée que dans des neurones sains et présente des niveaux de phosphorylation anormalement élevés (Grundke-Iqbal et al., 1986; Khatoon et al., 1992), avec des sites de phosphorylation spécifiques, différents de ceux qui sont observés dans le cerveau sain (Šimić et al., 2016) (Figure 10C). Cette hyperphosphorylation est associée à une diminution de l'affinité de tau pour les microtubules. La désagrégation des microtubules qui s'ensuit participe à la neurodégénérescence (Bloom, 2014; Iqbal et al., 2010).



# Figure 10 : Représentation schématique de la protéine tau

A : Représentations schématiques des six isoformes humaines de la protéine tau. Les exons 2 et 3 sont notés E2 et E3. Les régions répétées R1, R2, R3 et R4 correspondent aux exons 9, 10, 11 et 12 (Gibbons et al., 2019). Tous ces exons sont soumis à un épissage alternatif. B : Schématisation de l'interaction entre la protéine tau et les microtubules. Adapté d'une figure de Zwarck disponible sur wikimedia (CC BY-SA 2.5).

C : Représentation des sites de phosphorylation de la protéine tau dans les conditions physiologiques normales et dans le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (Šimić et al., 2016). Les sites indiqués en bleu sont spécifiques du cerveau sain, les sites en orange sont spécifiques du cerveau Alzheimer, les sites en vert sont communs au cerveau sain et au cerveau malade et les sites en gris ne sont pas entièrement caractérisés.

Dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la protéine tau hyperphosphorylée change de conformation et s'agrège sous forme de fibres amyloïdes capables de recruter les protéines tau monomériques (de Calignon et al., 2012; Metrick et al., 2020) en leur transférant leur mépliement (Gibbons et al., 2019), mais aussi sous forme d'assemblages plus petits (Iqbal et al., 2010). Les fibres amyloïdes observées peuvent être des filaments droits d'environ 15 nm de diamètre, des faisceaux de filaments hélicoïdaux appariés, qui sont des doubles hélices dont le diamètre varie entre 8 et 20 nm, et des filaments mixtes (Crowther, 1991). Des expériences de cryo-microscopie électronique ont récemment permis de décrire la structure de ces fibres (Fitzpatrick et al., 2017). Les filaments droits comme les filaments hélicoïdaux appariés sont formés de deux protofilaments en hélice (Figure 11A) dont le cœur amyloïde est constitué d'un empilement de feuillets  $\beta$  (Figure 11B). Ce sont les domaines répétés de liaison aux microtubules qui, après un réarrangement en feuillets  $\beta$ , forment ce cœur amyloïde (Figure 11C), le reste de la protéine formant un « manteau flou » diffus autour de la fibre (Figure 11D et E). Deux protofilaments peuvent s'associer sous forme de filaments droits ou de filaments hélicoïdaux appariés (Figure 11F).

Comme pour les maladies à prions, l'agrégation de tau peut être transmise par inoculation à des souris transgéniques d'homogénat de cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer (Clavaguera et al., 2014) et se propage de neurone à neurone, probablement *via* de petits noyaux de conversion libérés par fragmentation des fibres et transmis au niveau des synapses (Braak and Del Tredici, 2011; Gibbons et al., 2019). Heiko et Eva Braak ont décrit en 1991 six stades de la progression de la tauopathie et de la dégénérescence du cytosquelette dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Aux stades I et II, les enchevêtrements neurofibrilaires se limitent au cortex transentorhinal et la maladie est cliniquement silencieuse, aux stades III et IV, ils gagnent les régions limbiques, et ces stades correspondent généralement à l'apparition des premiers symptômes, et, aux stades V et VI, la région néocorticale est atteinte et l'ensemble des symptômes se manifestent (Braak and Braak, 1991).



# Figure 11 : Structure des fibres de tau observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer

A : Structure du cœur amyloïde des filaments droits (en vert) et des filaments hélicoïdaux appariés (en bleu). Les deux types de filaments sont formés de deux protofilaments.

B : Structure en feuillets  $\beta$  de trois spires du noyau du protofilament.

C : Structure secondaire des quatre domaines répétés des isoformes 4R de tau. Les huit feuillets  $\beta$  sont indiqués avec les mêmes couleurs que pour la figure B. Les résidus soulignés par des pointillés gris peuvent former un feuillet  $\beta$  supplémentaire.

D : Structure primaire de la plus longue isoforme de tau. Le motif E7F8E9 proche de l'extrémité N-terminale de tau est indiqué par un point bleu.

E : Vue longitudinale du protofilament. Les six isoformes de tau s'empilent de manière stochastique le long de l'axe de l'hélice. Les domaines non impliqués dans la formation du cœur amyloïde de la fibre forment un « manteau flou ».

F : Vue axiale d'un filament droit (à gauche) et de filaments hélicoïdaux appariés (à droite). Pour le filament droit, un feuillet  $\beta$  supplémentaire se forme au niveau de l'extrémité Nterminale d'un seul protofilament. L'extrémité N-terminale de l'autre protofilament se trouve à l'extérieur de la structure. Pour les filaments hélicoïdaux appariés, les extrémités N-terminales des deux protofilaments, réarrangées transitoirement en feuillets  $\beta$ , se trouvent au cœur de la structure.

Figure adaptée avec l'autorisation de Springer Nature de (Fitzpatrick et al., 2017), © 2017 Springer Nature.

# 1.1.2.2. Maladie d'Alzheimer et peptide amyloïde bêta

# 1.1.2.2.1. Le peptide Aβ agrégé, constituant majoritaire des plaques séniles

Comme les enchevêtrements neurofibrillaires, les plaques séniles ont été observées dès le début du XX<sup>e</sup> siècle par Alois Alzheimer, sous forme de masses sphériques extracellulaires (Figure 12A) (Alzheimer, 1911). Ces plaques sont constituées d'un cœur de fibres amyloïdes constituées du peptide Aβ, entouré de prolongements nerveux, de petits vaisseaux sanguins (Glenner and Wong, 1984) et de cellules microgliales (Haga et al., 1989).



# Figure 12 : Les plaques séniles sont associées à l'agrégation du peptide $A\beta$

A : Coloration de Mann d'une coupe de cortex d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature de (Alzheimer, 1911), © 1911 Springer Nature.

B : Immunomarquage du peptide A $\beta$  dans le cortex entorhinal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature de (Morales et al., 2012), © 2012 Springer Nature.

Le peptide A $\beta$  est un peptide majoritairement extracellulaire libéré par coupures successives de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), transmembranaire, par la  $\beta$ -sécrétase BACE1 (Vassar, 2004), puis par la  $\gamma$ -sécrétase, complexe protéique constitué de préséniline 1 ou 2, de nicastrine, d'APH-1 (*anterior pharynx defective 1*) et de PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) (LaFerla et al., 2007) (Figure 13A). La partie C-terminale du peptide A $\beta$  correspond ainsi à une hélice  $\alpha$  transmembranaire de l'APP (Figure 13B, C et D), dont l'hydrophobie facilite l'agrégation (Chen et al., 2017; Gremer et al., 2017). Dans les conditions physiologiques normales, cette voie de coupures de l'APP, dite amyloïdogène, coexiste avec une seconde voie de coupures, dite non amyloïdogène, qui ne forme pas de peptide A $\beta$ , et dans laquelle l'APP est coupée par l' $\alpha$ -sécrétase, métallopeptidase de la famille ADAM (LaFerla et al., 2007). La voie non amyloïdogène est prédominante et le peptide A $\beta$  produit par la voie amyloïdogène est éliminé rapidement par drainage périvasculaire ou dégradation : c'est la clairance (La-Ferla et al., 2007; Thal et al., 2007).



# Figure 13 : Formation du peptide A $\beta$ monomérique à partir de l'APP

A : La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est une protéine transmembranaire de 695 à 770 acides aminés. Deux voies de coupure de cette protéine coexistent (LaFerla et al., 2007). La voie non amyloïdogène (à gauche), prédominante dans les conditions physiologiques normales, est une coupure à l'intérieur du domaine de l'A $\beta$  qui forme deux fragments : l'ectodomaine sAPP $\alpha$  et le fragment C-terminal de 83 acides aminés (C83). La voie amyloïdo-gène (à droite) est constituée de deux coupures successives de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase, qui libère l'ectodomaine sAPP $\beta$ , puis par la  $\gamma$ -sécrétase, qui clive le fragment C-terminal de 99 acides aminés (C99) en deux domaines : le domaine intracellulaire de l'APP (*APP intracellular domain* ou AICD) et le peptide A $\beta$ , qui est majoritairement extracellulaire.

B : Séquence primaire du peptide A $\beta_{1-42}$ . Reproduit avec l'autorisation de Springer Nature de (Chen et al., 2017), © 2017, Springer Nature.

C : Structure du peptide A $\beta_{1-40}$  monomérique en solution aqueuse en présence de micelles. Les deux tiers C-terminaux du peptide adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  (résidus 15-36) stabilisée par des interactions électrostatiques et de Van der Waals. Les résidus 1 à 14 sont polaires et non structurés (Coles et al., 1998).

D : Structure du peptide A $\beta_{1-42}$  monomérique dans un environnement apolaire. Les résidus 8 – 25 et 28 – 28 forment deux hélices  $\alpha$  connectées par un tour  $\beta$  (Crescenzi et al., 2002).

La coupure par la  $\gamma$ -sécrétase conditionne la longueur du peptide A $\beta$ . Deux longueurs sont majoritaires : 40 et 42 acides aminés. A<sub>β1-40</sub> est le peptide le plus produit : la concentration en Aβ<sub>1-40</sub> est environ quatorze fois plus élevée que la concentration en Aβ<sub>1-42</sub> dans le cerveau sain (Kumar-Singh et al., 2006). Aβ<sub>1-42</sub> est la deuxième forme la plus produite. Majoritaire dans les plaques séniles, ce peptide s'agrège plus rapidement in vitro et semble plus neurotoxique qu'A<sub>β1-40</sub> (El-Agnaf et al., 2000; LaFerla et al., 2007; Swomley and Butterfield, 2015; Xiao et al., 2015). Dans le cerveau de patients atteints de formes familiales de la maladie d'Alzheimer, la quantité relative d'Aβ<sub>1-42</sub> augmente dans le cerveau, jusqu'à atteindre le tiers de celle d'A<sub>β1-40</sub> (Kumar-Singh et al., 2006). Le peptide A<sub>β1-40</sub> semble néanmoins jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer : un ratio  $\frac{[A\beta_{1-40}]}{[A\beta_{1-42}]}$  élevé semble favoriser l'accumulation d'Aβ au niveau des parois des vaisseaux sanguins du cerveau chez les modèles animaux, conduisant à une angiopathie amyloïde cérébrale (Herzig et al., 2006). Par ailleurs, les plagues amyloïdes retrouvées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer contiennent des fibres d'A<sub>β1-40</sub> dont la structure rend inaccessible la partie C-terminale du peptide, reconnue par les anticorps monoclonaux : la proportion d'A $\beta_{1-40}$  dans les plagues amyloïdes pourrait ainsi être globalement sous-évaluée par les études se basant sur l'utilisation directe de ces anticorps, tandis que les mesures réalisées après dissociation des fibres ne montrent pas systématiquement d'augmentation du ratio  $\frac{[A\beta_{1-42}]}{[A\beta_{1-42}]}$  (Lu et al., 2013).

Comme les fibres de tau constituant les enchevêtrements neurofibrillaires, les fibres d'A $\beta$  constituant les plaques séniles ont une structure amyloïde (Gremer et al., 2017). Une étude utilisant du matériel enrichi en fibres extrait de différentes aires du cerveau de deux patients atteints de la maladie d'Alzheimer pour amorcer la formation de fibres d'A $\beta_{1-40}$  recombinant montre que chacun des deux patients présente un type de fibres largement prédominant, bien que certains patients puissent présenter des fibres polymorphes (Lu et al., 2013). Les fibres prédominantes sont différentes chez les deux patients : l'un présente des fibres droites de 7±1 nm de diamètre, tandis que l'autre présente des fibres torsadées avec des diamètres apparents compris entre 5 et 11 nm, avec un pas de 85±10 nm. Les fibres droites sont formées par empilement d'une sous-unité trimérique avec un axe 3 de symétrie (Figure 14A). La Figure 14B montre les modèles structuraux de deux autres types de fibres

d'A $\beta_{1-40}$  obtenues *in vitro*, présentant des géométries différentes. Une étude plus récente décrit la structure de fibres torsadées d'A $\beta_{1-42}$  produites *in vitro* (Gremer et al., 2017). Ces fibres sont homogènes, avec un diamètre d'environ 7 nm de diamètre. Deux protofilaments sont assemblés entre eux, formant une fibre amyloïde dont les zones les plus hydrophobes sont enfouies au cœur de la structure (Figure 14C).

Le mépliement à l'origine de l'agrégation du peptide Aß est capable de se propager selon un mécanisme de type prion : les assemblages d'Aß mépliés sont capables de transmettre leur structure aux peptides normalement repliés (Olsson et al., 2018; Watts et al., 2014a). Ainsi, l'agrégation d'Aß est transmissible en modèles souris transgénique (Eisele et al., 2014) et marmouset (Ridley et al., 2005) par inoculation avec de l'homogénat de cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer.



# Figure 14 : Structure de différents types de fibres d'A $\beta_{1-40}$ et d'A $\beta_{1-42}$

A : Structure de fibres d'A $\beta_{1-40}$  recombinant obtenues après amorçage de la fibrillisation par des fibres extractives. La fibre est constituée de sous-unités répétées trimériques avec axe 3 de symétrie (à gauche). Au milieu, les chaînes latérales des trois monomères sont colorées en jaune, vert et orange. La fibre d'A $\beta$  est formée par un empilement de ces sous-unités avec un pas de 0,48 nm le long de l'axe (à droite). Adapté avec l'autorisation d'Elsevier de (Lu et al., 2013), © 2013 Elsevier Inc.

B : Modèles structurels de deux types de fibres d'A $\beta_{1-40}$  présentant respectivement un axe 2 et 3 de symétrie, obtenus par des mesures de RMN du solide et de microscopie électronique sur des fibres cultivées *in vitro*. Adapté avec l'autorisation d'Elsevier de (Lu et al., 2013), © 2013 Elsevier Inc.

C : Modèle structurel de fibres d'A $\beta_{1-42}$  cultivées *in vitro*, formées de deux protofilaments (à gauche) dont la structure est formée de feuillets  $\beta$  parallèles (au milieu). Les régions C-terminales, hydrophobes, sont au centre de la structure. A droite : la surface est colorée en fonction de l'échelle d'hydrophobicité de Kyte-Doolittle du blanc (hydrophile) à l'orange (hydrophobe). Adaptée avec l'autorisation de l'*American Association for the Advancement of Science* de (Gremer et al., 2017), © 2017 Gremer, Schölzel, Schenk, Reinartz, Labahn, Ravelli, Tusche, Lopez-Iglesias, Hoyer, Heise, Willbold, Schröder.

Comme pour les maladies à prions, l'agrégation d'Aß peut être transmise de façon

iatrogène chez l'homme : cela a été montré de façon rétrospective chez des patients ayant

subi des neurochirurgies avec des instruments potentiellement contaminés (Jaunmuktane et al., 2018) ou des traitements avec des lots contaminés d'hormone de croissance purifiés à partir de cadavres de patients présentant des plaques amyloïdes (Jaunmuktane et al., 2015; Purro et al., 2018a). Ainsi, comme la tauopathie, l'agrégation d'Aß se propage de neurone à neurone, probablement *via* des noyaux de conversion oligomériques qui pourraient se transmettre, soit par diffusion passive, soit au niveau des synapses après un transport axonal antérograde ou rétrograde (Eisele and Duyckaerts, 2016), soit être transportés par des exosomes (Sardar Sinha et al., 2018). Ainsi, les mécanismes de propagation du mépliement et de l'agrégation d'Aß et tau dans le cadre de la maladie d'Alzheimer peuvent être qualifiés de *prion-like* (Brundin et al., 2010), et les agrégats peuvent être décrits comme des prionoïdes (Harbi and Harrison, 2014), voire, pour certains auteurs, des prions (Stöhr et al., 2012; Woerman et al., 2016).

### 1.1.2.2.2. Fonctions physiologiques putatives de l'APP et de l'A $\beta$

Bien que les fonctions de l'APP ne soient probablement pas connues de façon exhaustive, des études montrent que cette protéine et son produit de clivage sAPP $\alpha$  (Figure 13, p. 47) sont neuroprotecteurs. En particulier, ils jouent un rôle trophique associé à la régulation de l'influx en Ca<sup>2+</sup> caractéristique d'une hypoglycémie dans les neurones, et protègent les neurones dans une certaine mesure contre l'excitotoxicité associée au glutamate (Mattson, 1997; Mattson et al., 1993; Thinakaran and Koo, 2008). Les auteurs de ces études suggèrent ainsi que la neurodégénérescence associée à la maladie d'Alzheimer puisse être due à une diminution de la concentration neuronale en APP et en sAPP $\alpha$ , en raison de la prédominance de la voie de clivage amyloïdogène sur la voie non amyloïdogène (Mattson et al., 1993). Cependant, il apparaît que le peptide A $\beta$  a également de nombreuses fonctions physiologiques. En particulier, une activité antimicrobienne a été décrite dans différents modèles (Kumar et al., 2016), qui pourrait être médiée par l'initiation d'un stress oxydant toxique induit par la perméabilisation des membranes des micro-organismes et la formation d'ERO à partir des ions métalliques qu'A $\beta$  est capable de séquestrer (Brothers et al., 2018). Ce peptide aurait également des propriétés anticancéreuses et serait capable d'assurer l'intégrité

de la barrière hématoencéphalique (Brothers et al., 2018). Sa forte production dans le cas de la maladie d'Alzheimer pourrait alors être interprétée comme un mécanisme de défense visà-vis d'un stress exogène (Atwood et al., 2003).

# 1.1.2.2.3. Variabilité de la toxicité d'Aβ en fonction de son niveau d'agrégation et de la structure des agrégats

Dans le cerveau d'un malade, différents niveaux d'assemblage du peptide Aß coexistent : les fibrilles, formant les plaques séniles, les protofibrilles, ainsi que des oligomères et monomères solubles (Lu et al., 2013). Les monomères d'Aβ semblent neuroprotecteurs (Brothers et al., 2018; Zou et al., 2002), et les agrégats les plus gros sont souvent décrits comme amorphes dans la littérature (Carija et al., 2017; Irizarry et al., 1997), même si certaines fibres d'Aβ sont neurotoxiques (Chimon et al., 2007; Qiang et al., 2012). Il semble ainsi que les espèces les plus toxiques soient certains oligomères solubles. L'inoculation de souris saines avec des dodécamères d'A<sub>β1-42</sub> purifiés à partir de cerveaux de souris malades conduit ainsi à une neurodégénérescence (Lesné et al., 2006). Certains dimères et trimères d'Aβ sont également neurotoxiques in vivo (Cleary et al., 2005; Shankar et al., 2008). Ces oligomères sont capables de s'intégrer dans les membranes des cellules et des mitochondries (Scheltens et al., 2016; Swomley and Butterfield, 2015; Watanabe-Nakayama et al., 2016) et ainsi de former des canaux capables d'altérer l'homéostasie ionique, en particulier celle du Ca<sup>2+</sup>(Lal et al., 2007). Il existe des patients ne présentant pas de symptôme psychique avec des niveaux importants de plaques séniles (Delaère et al., 1993; Dickson et al., 1992) et, réciproquement, des traitements par des anticorps dirigés contre Aβ inhibent en règle générale la formation de plaques séniles mais pas la progression de la maladie d'Alzheimer (Nicoll et al., 2003). La concentration en oligomères paraît mieux corrélée à la sévérité des symptômes (Benilova et al., 2012) mais de nombreuses espèces oligomériques différentes ont été décrites dans la littérature avec des niveaux et des mécanismes de toxicité très variables (Cline et al., 2018). Identifier les oligomères impliqués dans l'initiation et la progression de la maladie d'Alzheimer est donc aujourd'hui un enjeu majeur, pour pouvoir envisager de cibler ces espèces toxiques sans altérer les fonctions physiologiques des autres formes du peptide Aβ (Brothers et al., 2018; Cline et al., 2018; Zou et al., 2002).

#### 1.1.2.2.4. Notion de souche dans la maladie d'Alzheimer

D'un patient à l'autre, la structure tridimensionnelle des plaques séniles est variable, et diffère des fibrilles assemblées *in vitro* (Lu et al., 2013; Rienstra, 2013) et observées chez les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer (Duyckaerts et al., 2008). Les plaques peuvent ainsi être diffuses, filamenteuses, compactes ou inertes, et ces différences de structure sont associées à une accumulation variable de cellules microgliales (Yuan et al., 2016) (Figure 15A). Ces assemblages ont des niveaux de toxicité et des vitesses de propagation différents. Ainsi, le polymorphisme des assemblages d'Aβ pourrait être associé à la variabilité des phénotypes pathologiques observée dans les formes cliniques de maladie d'Alzheimer (Condello and Stöehr, 2018; Lu et al., 2013; Watanabe-Nakayama et al., 2016). Ces phénotypes sont transmis lors de l'inoculation de modèles souris avec des assemblages d'Aβ extractifs (Watts et al., 2014a). Cela se rapproche ainsi de la notion de souche existant pour les maladies à prions (Tian et al., 2019; Walker, 2016; Watts et al., 2014a).



# Figure 15 : Diversité de souches dans la maladie d'Alzheimer

A : Observation par microscopie confocale de cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer. Les dépôts amyloïdes sont visualisés en magenta, le peptide Aβ en vert et les cellules microgliales en bleu. Quatre types de plaques séniles sont observés : diffuses, filamenteuses, compactes et inertes. Adapté avec l'autorisation d'Elsevier de (Yuan et al., 2016), © 2016 Elsevier Inc.

B : Observation d'une coupe de cerveau de patient décédé de la maladie d'Alzheimer après immunomarquage du peptide A $\beta$  (en marron) et coloration de Nissl des corps cellulaires en bleu. La flèche rouge indique un dépôt amyloïde compact, et la flèche bleue indique un cluster d'A $\beta$  diffus. L'étoile verte indique un vaisseau sanguin entouré d'A $\beta$ . Adapté avec l'autorisation d'Annual Reviews de (Walker, 2016), © 2016 Annual Reviews.

C : Le déterminisme des souches observées dans la maladie d'Alzheimer semble codé par la structure des petits oligomères d'A $\beta$ , et être conservé dans les protofibrilles et les fibrilles. Des souches « mixtes » pourraient expliquer le polymorphisme des assemblages d'A $\beta$  observés chez un même patient. Des souches caractérisées par des assemblages moins toxiques ou une agrégation plus lente pourraient expliquer l'existence de patients présentant une charge d'A $\beta$  importante sans déficit psychiatrique. Adapté avec l'autorisation d'Elsevier de (Condello and Stöehr, 2018), © 2018 Elsevier Inc.

Comme pour les maladies à prions, le déterminisme de souche est probablement codé par la structure tertiaire et quaternaire même des assemblages d'A $\beta$ , dès les petits oligomères (Condello and Stöehr, 2018). Un même patient peut présenter des plaques séniles formées de fibres polymorphes (Walker, 2016), ce qui pourrait correspondre à des souches « mixtes » (Condello and Stöehr, 2018).

#### 1.1.2.3. Lien fonctionnel entre maladie d'Alzheimer et protéine prion

La maladie d'Alzheimer et les maladies à prions se propagent donc suivant des mécanismes similaires, basés sur la transconformation d'une chaîne polypeptidique (respectivement A<sup>β</sup> et tau, et PrP) qui se transmet aux protéines saines à leur contact (Rasmussen et al., 2017).

Une étude publiée en 2013 met en évidence un mécanisme commun aux maladies à prions et à la maladie d'Alzheimer, qui aboutit à une activité moindre de l' $\alpha$ -sécrétase, qui catalyse, d'une part la coupure non amyloïdogène de l'APP, et, d'autre part, la coupure  $\alpha$  de la PrP<sup>C</sup>, qui apparaît comme protectrice vis-à-vis des maladies à prions (Pietri et al., 2013). Les auteurs montrent que la PDK1 (*3-phosphoinositide-dependant kinase 1*) est activée par les assemblages d'A $\beta$  ou de PrP<sup>Sc</sup>. Cela conduit à la phosphorylation et à l'internalisation médiée par la cavéoline 1 de la TACE (*tumor necrosis factor \alpha-converting enzyme*), ce qui lève l'effet activateur de cette protéine sur l' $\alpha$ -sécrétase, participant ainsi à l'accumulation d'A $\beta$  et de PrP<sup>Sc</sup>.

Par ailleurs, la protéine prion cellulaire,  $PrP^{C}$ , pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Des études observationnelles – non expérimentales – suggèrent ainsi un lien entre polymorphisme au codon 129 de la PrP et risque de contracter la maladie d'Alzheimer (Berr et al., 2003; Golanska et al., 2004; Riemenschneider et al., 2004). Des études systématiques des ligands de PrP ont identifié très tôt l'APP comme un interacteur potentiel de PrP *in vitro* (Schmitt-Ulms et al., 2001; Yehiely et al., 1997), mais sans permettre à cette époque de conclure quant à la réalité physiologique ou au rôle de cette interaction car la protéine prion comme le peptide A $\beta$  sont capables d'interagir avec une multitude de ligands différents *in vitro* (Purro et al., 2018b; Westergard et al., 2007). En 2009, la PrP a été identifiée comme un récepteur à certains oligomères d'A $\beta$  (Laurén et al., 2009). Les auteurs de cette étude ont travaillé avec un mélange d'oligomères d'A $\beta_{1-42}$  synthétique, de taille comprise entre 50 et 100 protomères pour la moitié d'entre eux. Après exposition des cellules à ces oligomères, une colocalisation de PrP et d'A $\beta$  a été mise en évidence dans la lignée de cellules épithéliales COS-7 (Gluzman, 1981) (Figure 16A) et dans des neurones primocultivés de souris (Figure 16B). Une interaction directe entre A $\beta_{1-42}$  et PrP a été validée *in vitro*, qui est plus forte pour les oligomères que pour le monomère. Cette interaction se situe principalement au niveau du domaine chargé de la PrP (95-110). Les oligomères utilisés sont capables d'inhiber la potentialisation à long terme dans des tranches d'hippocampe de souris sauvages, mais la plasticité synaptique est restaurée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le domaine chargé de PrP. Deux autres sites de fixation des oligomères d'A $\beta$  ont été identifiés sur la PrP<sup>C</sup>, au niveau du domaine polybasique (résidus 23-27) (Chen et al., 2010) et, potentiellement, au niveau du domaine globulaire, avec une possible implication des hélices  $\alpha$  de la PrP<sup>C</sup> dans l'interaction (Chen et al., 2010; Freir et al., 2011; Zou et al., 2011).

La PrP peut donc médier la toxicité de certains oligomères d'A $\beta$  produits *in vitro*. Des travaux ultérieurs ont confirmé cette fonction de PrP<sup>C</sup> comme récepteur aux oligomères d'A $\beta$  chez la souris ainsi que dans des modèles cellulaires (Purro et al., 2018b) et chez la drosophile (Younan et al., 2018). Certaines études montrent que, dans certains modèles, la toxicité des oligomères d'A $\beta$  est indépendante de l'expression de PrP<sup>C</sup> (Balducci et al., 2010). Une explication possible est l'existence d'autres récepteurs membranaires aux oligomères d'A $\beta$  capables de médier leur toxicité (Purro et al., 2018b), comme le récepteur transmembranaire au complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 LilrB2 et son homologue murin PirB (Smith and Strittmatter, 2017). Cette explication est cohérente avec l'étude de Laurén et col., qui montre qu'une partie de l'adhésion d'A $\beta$  aux cellules persiste en l'absence d'expression de PrP<sup>C</sup> (Laurén et al., 2009). D'autres travaux montrent que la PrP<sup>C</sup> soluble et son produit de coupure  $\alpha$  N1 sont protecteurs vis-à-vis de la toxicité induite par les oligomères d'A $\beta$ , suggérant que l'ancrage de la PrP à la membrane est nécessaire pour la médiation de la toxicité d'A $\beta$  (Guillot-Sestier et al., 2012; Scott-McKean et al., 2016). Le caractère protecteur

du fragment N1 vis-à-vis d'Aβ pourrait être dû à sa capacité à séquestrer les assemblages oligomériques, empêchant ces assemblages d'activer *via* la PrP membranaire les récepteurs impliqués dans la cascade de signalisation aboutissant à la neurotoxicité (Fluharty et al., 2013).





A : Immunomarquage de PrP (en rouge) et d'A $\beta$  (en vert) sur des cellules COS-7 exprimant PrP<sup>C</sup> exposées à des oligomères d'A $\beta_{1-42}$ .

B : Immunomarquage de PrP et marquage avec de l'avidine fluorescente des oligomères d'A $\beta$  biotinylés sur des neurones d'hippocampe de souris exposés pendant 1 h à des oligomères d'A $\beta_{1-42}$  (130 nM équivalent monomère) après 21 jours *in vitro*.

Figure adaptée avec l'autorisation de Springer Nature de (Laurén et al., 2009), © 2009 Springer Nature.

Les divergences des études concernant le caractère nécessaire ou accessoire de la  $PrP^{C}$  dans la médiation du signal toxique associé à A $\beta$  peuvent s'expliquer par la variabilité des mécanismes de toxicité des oligomères d'A $\beta$  en fonction de leur structure (Purro et al., 2018b). Ainsi, il semble que l'interaction avec la  $PrP^{C}$  et le déficit de la potentialisation à long terme qui s'ensuit soient les plus élevés pour des assemblages protofibrillaires d'A $\beta_{1-42}$  con-

tenant une structure nanotubulaire formée de trois hélices. Les oligomères globulaires interagissent également avec la PrP mais avec une affinité plus faible, et la toxicité des fibres semble indépendante de l'expression de la PrP (Nicoll et al., 2013). La phosphorylation par la tyrosine kinase Fyn de la sous unité NR2B du récepteur N-méthyl-D-aspartate (rNMDA) a été identifiée comme initiateur potentiel de la dérégulation synaptique et de la cytotoxicité d'Aβ médiée par PrP<sup>C</sup> (Um and Strittmatter, 2013). Le récepteur métabotrope au glutamate mGluR5 pourrait agir comme un corécepteur entre PrP<sup>C</sup> et Fyn (Haas et al., 2016; Um et al., 2013). L'activation de la Fyn kinase peut participer à la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer en favorisant l'hyperphosphorylation de tau (Rubenstein et al., 2017). Un mécanisme alternatif implique l'activation et la translocation de la phospholipase cytoplasmique A2 (cPLA<sub>2</sub>), gui conduit à terme à des dysfonctionnements synaptiques (Bate and Williams, 2011). Enfin, la PrP<sup>C</sup> pourrait favoriser la formation d'oligomères d'Aß par rapport aux monomères et aux fibres (Younan et al., 2018), mais il n'y a pas de consensus à ce sujet : certaines études rapportent que la PrP inhibe l'agrégation d'Aβ (Bove-Fenderson et al., 2017), tandis que d'autres indiquent, au contraire, que la PrP favorise la formation de fibres d'Aß aux dépens des oligomères, limitant la toxicité du peptide (Falker et al., 2016).

La Figure 17 présente ainsi les mécanismes de toxicité des oligomères d'Aβ documentés dans la littérature, dépendant ou non de la PrP<sup>C</sup>. Ces mécanismes pourraient être interconnectés entre eux (Purro et al., 2018b).



Figure 17 : Mécanismes potentiels de toxicité des oligomères d'A $\beta$  dépendant ou non de PrP

Panel de gauche : la PrP agit comme un récepteur à certains oligomères d'Aβ, comme les nanotubes, et participe à leur toxicité par un mécanisme potentiellement médié par le récepteur métabotrope au glutamate mGluR5 qui pourrait impliquer la phosphorylation par Fyn d'une sous-unité du récepteur N-méthyl-D-aspartate (rNMDA) ou la translocation de la phospholipase cytoplasmique A2 (cPLA2).

Panel du milieu : la  $PrP^{C}$  pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la production, l'agrégation et le transport d'A $\beta$ , par des mécanismes inconnus. APP : protéine précurseur de l'amyloïde. Panel de droite : certains oligomères d'A $\beta$  sont toxiques indépendamment de  $PrP^{C}$ . Cette toxicité peut être due à une altération directe de la membrane, ou médiée par d'autres récepteurs que  $PrP^{C}$ .

Figure adaptée avec l'autorisation d'Elsevier de (Purro et al., 2018b), © 2017 Elsevier Inc.

Différentes études indiquent que ce rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la transduction du signal associé aux assemblages toxiques de protéines pourrait être commun à d'autres maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson. En effet, la PrP<sup>C</sup> agirait comme un récepteur à l' $\alpha$ -synucléine, protéine clé de la maladie de Parkinson (Urrea et al., 2017) et serait capable de médier son internalisation par les cellules (Cecco and Legname, 2018), même si ce rôle est controversé (La Vitola et al., 2019).

#### 1.1.2.4. La maladie d'Alzheimer, enjeu majeur de santé publique

#### 1.1.2.4.1. Etiologie de la maladie d'Alzheimer

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer n'est pas élucidée à l'heure actuelle. Certains cas sont associés à des mutations des gènes codant la protéine précurseur de l'amyloïde ou des présénilines, protéines du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Figure 13) (Lanoiselée et al., 2017). Ces mutations conduisent à une plus grande concentration du peptide A $\beta$  et à une augmentation du ratio  $\frac{[A\beta_{1-42}]}{[A\beta_{1-40}]}$  dans le cerveau (De Jonghe et al., 2001). De façon similaire, la plupart des patients atteints du syndrome de Down, *i.e.* possédant 3 copies du chromosome 21, qui porte le gène codant l'APP, présentent des plaques amyloïdes associées à une dégénérescence neurofibrillaire et à des symptômes de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans (Glenner and Wong, 1984; Gomez et al., 2020). Ces formes dites familiales de la maladie d'Alzheimer touchent des patients jeunes et représentent environ 5% des cas observés (Bisht et al., 2018). Ainsi, la plupart des formes de la maladie d'Alzheimer sont sporadiques. De nombreux facteurs de risque ont été décrits, parmi lesquels le stress chronique (Bisht et al., 2018), le surpoids (Moser and Pike, 2016), le diabète de type 2 (Butterfield et al., 2014), la dépression (Rodrigues et al., 2014) et le sexe : les deux tiers des malades sont des femmes (Grimm et al., 2016; Riedel et al., 2016). Le polymorphisme au niveau de l'apolipoprotéine E (APOE) est également déterminant, puisque l'allèle  $\varepsilon$ 4 du gène codant cette protéine, qui favorise une hypercholestérolémie, est le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer sporadique (Riedel et al., 2016; Yamazaki et al., 2019). Cela pourrait être directement dû à l'agrégation d'A $\beta$ , puisqu'APOE  $\varepsilon$ 4 favorise l'oligomérisation du peptide A $\beta_{1-42}$  (Manelli et al., 2004). De plus, la séquestration d'APOE ɛ4 dans les plaques amyloïdes, due à son affinité importante avec Aβ (Manelli et al., 2004), pourrait altérer la distribution du cholestérol et des autres lipides dans le cerveau (Yamazaki et al., 2019). Un effet sur l'agrégation de tau est également observé, mais seulement en présence de plagues amyloïdes : cet effet est donc considéré comme indirect et médié par Aβ (Yamazaki et al., 2019).

L'hypothèse de la cascade amyloïde, proposée par Hardy et Higgins en 1991, postule que l'accumulation d'Aβ soit la cause de la tauopathie puis de la neurodégénérescence. Cette hypothèse est initialement basée sur le fait que, pour les individus atteints du syndrôme de Down ou de formes familiales de la maladie d'Alzheimer, la seule surexpression d'A $\beta$  conduit à l'ensemble des symptômes (Hardy and Higgins, 1992). Cette hypothèse reste discutée, principalement à cause du fait que (i) la plupart des thérapies ciblant A $\beta$  inhibent la formation des plaques séniles sans amélioration significative des symptômes cliniques, et (ii) les fonctions physiologiques d'A $\beta$  apparaissent essentielles dans le développement de la mémoire (Ricciarelli and Fedele, 2017). Il est envisageable que seules certaines formes d'A $\beta$ , *a priori* des oligomères solubles, soient à l'origine de la maladie (Tolar et al., 2019).

#### 1.1.2.4.2. Une maladie aujourd'hui incurable

Aucun traitement ciblant les causes sous-jacentes de la maladie d'Alzheimer n'est disponible sur le marché à l'heure actuelle. Jusqu'en 2018, deux types de traitements symptomatiques étaient utilisés dans le but de ralentir l'évolution de la maladie : les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et les antagonistes du récepteur NMDA. Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase, comme la rivastigmine, le donépézil et la galantamine, permettent de ralentir l'évolution de la maladie chez certains des patients atteints de formes légères à modérées. Ils engendrent cependant de nombreux effets secondaires, principalement digestifs : le service médical qu'ils rendent est donc relativement faible (Sharma, 2019). La mémantine, un agoniste du récepteur NMDA, permet de ralentir l'évolution des symptômes pour les personnes atteintes de maladie d'Alzheimer modérée à sévère (McShane et al., 2019). La molécule semble en revanche inutile voire délétère pour les patients atteints de formes légères à modérées (Dysken et al., 2014). Conformément aux recommandations de la Haute autorité de santé (Haute autorité de santé, 2018), ces médicaments ne sont plus remboursés en France depuis août 2018 et la prise en charge des malades est aujourd'hui non médicamenteuse, avec un rôle prépondérant des aidants (L'Assurance maladie, 2019).





Une stratégie thérapeutique, pour être efficace contre la maladie d'Alzheimer, devrait agir sur ses causes sous-jacentes dès les stades précliniques (Figure 18). Parmi ces potentielles stratégies thérapeutiques figurent différentes approches de vaccination et d'immunisation contre A $\beta$  (Cehlar et al., 2018; van Dyck, 2018) ou tau (Pedersen and Sigurdsson, 2015), des modulateurs d'enzymes comme les  $\alpha$  et  $\beta$  sécrétases (Seki et al., 2020), des traitements antioxydants et antiinflammatoires (Caruso et al., 2019; Frontiñán-Rubio et al., 2018; Jorda et al., 2020) ou des modulateurs de récepteurs potentiels à Aβ (Elezgarai and Biasini, 2016), dont PrP (Chung et al., 2010). Malgré la mise en œuvre de nombreux essais cliniques, aucune de ces approches ne s'est révélée curative chez l'homme (Kamat et al., 2016). Néanmoins, des essais cliniques de phase III sont en cours avec l'anticorps monoclonal humain Aducanumab, qui cible spécifiquement les fibres amyloïdes et les oligomères solubles d'Aβ, après une interruption des études due à une faible efficacité clinique (Howard and Liu, 2020; Schneider, 2020).

#### 1.2. Agrégation de protéines et stress oxydant

#### 1.2.1. Le stress oxydant, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox

Les maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions, sont associées à un stress oxydant cellulaire précoce, qui apparaît plusieurs années avant les symptômes de démence (Aluise et al., 2010; Keller et al., 2019; Pamplona et al., 2008). Il s'agit d'une concentration trop importante des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (EROA), due à un déséquilibre entre la production d'EROA et leur élimination par les systèmes antioxydants cellulaires (Kim et al., 2015; Tramutola et al., 2014). Les ERO sont des espèces chimiques réactives dérivées de l'oxygène, comme l'anion radicalaire superoxyde  $\cdot O_2^{-}$ , le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical hydroxyle  $\cdot OH$ . Les espèces réactives de l'azote (ERA) comprennent le monoxyde d'azote 'NO et ses dérivés, comme l'anion peroxynitrite ONOO<sup>-</sup> (Stamler and Hausladen, 1998). Dans les conditions physiologiques normales, les EROA, présentes en faibles concentrations, ont une fonction de signalisation cellulaire. Le ·NO est principalement produit par les enzymes de la famille des NO synthases (Daff, 2010). La source principale d'ERO est la chaîne respiratoire mitochondriale (Kim et al., 2015; Swomley and Butterfield, 2015). Il s'agit d'une chaîne de réactions d'oxydation exergoniques – qui libèrent de l'énergie – au niveau de la membrane interne des mitochondries couplées au transport endergonique - qui consomme de l'énergie - de protons dans l'espace intermembranaire. L'entrée de protons dans la matrice mitochondriale est ainsi exergonique et est couplée à la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP), transporteur énergétique clé dans la cellule (Shoffner et al., 1991). Cette chaîne de transports d'électrons, en particulier au niveau du cycle des ubiquinones et du complexe IV, comporte des intermédiaires réactionnels radicalaires qui peuvent conduire à la libération d'ERO (Figure 19).



**Figure 19 : Production d'ERO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale** Les complexes I et II libèrent des électrons (e<sup>-</sup>) par l'oxydation de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et du succinate. Ces électrons interviennent dans le cycle des ubiquinones (QH<sub>2</sub><sup>red</sup>/Q<sup>ox</sup>). L'oxydation des ubiquinones libère des électrons qui sont captés par le complexe III, puis le cytochrome C et le complexe IV, mais aussi des intermédiaires réactionnels, dont le radical QH<sup>-</sup>, qui pourrait favoriser la formation d'ERO (en rouge). Les complexes

I, III et IV couplent des réactions rédox exergoniques avec le transport actif de protons vers l'espace intermembranaire. Le complexe V, ou ATP synthase, couple le transport passif de protons dans la matrice mitochondriale avec la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), monnaie énergétique de la cellule (Gardès-Albert et al., 2003; Shoffner et al., 1991).

La concentration des EROA est régulée par des enzymes comme les superoxyde dismutases (SOD), qui catalysent la dismutation de  $O_2^-$  en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, les catalases, qui catalysent la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et les glutathion péroxydases (Gpx), qui couplent la réduction des péroxydes à l'oxydation du glutathion, mais aussi par de petites molécules dont la plus abondante est le glutathion (Kamat et al., 2016; Kim et al., 2015; Swomley and Butterfield, 2015). Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) dont la concentration peut dépasser 10 mM dans les cellules de mammifères (Dringen, 2000). L'oxydation du glutathion réduit (GSH) en disulfure de glutathion (GSSG) par formation d'un pont disulfure intermoléculaire est couplée à la réduction des ERO (Figure 20). En fonction du substrat, ces réactions peuvent être non enzymatiques ou catalysées par des enzymes comme les peroxyrédoxines (Prx) ou les thiorédoxines (Trx) (Dringen, 2000; Mazzetti et al., 2015). Le glutathion réduit permet également de restaurer le pouvoir réducteur des glutarédoxines qui catalysent la réduction de différentes ERO (Pham et al., 2015; Silva et al., 2008). La restauration du pouvoir réducteur du glutathion oxydé (GSSG) est couplée à l'oxydation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) par les glutathion réductases (Kim et al., 2015).



**Figure 20 : Equilibre entre glutathion et disulfure de glutathion** Adapté d'une figure de Donald Voet, Judith Voet, & Chris Pratt (CC 0 1.0).

Le stress oxydant est dû à un déséquilibre de l'homéostasie rédox, dû soit à une augmentation de la production d'EROA, soit à une diminution de l'activité des systèmes antioxydants (Figure 21). La synthèse d'EROA peut être favorisée par différents facteurs, comme l'athérosclérose et l'hypercholestérolémie (Peluso et al., 2012), l'excès de certains ions métalliques (Tabner et al., 2005), ou encore un stress environnemental comme l'exposition aux pesticides (Abdollahi et al., 2004) ou à la pollution de l'air, en particulier par l'ozone (Lodovici and Bigagli, 2011). Les capacités antioxydantes peuvent être altérées par exemple par le surpoids (Albuali, 2014) ou le tabagisme (Kamceva et al., 2016). Le vieillissement cellulaire est caractérisé à la fois par une augmentation de la concentration en EROA (Santos et al., 2018) et par une diminution de l'activité des systèmes antioxydants (Mazzetti et al., 2015), ce qui facilite l'installation d'un stress oxydant chronique.

Le cerveau consomme 20% de l'oxygène total utilisé par l'organisme. Le catabolisme oxydatif est donc très élevé dans cet organe, qui est ainsi particulièrement susceptible de développer un stress oxydant en cas d'insuffisance des systèmes antioxydants cellulaires (Dringen, 2000). Quand elles sont présentes en trop grande concentration, les EROA peuvent détériorer protéines, lipides et acides nucléiques. Le stress oxydant favorise ainsi la peroxydation des lipides, très abondantes dans le cerveau. Il induit une altération des mitochondries limitant la synthèse d'ATP, à laquelle le cerveau est également très sensible du fait de ses besoins énergétiques élevés (Kim et al., 2015). Les dommages oxydatifs induits par la délétion du gène codant la superoxyde dismutase 2 (SOD2) chez un modèle souris de la maladie d'Alzheimer conduisent ainsi à des déficits cognitifs exacerbés (Esposito et al., 2006). De plus, l'oxydation de protéines peut altérer leur conformation, entraînant une perte de fonction, et favorisant potentiellement leur agrégation par l'exposition de résidus hydrophobes (Castro et al., 2012; Swomley and Butterfield, 2015; Tanase et al., 2016). Les protéines du système ubiquitine/ protéasome peuvent également être atteintes, altérant la dégradation des protéines et favorisant leur agrégation (Korovila et al., 2017; Pajares et al., 2015). Réciproquement, des études suggèrent que l'agrégation de protéines favorise le stress oxydant (Hipp et al., 2014) : on a donc un cercle vicieux qui se met en place, qui aboutit à la neurodégénérescence (Figure 21).



# **Figure 21 : Le stress oxydant, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox** Le stress oxydant est dû à un déséquilibre entre les EROA et les systèmes antioxydants, causé, soit par une altération des systèmes antioxydants, soit par une augmentation de la production des EROA. Cet excès d'EROA conduit à l'oxydation des molécules cellulaires : protéines, lipides, et acides nucléiques, ce qui est à terme toxique pour les cellules, particulièrement les neurones. L'agrégation de certaines protéines et l'altération des mitochondries favorisent réciproquement la production d'ERO : un cercle vicieux se met alors en place. Le stress oxydant est un marqueur précoce des maladies neurodégénératives, et participe à leur évolution.

Le stress oxydant pourrait être l'un des initiateurs de la cascade amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Behl, 1997; Markesbery, 1997). En effet, il altère les protéases dégradant Aβ et participe donc à son accumulation (de Dios et al., 2019). Il favorise également l'hyperphosphorylation et l'accumulation de tau (Lloret et al., 2015), et pourrait être impliqué dans la réintégration du cycle cellulaire par les neurones, qui participe à leur mort (Bonda et al., 2010). Réciproquement, l'accumulation d'Aß favorise le stress oxydant par plusieurs mécanismes : (i) la perméabilisation des membranes par certaines espèces oligomériques conduit à un déséquilibre de l'homéostasie ionique (Lal et al., 2007), (ii) les agrégats d'Aβ peuvent relarguer localement des espèces métalliques (Huang et al., 2004; Khan et al., 2006), et (iii) certains assemblages perturbent la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui se manifeste en particulier par une diminution de l'activité de la cytochrome C oxydase (complexe IV) (Figure 19, p. 64), qui conduit à une augmentation de la production d'ERO (Lim et al., 2010). Un cercle vicieux se met ainsi en place entre accumulation de peptide A $\beta$  et stress oxydant, qui aboutit à la mort cellulaire (Caruso et al., 2019; Frontiñán-Rubio et al., 2018; Hilt et al., 2018). De façon similaire, l'oxydation de résidus méthionines de la PrP semble nécessaire pour son repliement en feuillets  $\beta$  et son agrégation dans le cadre des maladies à prions, qui seraient ainsi favorisées par le stress oxydant (Wolschner et al., 2009). Réciproquement, la pathogénèse des maladies à prions favorise le stress oxydant via une dérégulation du métabolisme dans le cerveau (Bourgognon et al., 2018).

#### 1.2.2. Liens fonctionnels entre interaction de protéines et stress oxydant

Bien que le paragraphe précédent indique que le stress oxydant est favorisé par l'agrégation des protéines dans le cadre des maladies neurodégénératives, il apparaît que l'agrégation de protéines peut dans certains cas constituer un mécanisme de défense vis-àvis du stress oxydant. La relation entre agrégats de protéines et stress oxydant est ainsi intimement liée à la structure des agrégats (Carija et al., 2017; Sideri et al., 2010). Nous avons réalisé une analyse comparative des effets activateurs et inhibiteurs de l'agrégation de protéines sur le stress oxydant et du stress oxydant sur l'agrégation de protéines décrits dans la littérature, aboutissant à la publication dans l'*International Journal of Molecular Science* d'un article de revue présenté en annexe (Lévy et al., 2019).

#### 1.3. Modèles des maladies à prions et de la maladie d'Alzheimer

#### 1.3.1. Modèles animaux

#### 1.3.1.1. Modèles primates

La proximité phénotypique entre les primates et l'homme a permis des avancées majeures dans l'étude de la transmission et de la pathogénèse des maladies à prions humaines, dont le kuru (Gajdusek et al., 1966, 1968) et le vMCJ (Lasmézas et al., 1996). La maladie d'Alzheimer *stricto sensu* est exclusivement humaine (Rosen et al., 2016). Le vieillissement des singes est souvent associé à l'accumulation dans le cerveau de dépôts amyloïdes (Martin et al., 1991; Price et al., 1991) et parfois à des tauopathies (Giannakopoulos et al., 1997), mais sans autre symptôme de type Alzheimer (Heuer et al., 2012). Cependant, chez le microcèbe mignon, un lémurien, une amyloïdose bêta et d'une tauopathie locales associées à des troubles de l'apprentissage et de la mémoire à long terme peuvent se développer suite à une inoculation intracérébrale avec de l'homogénat de cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit de la première preuve de la transmissibilité de ces lésions associées à des symptômes cliniques chez un animal non transgénique (Gary et al., 2019).

Les expérimentations sur les primates posent néanmoins des problèmes éthiques majeurs et doivent donc être réduites au maximum (Prescott, 2010).

#### **1.3.1.2.** Modèles rongeurs

#### 1.3.1.2.1. Modèles rongeurs des maladies à prions

Le hamster doré puis le campagnol roussâtre (en anglais, *bank vole*) sont les premiers rongeurs infectés expérimentalement par des maladies à prions (Brandner and Jaunmuktane, 2017). Le campagnol est infectable par des prions issus de nombreuses espèces, dont la tremblante du mouton (Di Bari et al., 2008), la maladie du dépérissement chronique des cervidés (Di Bari et al., 2013), et des prions humains, murins et de hamster (Nonno et al., 2006). Les périodes d'incubation sont très courtes pour certaines souches, ce qui indique une barrière d'espèce faible, qui est retrouvée pour des souris transgéniques exprimant la PrP<sup>C</sup> de campagnol (Watts et al., 2014b).

Le développement de lignées de souris transgéniques pour la PrP a révolutionné l'étude des maladies à prions. Le premier modèle décrit dans la littérature coexprime la PrP<sup>C</sup> murine et la PrP<sup>C</sup> de hamster et permet de s'affranchir de la barrière d'espèce (Scott et al., 1989). Les lignées de souris *Prnp<sup>Q/Q</sup>*, n'exprimant pas de PrP<sup>C</sup> endogène (Büeler et al., 1992), ont constitué une avancée majeure, puisque la modification génétique de ces souris pour qu'elles expriment une PrP<sup>C</sup> hétérologue, issue d'une autre espèce, permet d'étudier les maladies à prions touchant cette autre espèce en s'affranchissant des potentielles interférences avec la protéine prion murine endogène (Telling et al., 1995; Weissmann and Büeler, 2004). La surexpression de la PrP<sup>C</sup> dans ces souris transgéniques permet de plus de réduire le temps d'incubation de la maladie (Brandner and Jaunmuktane, 2017). Aujourd'hui, il existe une multitude de modèles de souris transgéniques, exprimant des PrP bovines, ovines, porcines, humaines, de hamster, de cochon d'Inde, de campagnol ou de cervidés, avec une grande variété de polymorphismes (Brandner and Jaunmuktane, 2017).

#### 1.3.1.2.2. Modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer

Comme pour les maladies à prions, les modèles souris sont très utilisés dans l'étude de la maladie d'Alzheimer. Les rats sont également très intéressants car ils permettent des tests neurocomportementaux plus complexes (Folkesson et al., 2007) et la taille plus importante de leur cerveau facilite les analyses histologiques (Brandner and Jaunmuktane, 2017).

Les souris et les rats âgés ne développent de façon naturelle ni plaques séniles ni dégénérescence neurofibrillaire. De nombreux modèles permettent cependant de reproduire partiellement les lésions associées à la maladie d'Alzheimer et d'en étudier différents aspects (Duyckaerts et al., 2008). Les modèles basés sur la surexpression de l'APP murine sauvage ne présentent généralement pas de dépôts amyloïdes extracellulaires (Jankowsky et al., 2007). Par exemple, les souris trisomiques pour le chromosome 16, portant le gène codant l'APP, présentent des déficits d'apprentissage mais sans dépôt amyloïde visible (Reeves et al., 1995) ni augmentation de la concentration ou du niveau de phosphorylation de tau (Hunter et al., 2004). De façon similaire, de simples mutations de la préséniline 2 (protéine du complexe  $\gamma$ -sécrétase) chez la souris peuvent augmenter la production d'A $\beta$  et la proportion relative d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, mais sans provoquer de lésion visible (Sawamura et al., 2000).

Un grand nombre de souris et de rats utilisés comme modèles de la maladie d'Alzheimer expriment ou surexpriment une APP humaine portant une mutation impliquée dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Sasaguri et al., 2017). Ces souris présentent des dépôts de peptide Aβ similaires aux plaques séniles humaines (Johnson-Wood et al., 1997). Comme les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la plupart de ces animaux présentent une angiopathie cérébrale amyloïde (Herzig et al., 2006), avec parfois une colocalisation entre Aβ et APOE (Thal et al., 2007). Ces modèles peuvent également présenter un déficit de la potentialisation à long terme, soit de façon spontanée avec l'âge (Chapman et al., 1999), soit suite à l'inoculation d'oligomères d'Aβ (Walsh et al., 2002). Certaines souris modèles sont doublement transgéniques : elles coexpriment une APP humaine mutée et une préséniline mutée, ce qui permet d'abaisser l'âge de formation des plaques (Duff et al., 1996; Holcomb et al., 1998). Ainsi, ces souris transgéniques pour l'APP sont intéressantes pour étudier les lésions amyloïdes associées aux phases précliniques de la maladie d'Alzheimer (Sasaguri et al., 2017), mais pas la cause de la maladie d'Alzheimer, ni la tauopathie associée. En effet, bien que le niveau de phosphorylation de la protéine tau soit anormalement élevé dans certains de ces modèles, ils ne développent pas de dégénérescence neurofibrillaire (Duyckaerts et al., 2008). Trois explications peuvent être avancées : (i) la surexpression de l'Aβ humain pourrait ne pas être suffisante pour déclencher l'accumulation et l'agrégation de tau, (ii) la protéine tau des rongeurs pourrait être moins susceptible à l'agrégation que la protéine tau humaine et (iii) ces animaux ne vivent peut-être pas assez longtemps pour permettre le développement de la tauopathie suite à l'agrégation d'Aß (LaFerla and Green, 2012).

Ainsi, des modèles spécifiques ont dû être mis au point pour reproduire la dégénérescence neurofibrillaire. La protéine tau humaine normale exprimée chez la souris peut s'accumuler sous une forme hyperphosphorylée mais ne forme pas de filaments hélicoïdaux appariés (Brion et al., 1999; Ishihara et al., 1999), sauf en cas d'élimination de la protéine tau endogène de la souris, qui pourrait donc inhiber l'agrégation de la tau humaine (Andorfer et al., 2003). L'expression de formes mutées de la protéine tau humaine permet en revanche à de nombreux modèles souris de développer une dégénérescence neurofibrillaire (Götz et al., 2007). Ces modèles ne peuvent pas être utilisés pour comprendre les causes de la maladie d'Alzheimer, mais ils permettent d'étudier la propagation de la tauopathie (de Calignon et al., 2012), la neurotoxicité des enchevêtrements neurofibrillaires et leur synergie avec les dépôts amyloïdes (Duyckaerts et al., 2008).

#### 1.3.1.3. Modèles invertébrés

Les modèles simples et économiques que sont les drosophiles, les levures et les nématodes peuvent permettre d'identifier des interactions entre protéines et des voies potentiellement impliquées dans les maladies neurodégénératives. Ainsi, certains modèles drosophiles sont utilisés pour l'étude des maladies à prions (Gavin et al., 2006; Thackray et al., 2018) ou de la maladie d'Alzheimer (Caesar et al., 2012; Crowther et al., 2004). Le nématode *Caenorhabditis elegans* a également été utilisé pour élucider le rôle physiologique de la protéine apl-1, homologue de l'APP (Hornsten et al., 2007). La levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis de mieux comprendre le fonctionnement du complexe  $\gamma$ -sécrétase en le reconstituant dans cet organisme qui en est normalement dépourvu (Edbauer et al., 2003). Ces modèles restent cependant très éloignés de la neuropathologie des maladies neurodégénératives (Duyckaerts et al., 2008).

#### 1.3.2. Modèles ex vivo et in vitro

#### 1.3.2.1. Cultures organotypiques

Par rapport aux modèles animaux, les cultures organotypiques *ex vivo* sont très modulables. Elles permettent une augmentation des effectifs et une meilleure standardisation des conditions de culture, améliorant la reproductibilité des résultats (Brandner and Jaunmuktane, 2017). Ces modèles permettent de conserver l'intégrité des synapses (Bahr et al.,
1995), les interactions entre neurones et cellules gliales (Noraberg et al., 2005), et, de manière générale, la physiologie du tissu observé (Duff et al., 2002). Ainsi, des tranches de cervelets de souris transgéniques peuvent être maintenues en culture pendant huit semaines (Falsig and Aguzzi, 2008) et permettent, par exemple, d'étudier les fonctions physiologiques de la PrP<sup>C</sup> (Sonati et al., 2013). Elles sont infectables par le prion, avec des taux d'amplification similaires à ceux qui sont observés *in vivo* mais obtenus cinq fois plus rapidement (Falsig et al., 2008). Après infection, ces cultures peuvent développer une spongiose et des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> différents selon la souche, parfois associés à une neurotoxicité (Falsig et al., 2012). De la même façon, des tranches d'hippocampe préparées à partir de modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer peuvent être utilisées pour étudier l'impact des oligomères d'Aβ au niveau électrophysiologique (Chapman et al., 1999) ou cribler rapidement des stratégies thérapeutiques potentielles (Duff et al., 2002). Ces cultures organotypiques peuvent être vues comme un compromis entre les modèles animaux et les modèles de culture cellulaire. Cependant, les conditions de culture restent lourdes, ce qui peut expliquer pourquoi l'utilisation de ces modèles n'est pas plus répandue (Brandner and Jaunmuktane, 2017).

#### 1.3.2.2. Cultures de neurones

Les neurones primocultivés à partir de modèles rongeurs sont très utilisés dans l'étude des mécanismes à l'origine de l'initiation et de la propagation de maladies neurodégénératives. Ainsi, des neurones et des astrocytes primocultivés à partir de cervelets de souris exprimant la PrP ovine sont infectables par des prions ovins, avec une apoptose tardive mais systématique (Cronier et al., 2004). De la même façon, des neurones primocultivés à partir de souris exprimant la PrP de différentes espèces comme la souris, le hamster et l'homme permettent de propager d'autres prions, dont ceux de la MCJ (Cronier et al., 2007; Hannaoui et al., 2014). Ces modèles permettent d'étudier finement certains mécanismes des maladies à prions, comme l'activation de la microglie dans des cocultures de neurones et d'astrocytes infectés (Marella and Chabry, 2004), ou la médiation de la toxicité de la PrP<sup>Sc</sup> par la conversion de la PrP<sup>C</sup> endogène (Cronier et al., 2012). Ces modèles sont pertinents pour un premier criblage de molécules potentiellement anti-prions (Cronier et al., 2007), comme les cyclines (Hannaoui et al., 2014). Les cultures de neurones primaires sont également utilisées dans l'étude de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, l'exposition de neurones primaires d'hippocampe de rat à des oligomères d'A $\beta$  conduit à un dysfonctionnement des mitochondries avec diminution de la synthèse d'ATP et à une mort apoptotique des neurones (Yang et al., 2009), qui se produisent également *in vivo* (Keller et al., 2019; LaFerla et al., 1995). Une autre étude montre l'augmentation de la sécrétion d'Aß et de la phosphorylation de tau dans des neurones exposés à du cholestérol de type lipoprotéine de basse densité (LDL) contenant de l'apolipoprotéine B (APOB) (Hui et al., 2012). Malgré cette littérature abondante, la caractérisation structurale des assemblages d'Aß incriminés reste souvent incomplète.

L'utilisation de puces microfluidiques permet aujourd'hui de construire des réseaux de neurones primocultivés à façon (J. Millet et al., 2007), éventuellement en coculture avec des cellules gliales (Majumdar et al., 2011). Ce type de modèle est en constante amélioration (Courte et al., 2018; Peyrin et al., 2011; Renault et al., 2016). Ces dispositifs ont par exemple été utilisés dans l'étude de la propagation spatiale de l'infection prion le long des axones en fonction de la taille des particules infectieuses (Alleaume-Butaux et al., 2015; Bett et al., 2017), de la différence d'effet de certains assemblages d'A $\beta$  selon que l'exposition est réalisée au niveau du compartiment somato-dendritique ou des axones (Deleglise et al., 2014), ou encore de la propagation *prion-like* d'assemblages pathologiques d' $\alpha$ -synucléine en fonction du niveau de l'expression de cette protéine (Courte et al., 2020; Gribaudo et al., 2019).

La découverte d'une méthode pour induire des cellules souches pluripotentes par reprogrammation de fibroblastes humains (Takahashi and Yamanaka, 2006) a ouvert de nouvelles voies pour l'étude des mécanismes cellulaires, des critères de diagnostic et le criblage de molécules thérapeutiques pour la plupart des maladies, dont les maladies neurodégénératives (Brandner and Jaunmuktane, 2017; Sandoe and Eggan, 2013). En effet, ces cellules souches peuvent être différenciées en cellules souches neurales, en neurones ou en astrocytes utilisables pour des études de neurotoxicité (Pei et al., 2016). Les astrocytes ainsi différenciés sont infectables par les prions (Krejciova et al., 2017). Différents modèles de la maladie d'Alzheimer ont également été établis par induction de cellules souches par reprogrammation à partir de fibroblastes de patients atteints de formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Auboyer et al., 2019a, 2019b). Ces cellules souches peuvent ensuite être différenciées en neurones : ce type de modèles a mis en évidence une perte de plasticité synaptique en réponse à des assemblages extracellulaires d'Aβ et de tau (Hu et al., 2018). Comme cette approche permet de propager des neurones et des atrocytes différenciés, elle présente moins de contraintes que la culture primaire une fois que les lignées sont obtenues, et on peut donc s'attendre dans les prochaines années à une augmentation de leur utilisation.

Ces cellules souches induites par reprogrammation peuvent également être différenciées en neuroectoderme, qui, cultivé dans les conditions appropriées, peut se développer en un organoïde cérébral, ou *Mini Brain*, anatomiquement proches de la structure du cerveau (Lehmann et al., 2019). Ces outils sont extrêmement prometteurs dans l'étude de maladies neurodégénératives (Fischer, 2017; Nassor et al., 2020), dont les maladies à prions (Groveman et al., 2019) et la maladie d'Alzheimer (Pavoni et al., 2018).

74

#### 1.3.2.3. Lignées de cellules immortalisées

Les lignées de cellules immortalisées sont faciles à manipuler, se multiplient théoriquement de façon illimitée et peuvent être congelées et décongelées en conservant les mêmes caractéristiques : elles sont donc particulièrement utiles en première intention pour modéliser un grand nombre de processus biologiques (Magsood et al., 2013).

#### 1.3.2.3.1. Cellules immortalisées sensibles aux infections à prions

Pour des raisons inconnues, la plupart des lignées cellulaires sont résistantes aux infections à prions (Arellano-Anaya et al., 2017; Solassol et al., 2003). Jusqu'au début des années 2000, les lignées permissives aux infections à prions décrites n'étaient infectables que par des souches adaptées à la souris (Vilette, 2008). C'est le cas de la lignée SMB, obtenue à partir du cerveau d'une souris infectée par la souche Chandler de la tremblante du mouton adaptée à la souris (Chandler, 1961) et capable d'amplifier la PrP<sup>Sc</sup> pendant plus de quarante passages (Clarke and Haig, 1970). L'utilisation de cette lignée cellulaire est restée relativement limitée en raison de l'absence de cellules contrôles adaptées. Le même groupe a décrit une lignée de type fibroblastes de souris, infectable par des prions murins (Clarke and Millson, 1976). D'autres lignées de cellules, issues de tumeurs du cerveau, permettent de propager les prions murins. C'est le cas de la lignée N2a, dérivée d'un neuroblastome de souris (Chang and Prasad, 1976), infectable par différentes souches de prions murins, mais avec un pourcentage de cellules infectées relativement faible et un titre infectieux variable d'une expérience à l'autre (Race et al., 1987), et sans changement cytolytique des cellules infectées (Butler et al., 1988). La lignée N2aPK1, plus sensible à l'infection, a par la suite été isolée à partir des cellules N2a (Klöhn et al., 2003). De façon similaire, la lignée GT1, établie à partir d'une tumeur d'hypothalamus de souris (Mellon et al., 1990), est sensible à l'infection par une souche murine. L'infection de ces cellules peut conduire à des phénotypes de vacuolisation et à une diminution de leur viabilité (Schätzl et al., 1997). Des expériences de sous clonage de ces différents modèles cellulaires ont permis d'établir des lignées de cellules répondant à l'infection de manière plus forte et plus homogène, permettant de produire de plus grandes quantités de PrP<sup>Sc</sup> (Bosque and Prusiner, 2000). La lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y (Biedler et al., 1978) est l'une des rares lignées dont certains sous clones seraient infectables par des souches humaines de maladies à prions (Ladogana et al., 1995; Solassol et al., 2003). Elle a également été utilisée pour l'étude des fonctions de la PrP<sup>C</sup> (Li et al., 2009; Watt et al., 2007).

Comme pour les modèles souris des maladies à prions, les lignées cellulaires n'exprimant pas de PrP<sup>C</sup> sont particulièrement intéressantes, car elles peuvent être transfectées pour exprimer des PrP de différentes espèces et ainsi permettre d'étudier l'infection par des souches issues de ces espèces sans risque d'interaction avec la PrP<sup>C</sup> endogène (Sakudo et al., 2007). Par exemple, la lignée RK13 est une lignée de cellules épithéliales de rein de lapin, facile à cultiver, qui n'exprime pas de PrP endogène détectable (Christofinis and Beale, 1968). La lignée Rov9 a été sélectionnée à partir de cellules RK13 transfectées pour exprimer de façon inductible l'allèle V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> de la PrP<sup>C</sup> ovine (VRQ), qui confère aux animaux une plus grande sensibilité à l'infection par la tremblante classique (Hunter et al., 1996; Saunders et al., 2006). Cette lignée cellulaire est ainsi infectable par la souche 127S de tremblante du mouton (Vilette et al., 2001). De la même façon, d'autres lignées basées sur des cellules RK13 transfectées avec des vecteurs d'expression de différentes PrP hétérologues sont infectables par des prions de campagnol, de souris (Courageot et al., 2008), de cervidés (Bian et al., 2010), de chèvre (Dassanayake et al., 2016), et par des prions humains adaptés à la souris (Lawson et al., 2008), mais pas directement par les souches humaines et bovines (Arellano-Anaya et al., 2017). Ces modèles ont permis d'étudier différents aspects des maladies à prions, comme la propagation spatiale de l'infection (Paquet et al., 2007), l'effet de la glycosylation de la PrP<sup>C</sup> sur l'infectabilité des cellules (Salamat et al., 2011), ou l'infectabilité de cellules exprimant des mutants de délétion de la PrP<sup>C</sup> pour identifier les régions nécessaires à sa conversion en PrP<sup>Sc</sup> (Munoz-Montesino et al., 2016). Ces cellules peuvent également être utilisées comme substrat pour l'amplification in vitro de la PrPSc par PMCA en remplacement de l'homogénat de cerveau de souris saines classiquement utilisé (Moudjou et al., 2016).

Même si ce type de modèle a contribué de manière décisive à la compréhension de la propagation de l'infection prion de cellule à cellule, les conséquences de l'infection au

niveau cellulaire restent mal connues, et ces modèles cellulaires sont très intéressants pour les étudier dans une première approche(Priola, 2018; Vilette et al., 2018).

#### 1.3.2.3.2. Cellules immortalisées modèles de la maladie d'Alzheimer

De nombreuses lignées cellulaires ont été utilisées pour modéliser certains aspects de la maladie d'Alzheimer, comme la toxicité d'assemblages d'Aβ. Par exemple, la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y, décrite au paragraphe précédent, est sensible à certains oligomères d'A<sub>β1-40</sub>, qui sont capables de se lier aux membranes, d'être internalisés par les cellules et de perturber leur homéostasie du calcium (Johnson et al., 2011), ce qui est également observé dans des ovocytes de xénope et des neurones corticaux de souris (Um et al., 2013), et in vivo (Haas et al., 2016). Des lignées dérivées de N2a ont été utilisées pour étudier, par exemple, la localisation à l'échelle subcellulaire des clivages de l'APP (Thinakaran et al., 1996), les mécanismes potentiels de l'hyperphosphorylation de tau (Zhang et al., 2006b), l'effet de la surexpression de tau sur la toxicité induite par Aß (Wang et al., 2010), ou pour cribler de potentielles stratégies thérapeutiques (Chen et al., 2012; Yan et al., 2012). Des lignées microgliales immortalisées ont également été utilisées pour étudier la réaction inflammatoire observée dans le cas de la maladie d'Alzheimer, comme la lignée BV-2, dérivée de cellules mononucléaires embryonnaires, qui a permis d'étudier les mécanismes de l'inflammation (Long et al., 2019) et de cribler l'effet de composés anti-inflammatoires sur la maladie d'Alzheimer (Cui et al., 2018; He et al., 2011; Huang et al., 2018). Une nouvelle lignée de cellules microgliales, établie à partir du cerveau de souris adultes, semble prometteuse, car leur activation en réponse à Aß est supérieure à celle qui est observée pour les cellules BV-2 (McCarthy et al., 2016).

Plusieurs types cellulaires ont été utilisés pour produire des mélanges d'assemblages d'Aβ afin d'évaluer leur toxicité. Ainsi, des cellules CHO, issues d'ovaires de hamster, modifiées pour surexprimer APP, excrètent des assemblages d'Aβ provoquant un déficit de la potentialisation à long terme après injection chez le rat (Walsh et al., 2002). De la même façon, la lignée N2a surexprimant l'APP a été utilisée pour produire des oligomères solubles d'Aβ capables d'induire l'apoptose de neurones primocultivés (Yang et al., 2009). La lignée RK13 a également été modifiée génétiquement pour exprimer A $\beta_{1-40}$ , et les assemblages produits sont capables de ralentir l'infection prion dans un modèle de coculture avec des tranches organotypiques de cervelet (Igel Egalon, 2013).

#### 1.3.3. Perspectives pour les modèles de maladies neurodégénératives

Ainsi, de nombreux modèles coexistent pour l'étude des maladies neurodégénératives, qui présentent tous des avantages et des limites qui doivent être pris en compte au moment du choix du modèle. Les études sur les cultures cellulaires ont énormément contribué à la compréhension des mécanismes des maladies neurodégénératives, mais les modèles animaux restent nécessaires. Par exemple, de nombreux composés anti prions et anti Alzheimer, prometteurs *in vitro*, se sont révélés décevants *in vivo*, et seuls les modèles animaux permettent d'étudier précisément les phénotypes cliniques de la maladie (Brandner and Jaunmuktane, 2017; Godyń et al., 2016). On peut donc s'attendre à un développement simultané des modèles *in vivo, ex vivo* et *in vitro*, ainsi que des modèles *in silico*. Ces derniers peuvent en effet modéliser les mécanismes de formation des dépôts protéiques des maladies à prions (Zou and Gambetti, 2004) et de la maladie d'Alzheimer (Edelstein-keshet and Spiros, 2002), en prenant potentiellement en compte le rôle de la protéine prion (Helal et al., 2014), et contribuent à identifier de potentiels traitements anti-prion (Hosokawa-Muto et al., 2009) ou des cibles pharmaceutiques contre la maladie d'Alzheimer (Shaik et al., 2016; Speck-Planche et al., 2013). La Figure 22 récapitule ces perspectives.



Figure 22 : Perspectives dans le développement de nouveaux modèles de maladies neurodégénératives

On peut s'attendre au développement de nouveaux modèles de souris transgéniques (à gauche), basés sur les nouvelles techniques d'édition génétique. D'autres espèces peuvent être utilisées : d'une part les espèces faciles à entretenir et à manipuler comme les drosophiles et les nématodes, et d'autre part les rats, dont le cerveau de taille plus importante facilite les analyses histologiques. Les cellules souches pluripotentes induites peuvent être différenciées en neurones et en astrocytes qui peuvent constituer de bons modèles des maladies neurodégénératives. De nouveaux modèles cellulaires et acellulaires pourront également contribuer à élucider certains mécanismes de la pathogénèse et de la propagation des maladies.

Figure adaptée de (Brandner and Jaunmuktane, 2017) (CC BY 4.0).

#### 1.4. Méthodes de suivi du stress oxydant en cellules

#### 1.4.1. Sondes chimiques et dosages d'espèces oxydantes ou réductrices

Différentes sondes chimiques sont couramment utilisées pour quantifier le stress oxydant cellulaire de façon globale. Par exemple, l'oxydation de la dichlorodihydrofluoroscéine par l'ensemble des EROA forme la dichlorofluoroscéine fluorescente (Figure 23A). L'apparition de la dichlorofluoroscéine peut être suivie en temps réel *in cellulo* par spectrofluométrie. Cette sonde est peu sensible (seuil d'environ 100 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sa fluorescence n'est pas proportionnelle à la concentration en EROA (Cathcart et al., 1983; Wang and Joseph, 1999), et elle peut être convertie en espèces radicalaires toxiques, qui biaisent les résultats obtenus (Bonini et al., 2006). Plusieurs sondes basées sur ce principe ont été développées pour quantifier le niveau d'oxydation global des thiols avec une meilleure sensibilité (Maeda et al., 2005). De façon similaire, le réactif d'Ellman, ou acide dithionitrobenzoïque, réagit de façon équimolaire avec les thiols pour donner un anion coloré (Ellman, 1959), mais cette réaction est lente et souvent incomplète (Riener et al., 2002).

Une approche plus fine pour quantifier le stress oxydant est la quantification spécifique d'ERO. La plupart ont une très courte durée de vie et ne peuvent donc pas être quantifiées facilement de façon directe. Ainsi, seule la spectroscopie par résonance de spin électronique (RSE) permet de détecter spécifiquement les électrons non appariés des radicaux libres in vivo (Mason and Ganini, 2019). Cette technique ne permet de détecter que les radicaux relativement peu réactifs, qui s'accumulent à des niveaux suffisamment élevés pour être détectables. Pour détecter de façon indirecte les radicaux les plus réactifs, des « piégeurs » comme le N-oxyde de 5,5-diméthyl-1-pyrroline (DMPO) peuvent être utilisés : ces molécules réagissent avec les radicaux pour former des adduits, dont la durée de vie est plus longue que celle du radical initial (Halliwell and Whiteman, 2004). Cette méthode est cependant peu sensible, coûteuse, et peut de plus être biaisée : en particulier, la conversion rapide de l'adduit par les systèmes antioxydants cellulaires peut conduire à des erreurs d'interprétation (Mason and Ganini, 2019; Pou et al., 1989). Le dihydroéthidium (DHE) est spécifiquement oxydé en 2-hydroxyéthidium fluorescent par l'anion radicalaire O2.- (Michalski et al., 2014; Zhao et al., 2003). Cependant, dans les systèmes biologiques, de l'éthidium est également formé par oxydation non spécifique du DHE, et les spectres de fluorescence de l'éthidium et de l'hydroxyéthidium se chevauchent. Ainsi, seule une analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet d'utiliser le DHE et sa version spécifique des mitochondries mitoSOX comme des sondes spécifiques de l'anion superoxyde (Zielonka and Kalyanaraman, 2010; Zielonka et al., 2008). Le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une espèce réactive de l'oxygène stable, ce qui facilite sa quantification (Halliwell and Whiteman, 2004). Il peut être quantifiée de façon spécifique par titrage en utilisant par exemple comme solution titrante le permenganate de potassium (Huckaba and Keyes, 1948) ou le sulfate de cérium (Hurdis and Romeyn, 1954), avec une faible sensibilité.



## Figure 23 : Exemples de molécules pour la quantification d'ERO par fluorescence et luminescence

A : la 2', 7' dichlorodihydrofluorescéine diacétate est oxydée de façon non spécifique en 2'-7'-dichlorofluorescéine. Adapté avec l'autorisation de John Wiley & Sons de (Halliwell and Whiteman, 2004), © 2004 Nature Publishing Group.

B : L'oxydation du luminol par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit de la chimiluminescence qui peut être suivie en temps réel (Kazemi and Abedirad, 2012).

C : Mécanisme d'oxydation irréversible du groupement boranate par  $H_2O_2$ . Adapté avec l'autorisation d'ACS Publications de (Lippert et al., 2011), © 2011, American Chemical Society.

D : La sonde peroxyfluor 1, oxydée par deux molécules d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est convertie en fluorescéine. Adapté avec l'autorisation d'ACS Publications de (Lippert et al., 2011), © 2011, American Chemical Society.

E : La sonde Mito-Peroxy-Yellow-1 est adressée spécifiquement aux mitochondries. Son oxydation par une molécule d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donne un produit fluorescent. Adapté avec l'autorisation d'ACS Publications de (Dickinson and Chang, 2008), © 2008, American Chemical Society.

La chimiluminescence émise par l'oxydation du luminol par l'H2O2 (Figure 23B) peut

également permettre de quantifier l'H2O2, avec une gamme linéaire comprise entre 10 et

10000 µM (Warm and Laties, 1982). Différents catalyseurs permettent d'accélérer la réaction

et de renforcer la luminescence, comme l'albumine de sérum bovin (BSA) ou humain (Deng

et al., 2014; Kazemi and Abedirad, 2012). Des méthodes plus sensibles sont basées sur l'oxydation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'un substrat en un produit coloré ou fluorescent qui peut ensuite être détecté par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie. Par exemple, l'oxydation de l'acide homovanillique donne un dimère fluorescent, avec une intensité de fluorescence proportionnelle à la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 0,044 et 4,4  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ruch et al., 1983). Une autre famille de sondes chimiques spécifiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est basée sur l'oxydation spécifique du groupement boronate (Lippert et al., 2011) (Figure 23C). La sonde Peroxyfluor 1 est ainsi une fluorescéine masquée par deux groupements boronate. L'oxydation spécifique et irréversible de cette sonde par deux molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la convertit en fluorescéine (Figure 23D) (Lippert et al., 2011). De nombreuses sondes fluorescentes sont basées sur ce principe (Dickinson et al., 2010), dont la sonde Peroxy-Yellow-1, qui est plus sensible que Peroxyfluor 1 car elle réagit avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de façon équimolaire, et qui peut être adressée aux mitochondries (Dickinson and Chang, 2008) (Figure 23E).

Le stress oxydant peut se caractériser par un excès d'EROA, mais également par un défaut d'antioxydants. Le glutathion est l'un des antioxydants les plus abondants dans les cellules, présent dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau et les mitochondries (Mazzetti et al., 2015). Dans les conditions physiologiques normales, le glutathion est très majoritairement réduit, et son oxydation est couplée à la réduction des ERO. La concentration totale du glutathion et, surtout, le rapport glutathion réduit sont donc de bons indicateurs du stress oxydant cellulaire (Haleng et al., 2007; Jones, 2002). La concentration et le niveau d'oxydation du glutathion peuvent être quantifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (Fracassetti et al., 2011), par électrophorèse capillaire (Camera and Picardo, 2002) ou par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Squellerio et al., 2012). Le glutathion et le rapport glutathion  $\frac{glutathion réduit}{glutathion oxydé}$  peuvent également être quantifiés dans des lysats de cellules en utilisant la sonde Luciferin-NT, convertie en luciférine par le glutathion réduit : cette sonde est commercialisée par Promega dans des kits de quantification du glutathion (Scherer et al., 2008).

Ainsi, de nombreuses méthodes permettent de quantifier le stress oxydant, soit par le suivi global de l'oxydation d'une molécule par toutes les ERO, soit par quantification spécifique d'une ERO, en particulier H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou d'une molécule antioxydante, en particulier le glutathion. La Table II récapitule quelques-unes de ces méthodes. Certaines sondes fluorescentes permettent un suivi en temps réel de l'apparition du stress oxydant avec une résolution cellulaire, voire subcellulaire, ce qui est particulièrement intéressant car l'apparition du stress oxydant est un processus dynamique dont le point de départ se situe souvent au niveau des mitochondries (Gardès-Albert et al., 2003). Ces sondes sont cependant limitées par l'irréversibilité de leur oxydation et leur caractère qualitatif (Meyer and Dick, 2010).

Méthode/ sonde	Avantages	Inconvénients	
Dichlorofluoros-	Suivi en temps réel par	Absence de linéarité	
céine	fluométrie	Cytotoxicité	
acide dithionitro-	Suivi en temps réel par co-	Réaction lente et incom-	
benzoïque	lorimétrie	plète	
spectroscopie par	Spécificité pour les radi-	Equipement coûteux	
RSE	caux	Biais potentiels	
	Spécificité (si analyse par		
DHE	HPLC)	Analyse par fluores-	
DHL	Adressage possible aux mi-	cence biaisée	
	tochondries (mitoSOX)		
Titrage chimique	Spécificité	Très faible sensibilité	
(permenganate)			
Luminol	Linéarité	Sensibilité variable	
		Catalyse nécessaire	
PF1	Suivi en temps réel	Réaction lente et irré-	
		versible	
	Suivi en temps reel		
DV/1	DE1	Réaction lente et irré-	
PTI	PFI	versible	
	tochondries		
НЫС	Sancihilitá		
	_ Jinéarité	Equipements coûteux	
	Linconte	Protocole fastidieux	
Sonde luciférine	Linéarité	Faible reproductibilité	
	Méthode/ sondeDichlorofluoros- céineacide dithionitro- benzoïquespectroscopie par RSEDHETitrage chimique (permenganate)LuminolPF1PY1HPLC LC-MS/MSSonde luciférine	Méthode/ sondeAvantagesDichlorofluoros- céineSuivi en temps réel par fluométrieacide dithionitro- benzoïqueSuivi en temps réel par co- lorimétriespectroscopie par RSESpécificité pour les radi- cauxDHESpécificité (si analyse par HPLC) Adressage possible aux mi- tochondries (mitoSOX)Titrage chimique (permenganate)SpécificitéPF1Suivi en temps réel Meilleure sensibilité que PF1PY1PF1 Adressage possible aux mi- tochondriesPV1PF1 Suivi en temps réel Meilleure sensibilité que PF1 Adressage possible aux mi- tochondriesHPLC LC-MS/MSSensibilité LinéaritéSonde luciférineLinéarité	

Table II : Exemple de méthodes de quantification du stress oxydant par dosage d'espèces rédox ou utilisation de sondes chimiques

#### 1.4.2. Sondes peptidiques codées génétiquement

Aujourd'hui, les outils les plus performants pour le suivi en temps réel des ERO et du niveau d'oxydation des thiols in vivo sont les sondes peptidiques codées génétiquement (Lukyanov and Belousov, 2014; Meyer and Dick, 2010). De manière générale, leur nature protéique permet de les adresser à différents organites, tels que le noyau ou les mitochondries, permettant une résolution subcellulaire (Banach-latapy et al., 2013; He et al., 2015). La Figure 24 présente les sondes rédox codées génétiquement les plus populaires (Lukyanov and Belousov, 2014). Ces sondes sont basées sur des protéines fluorescentes verte (GFP) et jaune (YFP) permutées circulairement (cpGFP et cpYFP) : les extrémités N- et C-terminales originales sont fusionnées par un linker polypeptidique de 6 à 10 acides aminés, et la protéine est coupée au niveau du tonneau β qui entoure le chromophore (Baird et al., 1999). La sonde HyPer-1 est constituée d'une cpYFP intégrée au sein du domaine régulateur de la protéine OxyR de E. coli, qui est un régulateur de transcription sensible à l'oxydation spécifique par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zheng et al., 1998). L'oxydation de la sonde par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit à la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines proches du fluorophore, ce qui modifie sa géométrie et donc ses propriétés de fluorescence (Belousov et al., 2006) (Figure 24A). Les sondes HyPer-2 (Markvicheva et al., 2011) et HyPer-3 (Bilan et al., 2013) présentent une gamme dynamique plus étendue que HyPer-1. La redox sensitive YFP (rxYFP) est une cpYFP dans laquelle deux acides aminés de part et d'autre du fluorophore ont été remplacés par des cystéines à activité rédox. Cette sonde est ainsi un couple rédox qui s'équilibre avec l'ensemble des thiols, dont le plus abondant est le glutathion. Comme pour HyPer, l'oxydation de la sonde modifie ses propriétés de fluorescence (Østergaard et al., 2001) (Figure 24B). La reduction-oxidation sensitive GFP (roGFP) est basée sur le même principe, avec une GFP à la place de la YFP (Dooley et al., 2004; Hanson et al., 2004) (Figure 24C). La sonde rxYFP s'équilibre très lentement avec les thiols in cellulo, et cette réaction est plus rapide en présence de Grx recombinante (Østergaard et al., 2004). La fusion avec une Grx de rxYFP (sonde GrxrxYFP) (Björnberg et al., 2006) et de roGFP (sonde Grx-roGFP) (Gutscher et al., 2008) (Figure 24D) permet d'accélérer considérablement la dynamique de ces sondes par un échange rapide de ponts disulfures intramoléculaires, ce qui les rend très utiles pour suivre in vivo le niveau d'oxydoréduction du glutathion (Lukyanov and Belousov, 2014). De façon similaire, la fusion de roGFP avec la peroxydase Orp1 est une sonde spécifique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gutscher et al., 2009) (Figure 24E). La fusion de roGFP avec la peroxyrédoxine Tsa2 permet une détection spécifique et ultra sensible de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compatible avec le suivi de ses variations de concentrations physiologiques (Morgan et al., 2016).



#### Figure 24 : Exemples de sondes rédox peptidiques codées génétiquement

Les cinq sondes fluorescentes présentées sont fondées sur un changement de géométrie du fluorophore dû à la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines (C) lorsque la protéine est oxydée. La sonde HyPer (A) est spécifique de  $H_2O_2$  grâce au domaine régulateur du régulateur de transcription OxyR de *E. Coli.* Les sondes rxYFP et roGFP (B et C) s'équilibrent avec l'ensemble des thiols avoisinants grâce aux glutarédoxines cellulaires. Les sondes Grx-roGFP et Orp-roGFP sont spécifiques respectivement du couple glutathion réduit/ glutathion oxydé et de  $H_2O_2$  grâce à la fusion de roGFP respectivement avec une glutarédoxine et une protéine régulée par l'oxygène.

Toutes ces sondes (Figure 24) présentent un changement de leur spectre d'excitation quand elles sont oxydées. Ce changement est indépendant de l'intensité de l'éclairage, de la concentration de la sonde ou du photoblanchiment (Meyer et Dick 2010 ; Lukyanov et Belousov 2014) (Meyer et Dick 2010 ; Fricker 2016). Ainsi, chacune de ces sondes présente deux pics d'excitation correspondant respectivement aux formes réduites et oxydées, ainsi qu'un point isobestique, *i.e.* une longueur d'onde à laquelle l'intensité de la fluorescence émise est indépendante du niveau d'oxydation de la sonde (Figure 25). Ces sondes sont dites ratiométriques en excitation : la valeur du ratio des deux intensités de fluorescence émises après excitation de ces sondes à chacun de ces deux pics est indépendante de la concentration locale en sonde, ce qui permet d'éviter les biais dûs à la variation de la morphologie des cellules au cours du temps, ou au photoblanchiement (Lukyanov and Belousov, 2014; Meyer and Dick, 2010). Cependant, le pic d'excitation de la rxYFP oxydée est à 404 nm et n'est pas fluorescent : seule l'intensité de la fluorescence émise après excitation au pic correspondant à la rxYFP réduite peut être suivie en microscopie à fluorescence (Lukyanov and Belousov, 2014). Les sondes dérivées de HyPer peuvent en revanche être suivies de manière ratiométrique en temps réel par microscopie à fluorescence dans les cellules vivantes, comme roGFP et ses dérivés (Belousov et al., 2006; Dooley et al., 2004). Le pourcentage de sonde oxydée peut également être suivi par western blot rédox, ce qui permet de quantifier la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou le niveau d'oxydation des thiols cellulaires de façon discrète (Banach-latapy et al., 2013; He et al., 2015). Les sondes HyPer et rxYFP, contrairement aux sondes dérivées de roGFP, sont également sensibles au pH : l'utilisation de ces sondes nécessite donc de contrôler le pH (Lukyanov and Belousov, 2014)





A : Spectres d'excitation de la sonde HyPer1 à pH 7,5 avec des concentrations variables de  $H_2O_2$ . Adapté avec l'autorisation de Springer Nature de (Belousov et al., 2006), © 2006, Springer Nature.

B : Spectres d'excitation de la sonde rxYFP réduite ou oxydée à pH 7. Adapté avec l'autorisation de John Wiley & Sons de (Østergaard et al., 2001), © 2001 John Wiley & Sons.

C : Spectres d'excitation de la sonde roGFP2 en bis(2-mercaptoéthyl)sulfone (BMES). Adapté avec l'autorisation de l'*American Society for Biochemistry and Molecular Biology* de (Dooley et al., 2004), © 2004 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Pic réd : pic d'excitation de la sonde réduite. Pic ox : pic d'excitation de la sonde oxydée. iso : point isobestique.

Ainsi, les sondes rédox basées sur les protéines fluorescentes codées génétiquement permettent un suivi dynamique, précis et spécifique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du niveau d'oxydation des thiols, avec une résolution subcellulaire. L'utilisation de la microscopie à fluorescence permet un suivi en temps réel sur les cellules vivantes (Mishina et al., 2013a). On peut s'attendre au développement de nouvelles sondes, spécifiques par exemple d'autres EROA comme l'anion superoxyde ou le monoxyde d'azote NO<sup>-</sup> (Lukyanov and Belousov, 2014).

#### 1.5. Objectifs du projet de recherche et stratégie expérimentale

La maladie d'Alzheimer comme les maladies à prions sont ainsi des maladies neurodégénératives irréversibles caractérisées par la transconformation d'une chaîne polypeptidique qui forme une grande variété d'agrégats dont certains sont toxiques. Il s'agit du peptide Aβ pour la maladie d'Alzheimer et de la protéine prion (PrP) pour les maladies à prions. Les deux pathologies présentent par ailleurs un stress oxydant précoce impliqué dans la neurodégénérescence. Certains assemblages d'Aβ et de PrP favorisent le stress oxydant. Réciproquement, le stress oxydant favoriserait l'agrégation de protéines. Les assemblages impliqués dans ce cercle vicieux sont encore mal documentés : beaucoup d'études portent sur des assemblages dont la caractérisation est incomplète. Par ailleurs, la protéine prion normale, décrite comme neuroprotectrice, semble nécessaire à la toxicité des assemblages infectieux de PrP dans le cadre des maladies à prions, mais aussi de certains assemblages oligomériques d'Aβ dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Ce projet de recherche a ainsi pour objectifs d'identifier les assemblages d'A $\beta$  et de PrP les plus perturbateurs de l'homéostasie rédox et d'étudier le rôle de la PrP normale dans la médiation de leur toxicité, pour mieux comprendre les dysfonctionnements neuronaux précoces dans ces protéinopathies. La première étape a été la construction de modèles cellulaires basés sur la lignée épithéliale RK13, permettant de suivre en temps réel le niveau d'oxydation des thiols et la concentration en péroxyde d'hydrogène grâce à des sondes rédox protéiques. Nous avons utilisé ces modèles cellulaires pour étudier les effets sur l'homéostasie rédox cellulaire (i) des formes physiologiques de PrP et d'A $\beta$ , produites de façon endogène par les cellules, et (ii) de différents assemblages de PrP, infectieux ou non, et d'A $\beta$ , avec et sans expression de PrP. Pour quantifier et analyser les résultats obtenus de façon rapide, reproductible et robuste, nous avions au préalable élaboré des outils de traitement d'images et d'analyse quantitative et statistique des courbes obtenues. Les objectifs du projet de recherche et la stratégie expérimentale sont résumés par la Figure 26.



Figure 26 : Objectifs du projet de thèse et stratégie expérimentale

## 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Construction des modèles cellulaires RK13

#### 2.1.1. Construction des vecteurs de coexpression inductibles

#### 2.1.1.1. Stratégie de construction des différents vecteurs

Les différentes constructions (Table III) sont introduites dans le vecteur d'expression pTRE3G (Clontech), sous le contrôle du promoteur inductible TRE3G. Les séquences des cadres ouverts de lecture sont contrôlées avant transfection des cellules. Les clonages sont conçus en utilisant le logiciel ApE (*a plasmid editor*) (<u>https://jorgensen.bio-logy.utah.edu/wayned/ape/</u>).

Condo	Compartiment	Protéine d'intérêt après le peptide 2A			
Sonde		aucune	Αβ <sub>1-40</sub>	PrP allèle VRQ	
HyPer1	Cytoplasme	HC0	HCA	HCV	
	Mitochondries	HM0	НМА	HMV	
	Noyau	HN0	HNA	HNV	
Grx1-roGFP2	Cytoplasme	GGC0	GGCA	GGCV	
	Mitochondries	GGM0	GGMA	GGMV	
	Noyau	GGN0	GGNA	GGNV	

Table III : Notation des constructions réalisées

Pour l'ensemble des constructions, la séquence codant respectivement P2A A $\beta_{1-40}$  ou P2A VRQ est clonée respectivement entre *Nde*I et *Pst*I ou *Nde*I et *Nhe*I. La séquence codant la sonde est ensuite clonée en amont, entre les sites *Sal*I et *Nde*I. La Figure 27 présente le vecteur pTRE3G HCA à titre d'exemple, et la Figure 28 présente les cartes simplifiées de l'ensemble des plasmides construits.



#### Figure 27 : Construction du vecteur de coexpression de HyPer1 et Aβ1-40

A : Séquence du gène synthétique codant la séquence P2A suivie du peptide A $\beta_{1-40}$  adressé au réticulum endoplasmique. Les sites de restriction *Nde*I et *Pst*I sont en vert. La séquence codant P2A est en bleu. La séquence codant le peptide signal de l'insuline est en orange. La séquence codant le peptide A $\beta_{1-40}$  humain est en rouge.

B : Carte du plasmide pTRE3G Hyper1 cyto NES P2A insuline A $\beta_{1-40}$  après clonage de la séquence codant HyPer1 avec exclusion du noyau entre les sites *Sal*I et *Nde*I.

#### Vecteur pTRE3G P2A signal A<sub>β1-40</sub>

La séquence nucléique synthétique codant P2A suivie de A<sub>β1-40</sub> humain en fusion avec le peptide signal de l'insuline, flanquée des sites de restriction *Nde*I et *Pst*I (Figure 27A), est synthétisée et introduite par la société GenScript dans le plasmide pUC57 puis clonée dans pTRE3G entre ces deux sites.

#### Vecteurs pTRE3G HCA, HMA, HNA, GGCA, GGNA (Figure 28, colonne 2, lignes 1 à 5)

Les séquences codant HyPer1 adressée respectivement au cytoplasme avec exclusion du noyau, aux mitochondries et au noyau sont amplifiées par PCR à partir de plasmides déjà présents au laboratoire (Table V) à l'aide d'amorces portant les sites *Sal*I et *Nde*I (Table IV), puis clonées en amont de la séquence P2A A $\beta$  dans le vecteur pTRE3G P2A signal A $\beta_{1-40}$ . La même stratégie est utilisée pour cloner les séquences codant Grx1 roGFP2 adressée respectivement au cytoplasme avec exclusion du noyau en amont de la séquence P2A A $\beta$  dans le vecteur pTRE3G P2A signal A $\beta_{1-40}$  (Table V, Table IV).

#### Vecteur pTRE3G P2A VRQ

La séquence nucléique synthétique codant P2A suivie de l'allèle V136 R154 Q171 (VRQ) de la protéine prion ovine, flanquée des sites de restriction *Nde*I et *NheI*, est synthétisée par la société GenScript, introduite dans le plasmide pUC57 puis clonée dans pTRE3G entre ces deux sites.

#### Vecteurs pTRE3G HCV, HMV, HNV, GGCV, GGNV (Figure 28, colonne 3, lignes 1 à 5)

Les séquences codant HyPer1 adressée respectivement au cytoplasme avec exclusion du noyau, aux mitochondries et au noyau sont amplifiées par PCR à partir de plasmides déjà présents au laboratoire (Table V) à l'aide d'amorces portant les sites *Sal*I et *Nde*I (Table IV), puis clonées en amont de la séquence P2A VRQ dans le vecteur pTRE3G P2A VRQ. La même stratégie est utilisée pour cloner les séquences codant Grx1-roGFP2 adressée respectivement au cytoplasme avec exclusion du noyau en amont de la séquence P2A VRQ dans le vecteur pTRE3G P2A VRQ (Table V, Table IV).

#### Vecteurs pTRE3G GGMA, GGMV (Figure 28, colonnes 2 et 3, ligne 6)

La séquence codant la séquence d'adressage aux mitochondries (*mitochondria leading sequence*, ou MLS) est amplifiée par PCR à partir du plasmide pCMV/myc/mito/HyPer1 (Table V) à l'aide d'amorces portant les sites *Sal*I et *Nde*I (Table IV) et clonée entre ces sites dans les vecteurs pTRE3G P2A signal A $\beta_{1-40}$  et pTRE3G P2A VRQ, donnant les vecteurs pTRE3G MLS P2A signal A $\beta_{1-40}$  et pTRE3G MLS P2A VRQ. La séquence codant Grx1-roGFP2 est amplifiée par PCR à partir du plasmide pCMV/myc/cyto/NES-Grx1-roGFP2 (Table V) à l'aide d'amorces portant les sites *Bssh*II et *Nde*I (Table IV) puis clonée en amont du MLS dans les plasmides pTRE3G MLS P2A signal A $\beta_{1-40}$  et pTRE3G MLS P2A VRQ.



Figure 28 : Cartes simplifiées des vecteurs d'expression inductibles construits pour coexpression des sondes avec PrP ou A $\beta$ 

#### Vecteurs pTRE3G HC0, HM0, HN0, GGC0, GGN0, GGM0

Les vecteurs d'expression des sondes seules (Figure 24, colonne 1) sont obtenus par introduction d'un codon STOP en aval du P2A par mutagénèse dirigée sur les plasmides codant les constructions sondes P2A Aβ (Figure 24, colonne 2) à l'aide du kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent), avec les amorces sens 5' GGAGGA-GAACCCTGGATAAATGGCTTCTCTCGCTGC et antisens 5' GCAGCGAGAGAGAGCCAT-TTATCCAGGGTTCTCCTCC.

#### 2.1.1.2. Amplification par PCR des séquences d'intérêt

La PCR est utilisée à deux étapes du clonage : l'amplification des séquences à cloner et le criblage des colonies de bactéries transformées avec le plasmide contenant l'insert (2.1.1.6). Les amorces sont présentées en Table IV.

Séquence amplifiée	Sens	Séquences des amorces
	for	5' CCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGGCTTCTCTCGCTGCTCTG
<b>A</b> p1-40	rev	5' AAGGGCCCTCTAGATTATTATACAACTCCTC
VBO	for	5' AGAGCTCGTTTAGTGAACCG
VKQ	rev	5' TAGAGTATTACAATAGCTAAGAATTTC
HyPer1 cyto-	for <i>Sal</i> I	5' CGTAAAAAGTCGACACCATGGAGATGGCAAGC
plasme	rev <i>Nde</i> I	5' GCTTCCCATATGGCCCAAGGTCAAGCG
HyPer1 mito-	for <i>Sal</i> l	5' CGTAAAAAGTCGACACCATGTCCGTCCTGACG
chondries	rev <i>Nde</i> I	5' GCTTCCCATATGAACCGCCTGTTTTAAAAC
HyPer1	for <i>Sal</i> l	5' CGTAAAAAGTCGACACCATGGAGATGGCAAGC
noyau	rev <i>Nde</i> I	5' GCTTCCCATATGTCTAGATCCGGTGGATC
Grx1-roGFP2	for <i>Sal</i> l	5' CGTAAAAAGTCGACACCATGGCTCAAGAGTTTG
cytoplasme	rev <i>Nde</i> I	5' GCTTCCCATATGGCCCAAGGTCAAGCG
Grx1-roGFP2	for <i>Sal</i> l	5' CGTAAAAAGTCGACACCATGGCTCAAGAGTTTG
noyau	rev <i>Nde</i> I	5' GCTTCCCATATGTGCGGCCCCATTCAG
NALC	for <i>Sal</i> l	5' CGTAAAAAGTCGACACCATGTCCGTCCTGACG
IVILS -	rev <i>Nde</i> I	5' GCTAGCCATATGCAACGAATGGATCTTGG
Grv1 roCED2	for <i>Bssh</i> II	5' CCAGTGCCGCGCGCCAAGATCCATTCGTTGGCTCAAGAGTTTGTG
GIXI-TOGFP2	rev <i>Nde</i> I	5' GCTTCCCATATGCTTGTACAGCTCGTCC

Table IV : séquences des oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR des séquences codant les sondes adressées aux différents compartiments

Les amplifications de fragments d'ADN à cloner sont réalisées avec la polymérase fidèle Phusion (NEB) en utilisant comme matrice les vecteurs présentés en Table V, déjà présents au laboratoire. Pour les criblages de colonies, la polymérase DreamTaq (Thermo Fisher) est utilisée et les colonies de bactéries à cribler sont repiquées sur une nouvelle gélose et ajoutées au mélange réactionnel. La Table VI présente les protocoles utilisés pour les deux types de PCR.

Table V :	Plasmides	utilisés	pour l'amp	lification	par PC	R des	séquences	codant	les
sondes ou	ı pour l'exp	ression of	constitutive	des sond	es en c	ellules	eucaryotes		

Plasmide	Séquence codante		
	Sonde	Adressage	
pCMV/myc/cyto/NES-HyPer1	HyPer1	Cytoplasme avec exclusion du	
		noyau (1 NES)	
pCMV/myc/mito/HyPer1	HyPer1	Matrice mitochondriale (2 MLS)	
pCMV/myc/nuc/HyPer1	HyPer1	Noyau (3NLS)	
pCMV/myc/cyto/NES-rxYFP	rxYFP	Cytoplasme avec exclusion du	
		noyau (1 NES)	
pCMV/myc/mito/rxYFP	rxYFP	Matrice mitochondriale (2 MLS)	
pCMV/myc/nuc/rxYFP	rxYFP	Noyau (3 NLS)	
pCMV/myc/cyto/NES-Grx1-	Grx1-roGFP2	Cytoplasme avec exclusion du	
roGFP2		noyau (1 NES)	
pCMV/myc/nuc/Grx1-roGFP2	Grx1-roGFP2	Noyau (3 NLS)	

## Table VI : Protocoles d'amplification d'ADN par PCR

	Mélange réactionnel pour un tube	Cycles
Amplification des sé- quences à cloner	1 ng matrice 2,5 μL d'amorce for à 10 μM 2,5 μL d'amorce rev à 10 μM 10 μL tampon <i>high fidelity</i> 0,5 μL Phusion 1 μL dNTP 10 mM Qsp 50 μL H <sub>2</sub> O	30 s à 98°C 30 cycles : - 10 s à 98°C - 20 s par kb à 72°C 10 min à 72°C
Criblage des colonies de bactéries transformées avec le plasmide contenant l'in- sert	Matrice : colonie de bactéries 1 µL d'amorce for à 10 µM 1 µL d'amorce rev à 10 µM 1 µL tp Taq 10X 0,08125 µL dream Taq 0,2 µL dNTP 10 mM Qsp 10 µL H <sub>2</sub> O	10 min à 94°C 35 cycles : - 1 min à 94°C - 1 min 55°C - 2 min par kb à 72°C 10 min à 72°C

#### 2.1.1.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN est réalisée sur gels d'agarose à 1% pour les fragments d'ADN de plus de 500 paires de bases (pb) et à 2% pour les fragments d'ADN les plus courts. Les gels sont préparés en tampon 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol (Tris) acétate acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (TAE) 0,5X en présence d'environ 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de bromure d'éthidium (BET). Les échantillons d'ADN sont complétés avec du tampon de charge commercial 6X et déposés sur le gel. La migration est réalisée pendant 30 min à 100 V en TAE 0,5X. Les bandes d'ADN sont révélées avec une lampe à UV ( $\lambda$ =312 nm, Vilber Lourmat).

#### 2.1.1.4. Restrictions enzymatiques

Les enzymes de restriction conventionnelles de ThermoFisher sont utilisées : 1 µL d'enzyme pour digérer 1 µg d'ADN dans un volume total de 20 µL, en présence de tampon O. Les digestions sont réalisées à 37°C pendant 3 à 16 heures avant inactivation thermique de l'enzyme.

#### 2.1.1.5. Ligation

Les vecteurs sont déphosphorylés par la phosphatase alcaline FastAP (ThermoFisher). La réaction est réalisée sur 1 µg de vecteur avec 5 µL d'enzyme à 37°C pendant 15 min, dans un volume total de 10 µL.

Toutes les ligations sont réalisées avec 100 ng de vecteur dans un volume total de 20 µL, avec 1 µL de T4 DNA ligase (Fermentas), à 22°C pendant 1 h. On utilise trois fois plus de molécules d'insert que de molécules de vecteur :  $m_{insert} = \frac{taille_{insert}}{taille_{vecteur}} \times 3 \times m_{vecteur}$ , avec  $m_{vecteur} = 100$  ng.

#### 2.1.1.6. Transformation des bactéries

Les bactéries compétentes sont préparées comme suit : on ensemence 50 mL de milieu 2xYT avec 1 mL de culture saturée de bactéries de la souche DH5 $\alpha$ . La culture est incubée à 37°C sous agitation (160 rpm). Quand sa densité optique à 600 nm atteint 0,6 (phase exponentielle de croissance), la culture est centrifugée 10 min à 6000 g et à 4°C. Les bactéries sont conservées dans la glace pour toutes les étapes suivantes. Le culot est repris dans 25 mL de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) stérile à 0,1 M. Après une incubation de 30 min dans la glace, la suspension est centrifugée 10 min à 6000 g à 4°C. Le culot est repris dans 3,3 mL de 0,081 M CaCl<sub>2</sub>, 15% glycérol. Après une incubation de 5h dans la glace, les bactéries sont aliquotées par 100 µL et conservées à -80°C.

100 µL de bactéries compétentes sont transformées avec 50 ng de plasmide ou 20 µL de produit de ligation (2.1.1.5). L'ADN est ajouté aux bactéries. Après une incubation de 30 minutes dans la glace, un choc thermique de 30 secondes à 42°C est réalisé. Les bactéries sont incubées 2 minutes dans la glace puis mises en culture dans 1 mL de milieu 2xYT pendant 1 h. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîtes de 2xYT agar + antibiotique de sélection, soit par quadrants pour les bactéries transformées avec un plasmide surenroulé, soit avec un râteau pour les bactéries transformées avec un produit de ligation. On travaille ensuite avec des colonies isolées, qui sont mises en culture en 2xYT + antibiotique sur la nuit puis conservées à -80°C en présence de 20% de glycérol.

#### 2.1.1.7. Purification d'ADN

#### 2.1.1.7.1. Purification d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est purifié à partir de cultures bactériennes saturées en utilisant soit le kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher) pour les étapes de clonage et de séquençage, soit le kit NucleoBond Xtra midi (Macherey Nagel) pour les transfections des cellules.

#### 2.1.1.7.2. Purification d'ADN linéaire

Les produits de PCR utilisés pour les clonages ainsi que les vecteurs digérés sont purifiés sur colonne en utilisant le kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup en suivant les instructions du fabricant. Les inserts codant P2A Aβ et P2A VRQ sont purifiés sur gel. Après migration du produit de digestion sur gel d'agarose en présence de BET (2.1.1.3), les bandes

96

d'intérêt sont découpées du gel sous une lampe à UV ( $\lambda$ =312 nm) puis conservées à 4°C jusqu'à la purification, réalisée en utilisant le même kit.

#### 2.1.2. Transfections stables des cellules et sous-clonages

## 2.1.2.1. Stratégie d'expression constitutive des sondes et inductible des protéines d'intérêt

Pour les premiers modèles cellulaires mis en place (Figure 38), des lignées RK13 déjà présentes au laboratoire expriment l'allèle VRQ de la PrP (Vilette et al., 2001) ou A $\beta_{1-40}$  (Igel Egalon, 2013) de façon inductible par la doxycycline. Ces cellules sont transfectées avec des vecteurs déjà présents au laboratoire (Table V et Figure 29), codant les sondes HyPer1 et rxYFP adressées au cytoplasme, au noyau et aux mitochondries sous contrôle du promoteur CMV (Banach-latapy et al., 2013).

Ces vecteurs portent un gène de résistance au G418, auquel les cellules sont déjà résistantes suite à leur transfection avec le vecteur pCMV Tet3G (Figure 38A). Une cotransfection avec le vecteur pX343, portant un gène de résistance à l'hygromycine est donc réalisée, avec un rapport de 20/1 entre les deux plasmides.

La veille des transfections, les cellules vivantes sont comptées sur cellule de Malassez après coloration des cellules mortes au bleu Trypan. Des plaques à 24 puits (P24) sont ensemencées avec 170 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu essentiel minimum (Opti-MEM, Gibco) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 100 unités (U).mL<sup>-1</sup> pénicilline – 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycine (PS). Le jour des transfections, les cellules sont rincées avec 500 µL Opti-MEM, 10% SVF sans PS puis incubées 1 h dans 500 µL Opti-MEM, 10% SVF sans PS. Pour chaque transfection, on dilue d'une part 500 ng du vecteur pCMV et 25 ng du vecteur pX343 dans qsp 25 µL Opti-MEM et d'autre part 1 µL de lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) dans qsp 25 µL Opti-MEM. Après 5 min d'incubation, les 25 µL d'ADN sont ajoutés au tube de lipofectamine. Après 30 min d'incubation, les complexes ADN – lipofectamine sont ajoutés à chaque puits. Après 7 heures d'incubation à 37°C, le milieu contenant les complexes ADN – lipofectamine est remplacé par 1 mL d'Opti-MEM, 10% SVF, PS. Après 48h supplémentaires en culture, les cellules sont passées dans des puits de P6. Le lendemain, 50 µg.mL<sup>-1</sup> d'hygromycine sont ajoutés au milieu pour créer une pression de sélection. Le milieu est changé deux fois par semaine en maintenant la pression de sélection. Quand les cellules arrivent à confluence, soit deux à trois semaines après la transfection, elles sont transférées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> de surface (F25).



Figure 29 : Cartes des vecteurs d'expression des sondes HyPer et rxYFP sous contrôle du promoteur CMV

AmpR : gène de résistance à l'ampicilline, CMV : cytomégalovirus, KanR : gène de résistance à la kanamycine, NeoR : gène de résistance à la néomycine, MLS : signal d'adressage aux mitochondries, NES : signal d'exclusion du noyau, NLS : signal d'adressage au noyau.

Des lignées clonales sont ensuite sélectionnées. Les cellules sont dissociées, comptées, puis diluées à 8 cellules.mL<sup>-1</sup> dans du milieu complet afin d'ensemencer chaque puits d'une P96 avec en moyenne 0,8 cellule dans 100 µL de milieu : en pratique, chaque puits contient donc normalement 0 ou 1 cellule. Le milieu est changé chaque semaine. Quand les cellules arrivent à confluence, elles sont transférées en P24, puis en P6, puis en F25 pour les clones prometteurs.

### 2.1.2.2. Stratégie de coexpression inductible des sondes avec les protéines d'intérêt

Pour construire les deuxièmes modèles cellulaires (Figure 46), 170 000 cellules RK13 dans un puits de P24 sont transfectées avec 500 ng de plasmide pCMV Tet3G (Figure 46A), codant l'activateur de transcription Tet3G, en utilisant 1 µL de lipofectamine 2000 comme décrit dans le paragraphe précédent (2.1.2.1). Les cellules transfectées sont sélectionnées par 500 µg.mL<sup>-1</sup> de G418.

Comme les vecteurs pTRE3G ne portent pas de gène de résistance à un antibiotique, les cellules sont ensuite cotransfectées avec (i) les vecteurs pTRE3G codant les constructions sondes P2A A $\beta_{1-40}$  ou PrP (2.1.1) et (ii) avec le plasmide pSR2, portant un gène de résistance à la puromycine, avec un rapport de 20/1 entre les deux plasmides.

Pour chaque vecteur de coexpression inductible, on réalise 6 transfections, avec 3 densités cellulaires (65 000, 125 000 ou 185 000 cellules par puits de P24) et 2 volumes de polyethylenimine (PEI) (1 ou 2 µL). Le lendemain de l'ensemencement des puits de P24 avec les cellules RK13 pCMV Tet3G, on prépare, d'une part, 6 tubes contenant chacun 1 µg du vecteur pCMV et 50 ng du vecteur pSR2 dans qsp 25 µL Opti-MEM et, d'autre part, 6 tubes contenant chacun 1 ou 2 µL de PEI dans qsp 25 µL Opti-MEM (chaque volume de PEI est préparé en trois réplicats). Après 5 min d'incubation, les 25 µL d'ADN sont ajoutés au tube de PEI. Après 30 min d'incubation, les complexes ADN – PEI sont ajoutés à chaque puits. Après 48h heures de culture à 37°C, les cellules sont passées dans des puits de P6. Le lendemain, la pression de sélection est ajoutée au milieu : 1 µg.mL<sup>-1</sup> de puromycine. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine en maintenant la pression de sélection. Quand les cellules commencent à former des amas, soit environ deux semaines après la transfection, elles sont rincées avec 2 mL PBS, dissociées avec 300 µL de solution de dissociation non enzymatique commerciale (Gibco), reprises dans 3 mL de milieu de culture et maintenues en P6. Après environ une semaine supplémentaire en culture, elles sont transférées en F25. Certaines lignées sont sous-clonées par dilution limite en P96 comme décrit dans le paragraphe précédent (2.1.2.1).

L'absence de mycoplasme est vérifiée en utilisant le kit MycoAlert (Lonza) avant congélation des cellules à -80°C dès le premier ou le deuxième passage. Des cellules à peine confluentes en F75 sont dissociées, reprises en Opti-MEM, 10% SVF, PS, centrifugées 5 min à 100 g, puis le culot est repris dans 6 mL de 10% diméthylsulfoxide (DMSO), 90% SVF. Cette suspension est répartie dans six cryotubes, soit environ 1,5×10<sup>5</sup> cellules par cryotube. Après une incubation de quatre heures dans la glace, les cellules sont placées à -80°C dans une boîte en polystyrène garnie de coton permettant une diminution lente de la température.

#### 2.1.3. Entretien des lignées cellulaires

Les cellules sont cultivées dans des F25 à bouchon ventilé en Opti-MEM, 10% SVF, PS, puromycine 1 µg.mL<sup>-1</sup>, G418 500 µg.mL<sup>-1</sup> dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont passées au 1/5 une fois par semaine : les cellules à confluence sont lavées avec 5 mL de tampon phosphate salin (PBS) puis incubées une dizaine de minutes à 37°C avec 1 mL de solution de dissociation. Les cellules dissociées sont reprises dans 4 mL de milieu de culture, et 1 mL de ces cellules sont diluées dans 5 mL de milieu frais dans un nouveau F25. Les cellules sont passées un maximum de quinze fois avant décongélation d'une nouvelle ampoule. Sauf précision contraire, l'expression des protéines d'intérêt est induite pendant 48h par 1µg.mL<sup>-1</sup> doxycycline.

#### 2.2. Caractérisation des lignées cellulaires

#### 2.2.1. Marquage des mitochondries des cellules vivantes

Des puits de P48 sont ensemencés avec environ 100 000 cellules.cm<sup>-2</sup> en Opti-MEM, 10% SVF, PS, doxycycline. Après 48 heures d'induction, le milieu est remplacé par 300 µL d'Opti-MEM, 10% SVF additioné de 200 nM de MitoTracker<sup>™</sup> Red FM (ThermoFisher). Après une incubation de 30 min dans cette solution de marquage, les cellules sont rincées avec 500 µL de PBS et immédiatement imagées dans du PBS frais avec un microscope à épiluorescence Axio Observer Z1 (Zeiss).

#### 2.2.2. Immunofluorescence des cellules avec et sans infection

Des puits de P48 ou des lamelles de verre nettoyées avec 70% d'éthanol et séchées avant d'être placées dans des puits de P24 (pour les expériences d'étude de l'interaction

100

entre Aβ et PrP) sont ensemencés avec environ 100 000 cellules.cm<sup>-2</sup> en Opti-MEM, 10% SVF, PS, doxycycline. Après 24 à 48h d'induction, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (500 µL pour tous les rinçages) puis fixées pendant 10 minutes par 200 µL de 4% paraformaldéhyde (PFA) en PBS. Les cellules sont rincées trois fois en PBS. Elles sont perméabilisées avec 200 µL de 0,2% Triton X-100 en PBS pendant 5 min puis rincées avec du PBS puis du PBS, 0,05% Tween 20 (PBST). Pour le marquage spécifique de la PrP<sup>Sc</sup>, la PrP<sup>C</sup> est dénaturée et les épitopes de la PrP<sup>Sc</sup> sont démasqués dans 500 µL de chlorure de guanidium (Gu-HCl) 3,5 M pendant 5 minutes. Quelle que soit la protéine marquée, les cellules sont saturées avec 500 µL de 3% BSA en PBST pendant 15 minutes.

Les cellules sont incubées à température ambiante pendant une heure avec 100 µL des anticorps primaires suivants dilués en PBST (Table VII) :

Protéine/ peptide	Anticorps primaire	Origine	Dilution
Αβ	6E10	Souris	1/1000
PrP <sup>C</sup>	Saf34	Souris	1/500
	MH44	Lapin	1/500
<b>PrP</b> <sup>SC</sup>	ICSM33	Souris	1/2000
Sondes GFP/ YFP	A11122	Lapin	1/1000

Table VII : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Après trois rinçages au PBST, les cellules sont incubées pendant 1 h avec 100 µL des anticorps secondaires anti-lapin couplés AlexA 488 nm ou anti-souris couplés 555 ou 568 nm dilués en PBST avec 0,1 µg.mL<sup>-1</sup> 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Pour les cellules cultivées sur lamelles de verre, les lamelles sont montées sur lames en milieu de montage ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher). Les cellules marquées sont ensuite observées et imagées, soit en microscopie plein champ, soit avec un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 700 (MIMA2, INRAE, https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12). La Table VIII récapitule les pics d'excitation et d'émission des différents fluorophores utilisés ainsi que les longueurs d'onde utilisées pour les détecter.

Fluoro- chrome	Fluorochrome		Longueurs d'onde utilisées : la- sers, filtres ou DEL		Microscope
	λ <sub>ex</sub> (nm)	λ <sub>ém</sub> (nm)	λ <sub>ex</sub> (nm)	λ <sub>ém</sub> (nm)	
DAPI	358	463	G 365	BP 445/50	Axio Observer
AlexA 488	493	520	BP 470/40	BP 525/50	Z1 (Zeiss)
AlexA 568	576	603	BP 572/25	BP 629/62	_
DAPI	358	463	385/30	BP 465/38	AxioVert A1
AlexA 488	493	520	469/38	BP 509/30	(Zeiss)
AlexA 555	555	570	555/30	BP 591,5/25	_
DAPI	358	463	405	300 - 483	LSM 700
AlexA 488	493	520	488	300 - 550	(Zeiss)
AlexA 555	555	570	555	560 - 800	_

#### Table VIII : Longueurs d'ondes utilisées pour détecter les différents fluorophores

Le contraste des images est ajusté avec le logiciel ImageJ (Rueden et al., 2017) avant montage avec le plugin FigureJ (Mutterer and Zinck, 2013).

# 2.2.3. Acquisition des spectres d'excitation de suspensions de cellules exprimant les sondes fluorescentes

Des cellules exprimant HyPer1 et Grx1-roGFP2 ainsi que des cellules RK13 WT sont cultivées pendant 48h en présence de doxycycline avant d'être dissociées, reprises dans du PBS et centrifugées (100 g, 5 min). Le culot de cellules est ensuite repris dans du PBS à une concentration de 1000 cellules.µL<sup>-1</sup>. Quatre puits d'une P96 à fond noir FloroNunc pour la fluorescence (DDbiolab) sont ensemencés avec 100 µL de cette suspension. Les cellules sont immédiatement traitées avec 50 mM dithiotréitol (DTT) ou 0,5 à 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant environ 5 minutes. Les spectres d'excitation sont acquis avec un lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan) avec les paramètres d'acquisition présentés en Table IX.

	RK13 HyPer1	RK13 Grx1-roGFP2
Mode	Fluorescence top reading	
Agitation linéaire	Temps = 1 s, Amplitude =	1 mm
Longueurs d'onde d'excitation	350 – 500 ± 5 nm	250 – 315 ± 2,5 nm 320 – 470 ± 5nm
Pas entre deux $\lambda_{ex}$	2 nm	5 nm
Nombre de scans	76	45
Longueur d'onde d'émission	530 ± 10 nm	500 ± 10 nm
Gain	133	100
Nombre de flashs	25	25
Temps d'intégration	20 µs	20 µs
Position en Z	15323 µm	16490 µm

#### Table IX : Paramètres d'acquisition des spectres d'excitation

## 2.3. Préparation des échantillons pour quantification du niveau d'oxydation des sondes par western blot rédox

Le niveau d'oxydation des sondes peptidiques codées génétiquement peut être quantifié de façon discrète par western blot rédox. Nous avons adapté le protocole décrit dans (Banach-latapy et al., 2013), dont le principe est résumé par la Figure 30.

Les expériences sont réalisées sur des cellules en phase de croissance : des puits de P6 sont ensemencés avec 200 000 cellules la veille des traitements. Pour étudier l'influence de la production endogène par les cellules d'A $\beta_{1-40}$  ou de PrP, la synthèse du polypeptide est induite par l'ajout de 1 µg.mL<sup>-1</sup> de doxycycline au milieu de culture pendant 1 à 24 h. Pour étudier la réponse cellulaire à un oxydant exogène, les cellules sont traitées avec 100 ou 500 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 5 à 60 minutes. Pour éviter une dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une trop grande concentration en sérum, on remplace le milieu par de l'Opti-MEM, 2% SVF, PS deux heures avant ces traitements. Les traitements d'une même plaque sont arrêtés simultanément par un rapide rinçage au PBS suivi, pour fixer l'état d'oxydoréduction des pro-téines, par l'ajout dans chaque puits de 1 mL d'acide trichloroacétique (TCA) froid à 20% V/V et une incubation sur la glace pendant 45 à 90 min.

Les échantillons sont centrifugés 20 minutes à 19000 g à 4°C. Les culots sont ensuite lavés trois fois avec de l'acétone à -20°C puis incubés 20h à 30°C sous agitation (1400 rpm) et à l'abri de la lumière dans 50 µL de N-éthylmaleimide (NEM) à 50 µM en Tris 50 µM pH 8,8, EDTA 10 mM, dodécylsulfate de sodium (SDS) 10%. Le NEM est un agent alkylant qui va ajouter un groupement alkyl sur les cystéines réduites, ce qui, évitant leur oxydation par la formation de ponts disulfures, maintiendra le ratio  $\frac{\text{forme oxydée}}{\text{forme réduite}}$  des sondes, et permettra leur séparation par électrophorèse en conditions non réductrices. Les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 19000 g, puis les culots sont éliminés.

Les formes réduite et oxydée de la sonde sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), puis révélées par western blot avec un anticorps anti-GFP. Le protocole pour la SDS-PAGE et le western blot est détaillé au paragraphe 2.7 (p. 110).



#### Figure 30 : Principe du western blot rédox

Des puits de P6 sont ensemencés avec les cellules la veille des traitements. La synthèse de la protéine d'intérêt est induite par la doxycycline le cas échéant, et les cellules sont éventuellement traitées par un oxydant ou un réducteur exogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou DTT) (A). Les traitements d'une même plaque sont tous arrêtés simultanément et les protéines sont extraites (B). Les thiols libres sont bloqués par un alkylant (C). La différence de géométrie des formes oxydée et réduite de la sonde permet de les séparer par western blot (D).

La figure D est adaptée avec l'autorisation d'Elsevier de (Banach-latapy et al., 2013), © 2013, Elsevier Inc.. Il s'agit d'un western blot rédox montrant la différence de migration des formes oxydée et réduite de la rxYFP exprimée dans le cytoplasme, les mitochondries et le noyau de cellules HeLa (Lucey et al., 2009), après traitement par 25 mM DTT (5 min) ou 0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min). Les signes \* et \*\* indiquent les formes réduites et oxydées de la rxYFP localisée dans le cytosol, dont le signal d'adressage aux mitochondries n'a pas été clivé.

#### 2.4. Suivi des sondes en temps réel par microscopie à fluorescence

Sauf précision contraire, la lamelle d'une boîte à fond en verre de 35 mm de diamètre

(MatTek) ou d'une boîte de même type divisée en 4 compartiments (Greiner) est ensemen-

cée avec respectivement 1000 ou 250 cellules dans respectivement 500 ou 125 µL d'Opti-

MEM,10% SVF, PS, soit une densité de 320 cellules.cm<sup>-2</sup> dans les deux cas. Après 1 h 30 d'incubation, le milieu est remplacé par respectivement 2 ou 0,5 mL de FluoroBrite DMEM (Gibco), 10% SVF, PS, 25 mM HEPES pH 7,3, 2 mM L-glutamine, complémenté au dernier moment par 1 µg.mL<sup>-1</sup> de doxycycline pour induire l'expression des protéines d'intérêt. Le FluoroBrite permet de diminuer le bruit de fond dû à l'autofluorescence du milieu et l'HEPES permet de contrôler le pH du milieu au cours de l'acquisition en microscopie, réalisée endehors de l'incubateur à CO<sub>2</sub>. Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à l'acquisition, qui est réalisée 48h ± 2h après l'induction sur une platine thermostatée à 37°C.

Les cellules sont imagées avec un microscope à épifluorescence équipé d'un objectif sec LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr Ph 2 M27. Une acquisition en time-lapse à deux canaux est réalisée. Le canal 1 correspond à une excitation proche du pic d'excitation de la forme réduite de HyPer1 et de la longueur d'onde isobestique de Grx1-roGFP2, et le canal 2 correspond à une excitation proche du pic d'excitation de la forme oxydée de HyPer1 et de la forme réduite de Grx1-roGFP2. Les images sont acquises en 12 bits. Les paramètres pour l'excitation et l'émission sont les mêmes pour toutes les expériences sur les cellules exprimant HyPer1 d'une part et sur les cellules exprimant Grx1-roGFP2 d'autre part. La Table X récapitule les temps d'exposition, intensités d'excitation et longueurs d'onde pour les deux canaux.

Pour les expériences de suivi de la réponse cellulaire à un traitement exogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou assemblage protéique), les dilutions sont réalisées de manière standardisée et au dernier moment dans du milieu de culture de façon à ce que le volume ajouté sur les cellules soit le même pour toutes les expériences (1 mL). Le fait de réaliser cet ajout dans un volume important par comparaison au volume de culture permet d'avoir une bonne homogénéisation du traitement avec le milieu de culture. La Table XI présente les temps auxquels ces ajouts sont effectués, ainsi que la fréquence des images et la durée des différentes expériences.

				Exposition (ms)		
	λ <sub>ex</sub> (nm)	λ <sub>ém</sub> (nm)	Intensité DEL	HyPer1	Grx1- roGFP2	
Canal 1	423/44	525/25	8%		400	
Canal 2	469/38	525/25	15%	500	300	

Table XI : Paramètres cinétiques des acquisitions en time-lapse

Type d'expérience

Réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

 Table X : Paramètres d'excitation utilisés pour les cellules exprimant HyPer1 ou Grx1

 roGFP2

Suivi de cellules infectées		10 s	35 min	/
Assemblages	Réponse tardive	0,5 min	35 min	/
Accomblagac	Réponse précoce	2 min	190 min	10 min

Intervalle

0,5 min

Durée totale

65 min

**Temps**ajout

5 min

#### 2.5. Suivi de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec la sonde chimique Peroxy yellow 1

Les expériences sont réalisées à partir d'une solution stock à 2 mM de peroxy yellow 1 (PY1) en DMSO.

Le spectre d'excitation de la sonde oxydée ou non est acquis avec un lecteur de plaque Infinite 200 Pro (Tecan). Deux puits d'une P96 à fond noir FluoroNunc (DD Biolab) sont ensemencés avec 100  $\mu$ L d'une solution à 5  $\mu$ M de PY1 en PBS. L'un est traité par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 24h. Les paramètres d'acquisition du spectre d'excitation sont présentés en Table XII. Le suivi cinétique de la fluorescence d'une solution à 5  $\mu$ M de PY1 en présence de concentrations variables de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réalisé avec les mêmes paramètres d'excitation, à l'exception de la longueur d'onde d'excitation. Aussitôt après ajout de 0,5 ou 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à des puits contenant 100  $\mu$ L de 5  $\mu$ M PY1, l'intensité de fluorescence émise à 558 ± 10 nm après excitation à 519 nm est mesurée toutes les 5 minutes pendant 15 heures avec agitation automatique de la plaque avant chaque mesure. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

Mode	Fluorescence top reading
Agitation linéaire	Temps = 1 s, Amplitude = 1 mm
Longueurs d'onde d'excitation	450 – 5518 ± 5 nm
Pas entre deux $\lambda_{ex}$	2 nm
Nombre de scans	35
Longueur d'onde d'émission	558 ± 10 nm
Gain	100
Nombre de flashs	25
Temps d'intégration	20 µs
Position en Z	20000 µm

 Table XII : Paramètres d'acquisition des spectres d'excitation de PY1

Les marquages des cellules sont réalisés en adaptant un protocole déjà établi (Dickinson et al., 2013). Les cellules RK13, ensemencées avec une densité de 5000 cellules.cm<sup>-1</sup> en boîtes à fond en verre la veille des marquages, sont incubées avec 5  $\mu$ M PY1 dilué en Opti-MEM, 10% SVF, PS pendant 1 h à 37°C. Les cellules sont ensuite traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou par une solution témoin dans le même milieu de culture. Le milieu est remplacé par du PBS avant d'acquérir des images avec un microscope à fluorescence AxioVert A1 équipé du set de filtres 91 HE ( $\lambda_{ex} = 511\pm22$ nm,  $\lambda_{ém} = 555\pm12$ ,5 nm).

#### 2.6. Infection prion des cellules

#### 2.6.1. Infection des cellules par la souche 127S de prion ovin

L'expression des protéines est induite par l'ajout de doxycycline au milieu de culture pendant une semaine avant le début de l'expérience puis à chaque passage.

Un puits de P12 est ensemencé avec environ 20 000 cellules.cm<sup>-2</sup> pour chaque condition. Après deux jours de culture, le milieu de culture est remplacé par 1 mL de milieu infectieux, contenant 0,2% à 1% d'homogénat de cerveau de souris transgéniques tg338 infectées avec la souche 127S. Ces souris surexpriment la PrP ovine sur un fond génétique *PrnP*<sup>0/0</sup> (Vilotte et al., 2001). Les cellules témoins sont exposées à 1 mL de milieu de culture contenant 0,2 à 1% de lysat de cerveau de souris tg338 non infectées.

Après trois jours, l'inoculum est éliminé par deux rinçages des cellules avec 2 mL de PBS avant remplacement par 2 mL de milieu de culture frais. Quand les cellules atteignent
la confluence, environ deux jours plus tard, elles sont dissociées et passées dans deux flasques de 25 cm<sup>2</sup> (F25). Après une semaine de culture, les cellules de l'une des flasques sont lysées dans 1 mL de déoxycholate de sodium 0,5%, Triton X-100 0,5 %, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (tampon de lyse ou TL1) pour analyse par western blot et PMCA (2.6.2, 2.6.3, 2.7). Chaque semaine, les cellules sont ensuite passées au cinquième dans deux F25, une pour entretien et une pour lyse après une semaine de culture.

#### 2.6.2. Amplification de la protéine prion infectieuse par PMCA

Nous utilisons un protocole établi au laboratoire (Moudjou et al., 2013) dont le principe est présenté sur la Figure 31. Un homogénat de cerveau de souris tg338 (Vilotte et al., 2001), contenant de la PrP<sup>C</sup>, est préparé à 10% en tampon PMCA (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, 1% Triton X-100). Après centrifugation 2 min à 2000 g pour éliminer les débris importants, les homogénats sont conservés à -80°C. 200 µL de chaque lysat de cellules en TL1 (2.6.1) sont centrifugés pendant 1 h à 15000 g. Le culot, contenant la PrP<sup>C</sup> et la PrP<sup>Sc</sup>, est repris dans 50 µL de tampon de PMCA. Ces échantillons sont dilués successivement de 10 en 10 dans le substrat. Une gamme de dilution de 10 en 10 d'un homogénat de cerveau de souris tg338 infectées par la souche 127S est utilisée comme contrôle positif. Une gamme de dilution de lysats de cellules « infectées » n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup> est réalisée afin de détecter l'éventuel inoculum résiduel, et une gamme de lysats de cellules « infectées » par du lysat de cerveau sain est réalisée comme contrôle négatif. Ces dilutions successives sont réalisées dans une plaque à 96 puits, avec une bille de téflon de 2,38 mm de diamètre ajoutée dans chaque puits. Des cycles de sonication de 30 secondes avec une puissance comprise entre 190 et 230 W sont réalisés toutes les 30 min pendant 48h, en alternance avec des phases d'élongation de 29,5 min à 37°C. La PMCA comprend ainsi 96 cycles de sonication.



#### Figure 31 : Schéma du principe de la PMCA

De l'homogénat de cerveau sain contenant de la PrP<sup>C</sup> (substrat) est ensemencé avec l'échantillon à tester, contenant ici de la PrP<sup>Sc</sup>. La PMCA est une succession de cycles alternant une incubation à 37°C, au cours de laquelle la PrP<sup>C</sup> au contact de la PrP<sup>Sc</sup> peut se convertir en PrP<sup>Sc</sup>, et une brève sonication, permettant de fragmenter les polymères de PrP<sup>Sc</sup> en de multiples noyaux de conversion.

Figure adaptée avec l'autorisation de John Libbey Eurotext de (Moudjou and Ermonval, 2010), © 2010, John Libbey Eurotext.

#### 2.6.3. Digestion par la protéinase K pour analyse par western blot

Les protéines totales de chaque échantillon à analyser sont dosées en utilisant le kit micro BCA (Pierce). Une solution stock de BSA à 2 mg.mL<sup>-1</sup> est diluée en TL1 avec des concentrations finales de 0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 et 40 µg.mL<sup>-1</sup>. Le réactif est préparé au dernier moment en mélangeant 25 volumes de réactif Micro BCA MA, 24 volumes de réactif micro BCA MB et 1 volume de réactif Micro BCA MC. Pour chaque point de la gamme de BSA et chaque échantillon à doser, on mélange dans une P96 à bords noirs et à fond transparent µ-Clear (Greiner) 150 µL de l'échantillon avec 150 µL de réactif. La plaque fermée est incubée à 37°C pendant 2h puis refroidie à température ambiante. L'absorbance à 562 nm est mesurée avec un lecteur de plaques Xénius (SAFAS Monaco) ou Infinite 200 Pro (Tecan). La courbe de l'absorbance en fonction de la concentration en BSA de la gamme est tracée et une régression linéaire est réalisée avec Excel. L'équation obtenue permet de calculer les concentrations initiales en protéines dans les échantillons dosés.

Pour chaque échantillon, on dilue 50 µg de protéines totales en TL1 (2.6.1) et on ajoute 1 µg de PK (Euromedex) et 0,02% de bleu de bromophénol pour visualiser les culots après centrifugation. La digestion complète des protéines sensibles aux protéases est réalisée en 1 h dans un bain-marie à 37°C. Les lysats sont ensuite centrifugés 30 min à 18000 g. Les culots, contenant la PrP<sup>res</sup>, sont repris en Laemmli 2X (Table XIII, colonne de droite). Les échantillons sont ensuite dénaturés pendant 15 min à 100°C avant d'être analysés par western blot (2.7).

#### 2.7. Détection et quantification de protéines par western blot

Sauf précision contraire, les protéines sont dosées en utilisant le kit micro BCA (Pierce) (2.6.3, p. 109) et diluées au 1/2 en tampon de Laemmli 2X (Table XIII).

	<b>Détection d'A</b> β	Détection de PrP ou GFP
Tris HCl	150 mM pH 7,4	125 mM pH 6,8
Glycérol	20%	20%
DTT	100 mM	100 mM
SDS	4%	6%
Urée	8M	/
Bleu de bromophénol	0,001%	0,001%

Table XIII : Composition des tampons de Laemmli 2X utilisés en Western blot

Les échantillons (30 µg de protéines par échantillon) sont déposés sur gel 12% Bis-Tris (Biorad). Le cas échéant, une gamme de dilutions de protéine recombinante est également déposée pour permettre la quantification ultérieure.

La migration est réalisée en tampon MES ou MOPS (Biorad) à 160V. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec (Biorad) à 18V pendant 45 minutes en tampon Bjerrum Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% éthanol, 0,0375% SDS). Pour la détection du peptide A<sub>β1-40</sub>, la nitrocellulose utilisée a une porosité de 0,2 µm. Pour la détection des autres protéines, une membrane d'une porosité de 0,45 µm est utilisée.

Après transfert, les membranes utilisées pour la détection du peptide A $\beta$  sont mises à bouillir pendant 5 min en PBS pour démasquer les épitopes. Après un rinçage avec 50 mL de PBS, les membranes sont saturées dans 50 mL de PBST, 3% BSA pendant 30 minutes puis les protéines sont détectées avec 20 mL des anticorps primaires suivants, dilués en PBST (Table XIV) :

Protéine/ peptide	Anticorps primaire	Dilution	Incubation
Αβ	6E10 biotinylé	1/10000	1 h à RT à 16h à 4°C
β <b>-actine</b>	A2228	1/2500	1 h à RT
GFP/ YFP	A11122	1/10000	1 h à RT à 16h à 4°C
PrP <sup>c</sup> PrP <sup>sc</sup>	SHA31 biotinylé	1/100000	30 min à RT

Table XIV : Anticorps utilisés pour la détection en western blot des protéines d'intérêt

Les anticorps secondaires utilisés sont :

- Soit des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort HRP (anti-lapin, anti-souris ou anti-biotine). Après incubation avec ces anticorps pendant 1 h (20 min pour l'anti-biotine), les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes en PBST puis 3 fois 5 minutes en PBS puis incubées pendant 5 minutes avec 2 mL du substrat de détection améliorée de la chimiluminescence (ECL) Clarity (Biorad). Les membranes sont aussitôt imagées avec le système ChemiDoc (Biorad).
- Soit des anticorps secondaires couplés AlexA 680 nm ou 800 nm (anti-lapin ou anti-souris) pour détection de la fluorescence avec le système Odyssey (LI-COR).

Le cas échéant, l'intensité du signal est quantifiée, soit avec le logiciel ImageLab (Biorad), soit avec le logiciel ImageJ.

#### 2.8. Préparation et caractérisation des assemblages de protéines

#### 2.8.1. Peptide A<sub>β1-40</sub> recombinant monomérique

- Expression d'Aβ<sub>1-40</sub> en culture bactérienne

Une colonie de bactéries BL21(DE3) transformées avec le plasmide codant A $\beta_{1-40}$  sous contrôle du promoteur de la polymérase T7 est mise en culture dans 1 L de milieu de croissance bactérienne (2xYT) additionné de 100 mg.L<sup>-1</sup> d'ampicilline à 37°C sous agitation (160

rpm). Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,7, la production d'A $\beta_{1-40}$  est induite par ajout de 1 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 16 h.

#### - Extraction $d'A\beta_{1-40}$ à partir des corps d'inclusion

La culture bactérienne est centrifugée 10 min à 6000 g à 4°C. Après un rinçage avec 50 mL de PBS, le culot est resuspendu dans 200 mL de tampon Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM (TE). Les étapes suivantes sont réalisées dans la glace ou à 4°C. La suspension est additionnée de 0,025% de Triton X-100, 25 µM d'EDTA et 5 mM de glutathion réduit, puis soniquée pendant 2,5 min avec une amplitude de 30% sur un sonicateur Q700 (Qsonica). Après une centrifugation de 20 min à 15 000 g, le culot est solubilisé dans 16 mL de 20 mM Tris pH 8, 7 M Gu-HCl par une agitation sur la nuit à 4°C. Après une centrifugation de 20 min à 15 000 g, le culot est solubilisé dans 16 mL de 20 mM Tris pH 8, 7 M Gu-HCl par une agitation sur la nuit à 4°C. Après centrifugation 20 min à 15 000 g, le surnageant est ultracentrifugé pendant 1 h à 100 000 g, puis filtré sur une membrane 0,45 µm de porosité. Après une filtration additionnelle sur une membrane avec un cut-off de 30 kDa, le filtrat est dialysé (membrane de cut-off 3.5 kDa (ThermoFisher)) contre 2 L d'eau milliQ à 4°C. Le bain de dialyse est changé sept fois, toutes les 2h environ. Après congélation dans l'azote liquide, la protéine est lyophilisée.

#### - Purification de l'A $\beta_{1-40}$

L'A $\beta_{1-40}$  monomérique est séparé des autres composés par chromatographie d'exclusion de taille comme suit. L'échantillon lyophilisé est repris dans 5 mL de 50 mM NaOH, 8 M urée et injecté sur une colonne Superdex 75 de 120 mL, préalablement équilibrée avec au moins 180 mL de 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl et réfrigérée à 10°C. Les fractions d'1 mL sont collectées entre 40 et 92 mL après le début de l'injection. Les fractions sont analysées par SDS-PAGE suivie d'une coloration au nitrate d'argent ainsi que par western blot (2.7). Les fractions d'intérêt sont rassemblées et dessalées contre 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium sur une colonne de dessalage de 50 mL. La protéine est congelée dans l'azote liquide puis lyophilisée. Pour les expériences avec le monomère d'A $\beta_{1-40}$ , le peptide est repris en tampon HEPES 25 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, urée 4M. Sa concentration est estimée par western blot à partir d'une gamme de dilutions de l'échantillon et d'une gamme de dilutions d'une solution d'A $\beta_{1-40}$  commerciale de concentration connue (2.7, p. 110).

#### 2.8.2. Fibres d'A<sub>β1-40</sub> recombinant

Un premier lot de fibres d'A<sub>β1-40</sub> recombinant est produit en présence de thioflavine T (ThT) comme suit : de l'A<sub>β1-40</sub> monomérique (2.8.1, p. 111) est repris en 20 mM Tris pH 8, 7 M GuHCl à une concentration d'environ 3,6 mM. Le tampon de fibrillisation (1,4 mL), composé de 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 100 µM ThT, est placé dans une cuve en quartz mise sous agitation à 37°C pendant 3 min. La solution d'A<sub>β1-40</sub> (20µL) est ajoutée à ce mélange, et la diffusion de la lumière est suivie en temps réel (excitations à 405 et 450 nm) ainsi que la fluorescence de la ThT ( $\lambda_{ex}$  = 450 nm,  $\lambda_{ém}$  = 480 nm). Au bout de 25 h, la vitesse de l'agitation est augmentée et les fibres sont encore agitées pendant 3h. Les fibres sont ultracentrifugées pendant 1 h à 184 000 g à 4°C puis le culot est repris en 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl.

D'autres lots de fibres sont préparés en utilisant ce premier lot pour amorcer la fibrillisation d'A $\beta_{1-40}$  sans ThT. L'A $\beta_{1-40}$  monomérique est dilué à une concentration d'environ 50 µM dans du tampon de fibrillisation, en présence d'environ 1,5 µM de fibres du premier lot. Après une incubation d'au moins 90 minutes à 37°C sous agitation, les fibres sont ultracentrifugées puis le culot est repris en tampon Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM.

Les fibres sont quantifiées par western blot à partir d'une gamme de dilutions de l'échantillon et d'une gamme de dilutions d'une solution d'A $\beta_{1-40}$  commerciale de concentration connue (2.7, p. 110) et leur morphologie est contrôlée par microscopie à force atomique (2.8.6, p. 116).

#### 2.8.3. Protéine prion recombinante monomérique

#### - Expression de VRQ en culture bactérienne

Une colonie de bactéries BL21(DE3) transformées avec un plasmide pET22b+ contenant la séquence codante de la protéine PrP ovine (polymorphisme V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub>) sous contrôle du promoteur T7 est mise en culture dans 750 mL de milieu 2XyT + ampicilline sous agitation à 37°C. Après une nuit, la culture est diluée au 1/2 dans le même milieu et la production de VRQ est induite par 1 mM IPTG. La culture est incubée sur la nuit.

#### - Extraction et purification de VRQ

Après centrifugation de la culture bactérienne 10 min à 6000 g, le culot est rincé avec 50 mL de PBS. Après centrifugation 10 min à 6000 g, le culot est congelé dans l'azote liquide. Le culot est décongelé, repris dans 200 mL de tampon TE, soniquée 5 min dans la glace avec une amplitude de 60% sur un sonicateur Q700 (Qsonica). Après centrifugation 15 min à 15 000 g, le culot est repris en tampon de solubilisation des corps d'inclusion (20 mM Tris pH 7,5, 7 M Gu-HCl, 100 mM NaCl, 2,5 mM imidazole) pendant 1 nuit à 4°C sur une roue, puis centrifugé 15 min à 15 000 g à 4°C.

La protéine contenue dans le surnageant est purifiée par chromatographie d'affinité comme suit. 4 mL de suspension de Sépharose modifiée pour pouvoir chélater les ions métalliques (GE) sont lavés avec 20 volumes d'eau milliQ. La résine est incubée avec 3 mL de sulfate de nickel à 0,4 M pendant 5 min puis lavée 2 fois avec 10 volumes d'eau milliQ et 1 fois avec 20 volumes du tampon de binding (tampon de solubilisation des corps d'inclusion) contenant du chlorure de guanidine. La résine est incubée 5 min avec le surnageant contenant PrP, et le *flow through* est conservé pour être repassé sur la colonne. Après des lavages avec 20 volumes de tampon de binding (2 fois), de tampon de renaturation (20 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 2,5 M imidazole) (1 fois) et de tampon de lavage (20 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 15 mM imidazole) (1 fois), la protéine est éluée avec le tampon d'élution (1 M imidazole pH 7,2). L'élution est arrêtée lorsque la densité optique à 280 nm de l'éluat est inférieure à 0,1. Les fractions sont conservées dans la glace. Ces étapes sont répétées avec le *flow through*. Les fractions sont rassemblées puis dessalées sur une colonne de sephadex G-25 (GE) de 400 mL par élution avec 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium/acide acétique pH 4,6. La protéine est ensuite congelée dans de l'azote liquide puis lyophilisée et conservée à -20°C.

#### 2.8.4. Oligomères de protéine prion recombinante

Les oligomères de protéine prion VRQ recombinante sont préparés à partir d'un protocole précédemment établi au laboratoire (Eghiaian et al., 2007). Une solution de VRQ à 50 µM est chauffée à 55°C pendant 6h en tampon citrate de sodium 20 mM pH 3,4 puis refroidie à 15°C avant analyse par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne TSK4000SW. Les chromatogrammes sont ensuite déconvolués par une méthode originale permettant de mettre en évidence trois populations d'oligomères (Rezaei et al., 2005). Les fractions correspondant au premier pic, donc aux plus gros oligomères, sont récupérées par chromatographie d'exclusion de taille et rassemblées (Figure 32A, fractions matérialisées sur le chromatogramme par les points verts). Une nouvelle chromatographie d'exclusion de taille sur ces fractions permet de contrôler la taille et l'homogénéité des oligomères ainsi produits et purifiés (Figure 32B).



Figure 32 : Purification des oligomères de PrP par chromatographie d'exclusion de taille

Adapté avec l'autorisation de l'éditeur de (Eghiaian et al., 2007), © 2007, National Academy of Sciences, USA.

A : Chromatogramme normalisé et déconvolué obtenu après incubation de la protéine prion VRQ recombinante 6h à 55°C. Les fractions correspondant aux oligomères O1 sont mises en évidence par les points verts.

B : Chromatogramme des oligomères O1 purifiés.

#### 2.8.5. Fibres de protéine prion recombinante

Les fibres de PrP recombinantes sont préparées à partir d'un protocole adapté de (Breydo et al., 2008). La PrP recombinante (2.8.3, p.113) est reprise à une concentration de 22  $\mu$ M en Gu-HCl 2M, MES 50 mM pH 6,0. Toutes les 12h, un spectre d'émission de fluores-cence entre 460 et 520 nm avec excitation à 445 nm d'un aliquot de cette solution dilué 75 fois en acétate de sodium 10 mM pH 5,0 , ThT 10  $\mu$ M est réalisé. La fibrillisation est terminée quand la fluorescence commence à décroitre après être passée par un maximum.

Les fibres sont ensuite dialysées contre 10 mM d'acétate de sodium pH 5,0 dans des boudins de 14 kDa de cut-off préalablement bouillis dans de l'eau milliQ pendant 5 min. Trois dialyses successives sont réalisées avec renouvellement du tampon toutes les 2h. Les fibres sont concentrées par une ultracentrifugation de 45 minutes à 184 000 g à 4°C. Le culot est repris en acétate de sodium 10 mM pH 5,0 et la concentration des fibres est estimée par mesure de la densité optique à 280 nm.

#### 2.8.6. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique d'imagerie tridimensionnelle à haute résolution (Dufrêne, 2002; Gavara, 2017), utilisée ici pour contrôler la morphologie des fibres d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP recombinantes. Une sonde appelée cantilever, constituée d'un levier et d'une pointe en silicium, balaie une surface de mica sur laquelle l'échantillon à analyser est adsorbé. Les variations topographiques de l'échantillon entraînent une déviation du cantilever dans les trois dimensions, qui est contrôlée par un système optique : un faisceau laser, focalisé sur l'arrière du cantilever, est réfléchi par un jeu de miroirs sur une photodiode à quatre quadrants. Une importante déviation du cantilever est ainsi associée à une forte déviation de la position du faisceau laser. Une boucle de rétroaction reliée à trois éléments piézo correspondant aux trois dimensions (x, y, z) permet d'ajuster la position du cantilever en continu (Figure 33). L'enregistrement des variations de la force entre cantilever et échantillon au cours du balayage de la surface permet de reconstituer une image topographique de l'échantillon.



#### Figure 33 : Principe de fonctionnement du microscope à force atomique

L'échantillon, adsorbé sur une surface de mica, est balayé par une pointe de silicium, déviée en fonction de la topographie. Un système optique constitué d'un laser dont le faisceau est réfléchi sur une photodiode à 4 quadrants reliée à une boucle de rétrocontrôle permet de rectifier en continu la position du quantilever grâce à trois éléments piézo correspondant aux trois dimensions x, y, z.

Adapté d'une figure de Cepheiden disponible sur wikimedia (CC0).

Les fibres de PrP recombinante à observer sont diluées à une concentration de 0,2 µM équivalent monomère en tampon citrate de sodium pH 3,4, et les fibres d'Aβ recombinant sont diluées au 1/10 dans de l'eau. 50 µL d'échantillon dilué sont déposés sur une surface de mica. Après adsorpsion, les fibres sont lavées trois fois avec le tampon puis la surface est couverte de tampon citrate. L'échantillon est ensuite imagé grâce à un AFM Bruker Nano GmbH (JPK) en utilisant le cantilever qPBioAC CB2. Le mode *quantitative imaging* (QI) est utilisé : la déviation du levier n'est due qu'aux interactions attractives entre la pointe et l'échantillon. De fausses couleurs appliquées aux images obtenues permettent de visualiser la hauteur des objets.

#### 2.9. Outils bioinformatiques

#### 2.9.1. Analyse d'images

Pour quantifier les intensités de fluorescence des sondes de manière reproductible à partir des images, nous avons adapté et automatisé par une macro codée sous FIJI un protocole publié par l'équipe des créateurs de la sonde HyPer (Mishina et al., 2013b, 2013a). Le code de la macro est disponible en ligne (<u>https://github.com/EliseLevy/PiQSARS</u>).

#### 2.9.2. Analyse statistique des courbes

#### 2.9.2.1. Paramètres descriptifs

Les données obtenues sont des courbes de ratio en fonction du temps. Pour pouvoir comparer les groupes de courbes obtenues dans les différentes conditions expérimentales, nous avons fait le choix de décrire chaque courbe grâce à un petit nombre de paramètres permettant de rendre compte, soit des points clés de chaque courbe, soit de son allure globale. La plupart de ces paramètres sont directement calculés à partir des courbes : le ratio initial, le ratio final, le ratio maximal, le temps auquel le ratio maximal est atteint, la pente au point d'inflexion, le temps auquel le point d'inflexion est atteint, le ratio au point d'inflection et le temps de latence. Ces paramètres sont présentés par la Figure 34.

В



tinfl	Temps d'apparition du point d'inflexion maximal
infl	Pente de la courbe au niveau du point d'inflexion
rinfl	Ratio au point d'inflexion
tlat	Temps de latence
rinit	Ratio initial
rfin	Ratio final
rmax	Ratio maximal
tmax	Temps d'apparition du ratio maximal

### **Figure 34 : Présentation des paramètres graphiques utilisés pour décrire les courbes** A : Représentation graphique de certains des paramètres descriptifs calculés à partir des courbes de ratio.

B : Tableau récapitulant la description de chacun des paramètres présentés sur la Figure A.

Le dernier paramètre utilisé est le score sur le premier mode de variation, qui permet de rendre compte de l'ensemble d'une courbe et est calculé grâe à l'ACP fonctionnelle. Il s'agit d'une méthode d'analyse des données fonctionnelles dont nous présentons un exemple ci-dessous. La Figure 35A présente un jeu de courbes dont les résultats de l'analyse sont présentés sur la Figure 35B et C. Le principe est de simplifier le jeu de courbes en extrayant les principaux modes de variation communs à l'ensemble des courbes. Un mode de variation, également appelé axe ou harmonique, correspond à un type d'allure de courbe. Les modes de variation sont classés en fonction de la variabilité du jeu de courbes qu'ils expliquent. Si la proportion de la variabilité expliquée par un mode de variation est 60%, cela signifie qu'il est capable de décrire en moyenne 60% de l'allure de chaque courbe du jeu de données. Dans notre exemple, le principal mode de variation, ou première harmonique, correspond à des courbes linéaires légèrement bruitées, et il explique 97,6% de la variabilité du jeu de données (Figure 35B, graphe du haut). Le second mode de variation, qui n'explique que 0,4% du jeu de données, correspond à du bruit (Figure 35B, graphe du bas). Ainsi, l'ensemble du jeu de données peut être résumé quasi parfaitement par son premier mode de variation. A chaque courbe du jeu de données est affecté un score sur chaque mode de variation, qui va permettre de la décrire. Ici, un score élevé sur la première harmonique correspond à une courbe croissante avec une pente élevée (Figure 35D, graphe du haut, courbe bleue), et un score faible sur la première harmonique correspond à une courbe décroissante avec une pente élevée (Figure 35B, graphe du haut, courbe jaune). Concernant le seonde mode de variation, le score semble dépendant de l'amplitude du bruit : la courbe bleue, correspondant à un score élevé, semble plus bruitée que les autres (Figure 35B, graphe du bas). La Figure 35C représente le jeu de courbes analysées, avec coloration de chaque courbe en fonction de son score sur le premier mode de variation (graphe du haut) ou sur le deuxième mode de variation (graphe du bas). Le graphe du haut confirme que le score sur la première harmonique de chaque courbe est fortement lié à son coefficient directeur. Le score sur la deuxième harmonique ne peut pas être relié aussi facilement à l'allure des courbes, ce qui pouvait être attendu puisqu'il n'explique qu'une très faible part de la variabilité du jeu de courbes.



## Figure 35 : Exemples d'ACP fonctionnelles sur un jeu de données fictif simple et sur un jeu de données expérimentales réelles

A : Représentation d'un jeu de données fonctionnelles créé à partir de neuf courbes linéaires dont les coefficients directeurs ont été générés aléatoirement entre -2 et 2, auxquelles a été ajouté un bruit gaussien de moyenne 0 et d'écart-type 10.

B : Modes de variation principaux du jeu de données présenté en C.

C : Coloration des courbes en fonction de leur score sur le premier mode de variation (en haut) ou le deuxième mode de variation (en bas).

D : Décomposition par ACP fonctionnelle d'un jeu de données expérimentales.

Pour nos expériences de suivi du stress oxydant grâce aux sondes, la première har-

monique explique de manière générale une très grande proportion de la variabilité des jeux

de données obtenus : ce mode de variation est donc prépondérant, et le score qui lui est

associé est un très bon indicateur du niveau d'oxydation global de la sonde au cours de l'expérience. A titre d'exemple, la Figure 35D présente l'ACP fonctionnelle d'un de nos jeux de données expérimentaux – les courbes de réponse à 0, 10, 40 ou 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la sonde HyPer exprimée dans le cytoplasme, seule ou en coexpression avec A $\beta_{1-40}$  ou PrP –. Ici, les courbes se résument quasi-parfaitement par la première harmonique (97,6% de la variabilité) (Figure 35D, deuxième colonne, graphe du haut). De plus, cette harmonique s'interprète facilement : il s'agit d'un mode de variation de type pharmacocinétique, et, plus le score d'une courbe sur cette harmonique est élevé, plus le ratio, associé à la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est globalement élevé au cours du temps, ce qui se vérifie en représentant l'ensemble des courbes colorées en fonction de ce score (Figure 35D, troisième colonne, graphe du haut). Les harmoniques suivantes sont plus difficiles à interpréter : chacune explique au maximum 0,5% du jeu de données, et elles correspondent sans doute à du bruit (Figure 35D, deuxième et troisième colonne, graphe du bas).

#### 2.9.2.2. Tests statistiques utilisés

Les paramètres calculés pour décrire les courbes sont des variables quantitatives. Pour chaque paramètre, les médianes des valeurs obtenues dans les différentes conditions expérimentales (par exemple : avec et sans expression de PrP) peuvent donc être comparées grâce à l'utilisation de tests statistiques. Ici, nous utilisons des tests non paramétriques, adaptés aux petits échantillons. Dans certains cas, des comparaisons multiples sont réalisées. Le test de Kruskal-Wallis (Kruskal and Wallis, 1952), équivalent non paramétrique de l'ANOVA, est exécuté en premier. Si la p-valeur associée à ce test est inférieure à 5%, on peut conclure qu'il existe au moins une différence significative. Des comparaisons deux à deux sont alors réalisées grâce au test de Wilcoxon-Mann-Whitney (Wilcoxon, 1945). Pour que le risque global de se tromper au moins une fois sur l'ensemble des comparaisons multiples, appelé FEWR pour *family-wise error rate*, reste inférieur à 5%, il est nécessaire d'ajuster ces comparaisons multiples. La méthode de correction utilisée ici est la procédure de Holm-Bonferroni (Holm, 1979), présentée par la Figure 36. Nous avons choisi de l'exécuter à la main après calcul avec le logiciel R des p-valeurs brutes associées aux différents tests. Par exemple, si trois comparaisons sont réalisées, pour que les trois différences soient significatives au seuil de 5%, il faut que la p-valeur la plus petite soit inférieure ou égale à  $\frac{0,05}{3}$  (soit environ 0,017), que la deuxième p-valeur la plus petite soit inférieure ou égale à 0,025, et que la p-valeur la plus grande soit inférieure ou égale à 0,05.



#### Figure 36 : Procédure de la correction de Holm-Bonferroni

La figure présente la procédure à suivre pour évaluer la significativité au seuil de 5% de k différences testées sur une même variable. Figure adaptée de (Desquilbet, 2016).

### 3. Résultats

Mes travaux de thèse s'appuient sur des modèles cellulaires construits à partir de la lignée épithéliale RK13. La première partie de cette section présente les résultats d'un projet de l'équipe portant sur l'interaction entre A $\beta_{1-40}$  monomérique et PrP<sup>C</sup> *in vitro* et dans cette lignée cellulaire. La deuxième partie présente les modèles cellulaires mis en place pour mes travaux sur le stress oxydant. Les deux parties suivantes portent sur les optimisations mé-thodologiques qui ont permis d'améliorer la reproductibilité des expériences, puis sur les outils bioinformatiques implémentés dans le cadre de ce projet de thèse. La cinquième partie présente l'influence sur l'homéostasie rédox de l'expression par les cellules des polypeptides physiologiques : PrP<sup>C</sup> et A $\beta_{1-40}$ . Nous nous sommes ensuite intéressés aux perturbations rédox induites par des assemblages pathologiques d'A $\beta$  ou de PrP recombinants avec et sans expression de PrP, puis à la réponse rédox des cellules à l'infection par un prion.

#### 3.1. Etude de l'interaction entre Aβ<sub>1-40</sub> monomérique et PrP monomérique

Comme décrit dans la partie 1.1.1.2, la PrP<sup>C</sup> joue un rôle de récepteur dans différentes voies de signalisation dans les conditions physiologiques normales, et, comme pour d'autres récepteurs membranaires, cette fonction est probablement médiée par sa dimérisation (Roucou, 2014). Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la PrP<sup>C</sup> médie également la toxicité de certains assemblages d'A $\beta$ , *via* son oligomérisation au niveau des radeaux lipidiques conduisant à l'activation de la Src kinase Fyn (Caetano et al., 2011; Larson et al., 2012; Um et al., 2012). La plupart des études sur l'interaction entre PrP<sup>C</sup> et A $\beta$  ont pour but de mieux comprendre les mécanismes de la maladie d'Alzheimer et se concentrent donc sur des assemblages potentiellement pathologiques d'A $\beta$  : l'existence et le rôle potentiel d'une interaction entre PrP et A $\beta$  dans les conditions physiologiques normales sont ainsi mal documentées. L'un des projets de l'équipe MAP2 vise donc à étudier l'interaction entre la PrP<sup>C</sup> et le peptide A $\beta$  le plus produit dans les conditions physiologiques, à savoir A $\beta_{1-40}$  monomérique, et l'effet de cette interaction sur la dynamique conformationnelle de la PrP.

J'ai eu l'opportunité de participer à ce projet, en étudiant l'effet d'A<sub>β1-40</sub> monomérique sur la PrP<sup>C</sup> in cellulo. Dans ce cadre, j'ai mené des expériences d'immunofluorescence qui suggèrent que, dans le modèle cellulaire RK13, une interaction entre Aβ<sub>1-40</sub> monomérique et PrP<sup>C</sup> existe et semble favoriser l'oligomérisation de PrP. Plus précisément, des cellules RK13 sauvages et des cellules RK13 exprimant l'allèle VRQ de la PrP ont été exposées à 50  $\mu$ M d'A $\beta_{1-40}$  monomérique recombinant pendant 24 h. Après fixation des cellules et immunomarquage de la PrP et de l'AB, les échantillons sont observés en microscopie confocale. On observe une colocalisation partielle entre A $\beta_{1-40}$  et PrP, ce qui suggère une interaction entre ces deux molécules (Figure 37A et B). L'aire des spots correspondant à PrP et Aβ<sub>1-40</sub> est quantifiée et le test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé pour comparer les tailles des spots obtenus dans les différentes conditions. Les spots de PrP<sup>C</sup> sont de plus grande taille en présence d'A $\beta_{1-40}$  (Figure 37C) et les spots d'A $\beta_{1-40}$  sont de plus petite taille en présence de PrP<sup>C</sup> (Figure 37D). Ces résultats suggèrent que, *in cellulo*, Aβ et PrP interagissent. Cette interaction semble favoriser l'agrégation de la PrP<sup>C</sup> et inhiber l'agrégation d'Aß. Toutefois, la sensibilité relativement faible de cette approche nous a contraints à utiliser une concentration en A $\beta$  bien supérieure à sa concentration physiologique ; il est donc nécessaire de poursuivre l'analyse avec des concentrations plus faibles.



Figure 37 : Effet de l'exposition au monomère d'A $\beta_{1-40}$  des cellules RK13 exprimant ou non la PrP<sup>C</sup>. Adapté de (Grznarova et al., en révision)

A : Immunomarquage de cellules RK13 exprimant ou non PrP avec et sans exposition à A $\beta_{1-40}$  monomérique. Les cellules sont incubées pendant 24 h, soit avec 50 µM d'A $\beta_{1-40}$ , soit avec le même volume de tampon. A $\beta$  et PrP sont immunomarqués avec des anticorps secondaires couplés aux AlexA fluor 555 et 488 nm respectivement. Les images obtenues en microscopie confocale sont seuillées et montées avec ImageJ. Les flèches indiquent des zones de colocalisation entre A $\beta$  et PrP.

B : Profils d'intensité sur les canaux correspondant à PrP (en vert) et à A $\beta$  (en rouge) le long de la ligne représentée en jaune sur l'image de gauche.

C : Aire des spots de PrP segmentés par seuillage sur les images correspondantes en fonction de l'exposition ou non à A $\beta_{1-40}$ , et p-valeur associée au test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

D: Aire des spots d'A $\beta_{1-40}$  segmentés par seuillage sur les images correspondantes en fonction de l'expression ou non de PrP par les cellules, et p-valeur associée au test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Des expériences *in vitro* ont donc été menées pour étudier cette interaction plus en détails, et avec une gamme de concentrations d'A $\beta$  plus physiologique. Ces expériences utilisent des PrP recombinantes avec différentes troncatures au niveau des trois sites de fixation d'A $\beta$  rapportés dans la littérature, dans le but d'étudier les effets de la liaison d'A $\beta$  à chaque site sur la dynamique structurale et l'oligomérisation de la protéine. Après contrôle par dichroïsme circulaire de leur bon repliement, les différentes protéines tronquées ont été marquées par des fluorophores. Une approche de thermophorèse à micro-échelle (MST) indique que la PrP s'agrège suite à son exposition à A $\beta$ , et cette agrégation rend les données de MST en elles-mêmes inexploitables. Toutefois, des variations au niveau des intensités de fluorescence initiale sont observées suite à l'exposition à A $\beta$ , qui traduisent un changement de l'environnement du fluorophore avec lequel la PrP est marquée, indiquant une liaison de la protéine avec A $\beta$ . Ces données permettent également d'estimer l'affinité de chaque mutant de PrP avec A $\beta$ . L'analyse des résultats obtenus confirme l'existence de trois sites de fixation des monomères d'A $\beta$  : deux au niveau de la région N-terminale non structurée (sites 1 et 2), dont l'un présente une forte affinité avec A $\beta$  (site 2), et un au niveau du domaine globulaire C-terminal (site 3), dont l'affinité avec A $\beta$  est la plus faible. De plus, l'interaction d'A $\beta$  avec le domaine C-terminal de la PrP (site 3) est inhibée par la région N-terminale de la protéine : ce site ne peut en effet être mis en évidence que pour les PrP tronquées dans la région 103-124, et l'interaction d'A $\beta$  avec son site de plus haute affinité (site 2) est modulée par le domaine C-terminal de la PrP.

Un suivi de la diffusion statique de la lumière (SLS) d'une solution de PrP recombinante en présence de différentes concentrations d'A $\beta$  montre que, en présence d'A $\beta$ , la PrP s'agrège sous forme d'oligomères. De plus, l'analyse des résultats obtenus avec différents mutants indique que (i) en absence de fixation à A $\beta$ , le domaine N-terminal de la PrP<sup>C</sup> interagit avec son domaine globulaire C-terminal, ce qui inhibe son agrégation, (ii) la fixation d'A $\beta$  sur les deux sites du domaine N-terminal atténue cette inhibition, probablement *via* un réarrangement structural, et (iii) la fixation d'A $\beta$  sur le site inclus dans le domaine globulaire conduit également à un réarrangement structural de la protéine inhibant là encore l'effet régulateur de la région N-terminale sur l'agrégation du domaine C-terminal. Ainsi, en présence d'A $\beta_{1-40}$  monomérique, forme principale d'A $\beta$  en conditions non pathologiques, la PrP<sup>C</sup> s'assemble sous forme d'oligomères. Ce processus dépend de la concentration en A $\beta$  : la PrP pourrait donc en être un senseur. *In vivo*, cette oligomérisation pourrait se traduire par la formation de clusters de PrP<sup>C</sup> au niveau de la membrane, ce qui correspond probablement à la première étape de l'activation de cascades de signalisation en aval.

L'ensemble de ce projet a donné lieu à la rédaction d'un article reproduit en annexe (p. 312), soumis pour publication au *Journal of Biological Chemistry* (Grznarova et al., en révision).

#### 3.2. Construction de modèles cellulaires pour le suivi du stress oxydant

Dans le but de pouvoir suivre en temps réel l'évolution de l'homéostasie rédox en réponse à Aβ et PrP sous leurs formes physiologiques et sous forme d'agrégats potentiellement pathologiques, nous avons construit des lignées cellulaires exprimant des sondes rédox fluorescentes. Deux types de stratégies expérimentales ont été utilisées. Cette section présente les lignées cellulaires obtenues avec chacune de ces stratégies.

Nos modèles sont basés sur la lignée RK13, lignée de cellules épithéliales de rein de lapin (Christofinis and Beale, 1968), modifiée de façon à exprimer le peptide Aβ<sub>1-40</sub> ou l'allèle VRQ de la protéine prion ovine. A l'état sauvage, les cellules RK13 n'expriment ni PrP ni Aß endogènes à des niveaux détectables, ce qui permet de s'affranchir de potentielles interférences fonctionnelles avec les polypeptides hétérologues. De plus, il a déjà été montré que les cellules RK13 modifiées pour exprimer des protéines prion issues de différentes espèces sont des lignées modèles pour l'étude des infections à prions en contexte non neuronal (Arellano-Anaya et al., 2017; Vilette et al., 2001). Des travaux préliminaires conduits au laboratoire suggèrent par ailleurs que la lignée RK13, transfectée pour exprimer Aβ1-40 à l'extérieur des cellules, pourrait produire des assemblages proches de ceux qui sont retrouvés dans le cerveau de souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Igel Egalon, 2013). Les cellules RK13, dont la culture est facile et peu coûteuse par rapport à celle de modèles neuronaux, sont donc intéressantes pour étudier dans une première approche ces deux maladies. Ces cellules ont été transfectées avec des vecteurs d'expression de plusieurs sondes fluorescentes protéiques permettant de suivre les variations de concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le niveau d'oxydation des thiols cellulaires. Ainsi, nous avons obtenu des lignées cellulaires permettant de suivre en temps réel les variations du stress oxydant.

#### 3.2.1. Modèles avec expression constitutive des sondes et inductible d'Aß ou PrP

#### 3.2.1.1. Stratégie

Des lignées cellulaires exprimant les sondes rédox de façon constitutive et le polypeptide d'intérêt de façon inductible présenteraient trois avantages : (i) l'absence d'expression basale d'A $\beta$  et de PrP permet d'éviter la mise en place de mécanismes d'adaptation des cellules tels que la sélection de cellules exprimant de faibles niveaux d'A $\beta$  en raison de la toxicité du peptide, (ii) les mêmes lignées de cellules peuvent être utilisées pour étudier le stress oxydant avec et sans expression du polypeptide d'intérêt – à condition de contrôler l'absence d'effet détectable de la doxycycline sur le stress oxydant –, (iii) l'expression constitutive des sondes permet de suivre en temps réel les modifications rédox dans les cellules au cours de l'induction de l'expression du polypeptide d'intérêt.

Ces lignées sont construites à partir de lignées déjà présentes au laboratoire : la lignée Rov9, appelée par la suite RK13-PrP, exprimant l'allèle VRQ de la PrP<sup>C</sup> ovine et infectable par le prion (Vilette et al., 2001), et la lignée RK13 Aβ<sub>1-40</sub>, exprimant le peptide Aβ<sub>1-40</sub> précédé d'un peptide signal permettant l'adressage au réticulum endoplasmique, puis l'excrétion, d'A<sub>β1-40</sub> (Igel Egalon, 2013). Ces cellules expriment la protéine ou le peptide d'intérêt de façon inductible par la doxycycline (Figure 38A, B et D). Elles sont transfectées avec les vecteurs codant les sondes HyPer, permettant de suivre la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et rxYFP, permettant de suivre le niveau d'oxydation des thiols, sous contrôle du promoteur fort pCMV2 (Figure 38C), conduisant à une expression constitutive des sondes (Figure 38E). Nous avons utilisé des vecteurs permettant aux sondes d'être exprimées soit dans le compartiment nucléocytoplasmique (sans signal d'adressage), soit dans le cytoplasme avec exclusion du noyau grâce à un signal d'exclusion nucléaire (NES), soit dans les mitochondries grâce à une ou deux séquences d'adressage aux mitochondries (MLS), soit dans le noyau grâce à trois signaux de localisation nucléaire (NLS) (voir Matériels et méthodes, p. 98). Des lignées de cellules RK13 exprimant de façon constitutive les sondes et n'exprimant ni Aß ni PrP sont également construites. Ces lignées permettent de contrôler l'absence d'effet de la doxycycline sur l'homéostasie rédox.



## Figure 38 : Stratégie d'expression inductible des protéines d'intérêt et constitutive des sondes

Les cellules sont transfectées successivement avec :

- Le vecteur codant le transactivateur Tet 3G sous contrôle du promoteur CMV (A).
- Le vecteur codant, soit Aβ<sub>1-40</sub> précédé du peptide signal de l'insuline, soit PrP sous contrôle du promoteur TRE3G (B).
- Le vecteur codant la sonde HyPer nucléocytoplasmique, HyPer mitochondriale, HyPer nucléaire, rxYFP cytoplasmique, rxYFP mitochondriale ou rxYFP nucléaire sous contrôle du promoteur CMV (C).

Cette stratégie permet une expression inductible d'A $\beta_{1-40}$  ou PrP (D) et une expression constitutive des sondes (E).

Figures A, B, D adaptées du manuel d'utilisation du système d'expression inductible Tet-On® des laboratoires ClonTech, ©2014 Clontech Laboratories, Inc., (nka Takara Bio USA, Inc.)

AmpR : gène de résistance à l'ampicilline, KanR : gène de résistance à la kanamycine, NeoR : gène de résistance à la néomycine, P<sub>CMV IE</sub> : promoteur *immediate early* du cytomegalovirus, SMC : site multiple de clonage, SV40 : virus simien 40.

### 3.2.1.2. Contrôle par immunofluorescence de l'expression et de la localisation des polypeptides d'intérêt

Après transfection des cellules RK13 A $\beta_{1-40}$  et des cellules RK13 PrP avec les vecteurs d'expression des six sondes, les populations de cellules résistantes aux antibiotiques de sélection sont observées en microscopie à fluorescence après immunomarquage des polypeptides d'intérêt. Des cellules RK13 sauvages sont également imagées comme contrôle négatif, pour établir les valeurs de seuillage appliquées par la suite à toutes les images.

La Figure 39A présente des images caractéristiques de certaines des lignées obtenues après induction de l'expression d'A $\beta$  ou PrP. La localisation des sondes est cohérente : l'expression des sondes cytoplasmiques (lignes 1 et 4) apparaît globalement diffuse, les sondes adressées aux mitochondries (lignes 2 et 5) présentent un marquage ponctiforme caractéristique et superposable avec les mitochondries (Figure 39B), et les sondes adressées aux noyaux (lignes 3 et 6) apparaissent superposables avec les noyaux. Le marquage correspondant au peptide A $\beta_{1-40}$  est majoritairement périnucléaire. Ce marquage correspond probablement au peptide A $\beta$  qui transite par le système monomembranaire avant d'être excrété (Igel Egalon, 2013). Le marquage correspondant à la PrP est cohérent avec une localisation de la protéine à la surface des cellules comme attendu.

Même si la proportion de cellules coexprimant les sondes et le polypeptide d'intérêt est plutôt élevé (supérieure à 50%), certaines cellules n'expriment ni la sonde ni le polypeptide d'intérêt (Figure 39A, flèches blanches), certaines expriment Aβ<sub>1-40</sub> ou PrP sans exprimer la sonde (Figure 39A, flèches rouges), et d'autres expriment la sonde sans exprimer ni Aβ<sub>1-40</sub> ni PrP (Figure 39A, flèches vertes). Ainsi, bien que les cellules transfectées aient été sélectionnées par des antibiotiques, le taux de cellules coexprimant sonde et polypeptide d'intérêt n'est pas de 100%. Outre le fait que l'intégration du plasmide dans le génôme cellulaire n'est pas ciblée et peut donc se produire dans des régions non codantes, cela peut être dû au fait que les cellules n'ont pas pu être sélectionnées directement grâce à un gène de résistance à un antibiotique présent sur les plasmides pTRE3G – qui ne codent aucune résistance à un antibiotique – et pCMV – qui code la résistance au même antibiotique que pTet-On, avec lequel les cellules ont été transfectées au préalable –. Elles ont dû être cotransfectées avec des plasmides de sélection portant les gènes de résistance aux antibiotiques (cf. matériels et méthodes). Ainsi, des cellules ont pu intégrer les plasmides de sélection sans intégrer les plasmides d'expression, et sont alors résistantes aux antibiotiques sans exprimer les polypeptides d'intérêt.



Figure 39 : Contrôle de la localisation des protéines d'intérêt dans des populations de cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  ou PrP de façon inductible et les sondes de façon constitutive A : Immunofluorescence de six populations de cellules RK13 coexprimant A $\beta_{1-40}$  ou PrP et l'une des sondes fluorescentes. Les flèches blanches indiquent des cellules qui n'expriment ni la sonde, ni le polypeptide d'intérêt. Les flèches vertes indiquent des cellules exprimant A $\beta$  ou PrP sans exprimer la sonde. Les flèches rouges indiquent des cellules exprimant A $\beta$  ou PrP sans exprimer la sonde.

Barres d'échelle : 50 µm.

B : Marquage avec un mitotracker des mitochondries de cellules exprimant les sondes HyPer et rxYFP adressées aux mitochondries. Les cellules vivantes sont imagées avec un microscope à épifluorescence. Les mitochondries apparaissent bien superposables avec la sonde.

# 3.2.1.3. Evolution de l'expression des sondes et du polypeptide d'intérêt au cours des passages

Notre projet de recherche nécessite d'avoir des lignées cellulaires stables pendant une longue durée en culture. Par exemple, le suivi d'une infection prion se fait sur une dizaine de passages, et il est nécessaire que l'expression de la  $PrP^{C}$  et de la sonde se maintiennent au cours de cette période. Pour contrôler cette stabilité, les immunomarquages décrits au paragraphe précédent sont répétés régulièrement au cours des passages. Pour chaque expérience, deux champs choisis aléatoirement pour chaque puits sont imagés avec un faible grossissement (objectif × 10). Les images sont seuillées en utilisant les cellules RK13 sauvages comme contrôle négatif, puis les cellules sont dénombrées à la main et les pourcentages de cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  ou PrP et la sonde sont calculés pour chacune des six lignées. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de diagrammes en barres (Figure 40).

Pour les lignées de cellules coexprimant HyPer et A $\beta_{1-40}$  (Figure 40, panel du haut, première ligne), la proportion de cellules exprimant les sondes, seules ou en coexpression avec A $\beta_{1-40}$ , est très faible et diminue au cours du temps. De plus, la proportion de cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  est différente d'une lignée à l'autre et variable au cours du temps. Pour les lignées coexprimant A $\beta_{1-40}$  et rxYFP (Figure 40, panel du bas, première ligne), la proportion de cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  et rxYFP (Figure 40, panel du bas, première ligne), la proportion de cellules exprimant les sondes est plus élevée, mais la proportion de cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  diminue au cours du temps, ce qui conduit à une diminution de la coexpression. Pour les cellules coexprimant PrP de façon inductible et les sondes de façon constitutive (Figure 40, deuxième ligne de chaque panel), les observations n'ont été faites qu'à des passages plus tardifs, donc la potentielle dérive des lignées cellules coexprimant les sondes et PrP restent relativement stable mais sont très faibles pour certaines lignées. En effet, les lignées exprimant HyPer dans le cytoplasme et rxYFP dans le noyau présentent une forte proportion de cellules exprimant la sonde sans exprimer PrP.

De manière générale, une forte proportion de cellules exprimant la sonde sans exprimer A $\beta_{1-40}$  ou PrP posera problème lors de l'analyse du niveau d'oxydation des sondes, que l'on choisisse de le suivre par western blot rédox ou en temps réel par microscopie. En effet, les cellules exprimant la sonde sans exprimer A $\beta$  ou PrP contribueront au signal détecté sur

132

le western blot rédox, masquant ainsi partiellement une éventuelle différence de l'homéostasie rédox due à l'expression d'A $\beta$  ou de PrP. Par ailleurs, pour suivre le niveau d'oxydation des sondes en temps réel par microscopie à fluorescence, il est nécessaire de travailler sur des cellules vivantes, il est donc impossible de savoir si les cellules observées expriment ou non A $\beta$  ou PrP. Le risque est alors d'imager des cellules exprimant la sonde sans exprimer le polypeptide d'intérêt, et donc de ne pas détecter son potentiel effet sur le stress oxydant. Il est donc nécessaire d'améliorer les taux de coexpression des sondes avec A $\beta_{1-40}$  et PrP pour les lignées concernées, et de les stabiliser par un maintien des antibiotiques de sélection au cours des passages : le fait de les avoir retirés dès la troisième semaine après les transfections a pu contribuer à la dérive observée.



Figure 40 : Pourcentage d'expression d'A $\beta_{1-40}$  et des sondes en fonction du temps Les douze lignées cellulaires coexprimant les sondes et A $\beta_{1-40}$  ou les sondes et PrP sont caractérisées par immunofluorescence régulièrement au cours des passages. Les pourcentages d'expression des deux polypeptides sont évalués par comptage sur les images obtenues après seuillage.

#### 3.2.1.4. Sous-clonages des différentes lignées cellulaires

Dans le but d'isoler des lignées cellulaires stables, des sous clonages sont réalisés pour l'ensemble des lignées coexprimant les sondes avec Aβ<sub>1-40</sub>. Ces expériences sont réalisées par dilution limite en P96 (cf. Matériels et méthodes, p.97) : chaque puits est théoriquement ensemencé avec 0 ou 1 cellule, mais, en pratique, la plupart des lignées ainsi sélectionnées présentent des variations au niveau de l'expression des protéines d'intérêt et il n'est pas exclu que ces populations ne soient pas clonales mais issues de plusieurs cellules. Nous avons néanmoins isolé et caractérisé des lignées enrichies en cellules coexprimant la sonde et le polypeptide d'intérêt pour toutes les sondes à l'exception de la sonde HyPer adressée au cytoplasme et au noyau. La Figure 41A présente des images obtenues par immunofluorescence des lignées présentant la plus grande proportion de cellules coexprimant la sonde et A<sub>β1-40</sub>. Comme pour les populations de cellules décrites dans les paragraphes précédents, ces marquages sont répétés régulièrement au cours des passages. Pour les lignées sélectionnées, la proportion de cellules exprimant la sonde ou Aβ<sub>1-40</sub> est supérieure à 50% et est stable au cours des passages, mais la proportion de cellules exprimant la sonde sans exprimer d'A<sub>β1-40</sub> détectable reste non négligable (Figure 41B). Nous avons néanmoins réalisé des expériences préliminaires de suivi du stress oxydant en utilisant ces lignées, ainsi que la population de cellules coexprimant la sonde rxYFP dans le cytoplasme et PrP.





A : Immunofluorescence de quatre lignées obtenues après sous-clonage des populations de cellules coexprimant les sondes et A $\beta_{1-40}$ . Les marquages sont réalisés après 24 h d'induction de la synthèse d'A $\beta_{1-40}$ . Les flèches blanches indiquent des cellules qui n'expriment ni la sonde, ni A $\beta$ . Les flèches vertes indiquent des cellules exprimant la sonde sans exprimer A $\beta$ . Les flèches rouges indiquent des cellules exprimant A $\beta$  sans exprimer la sonde.

B : Les quatre lignées cellulaires sont caractérisées par immunofluorescence régulièrement au cours des passages. Les pourcentages d'expression des deux polypeptides sont évalués par comptage sur les images obtenues après seuillage. Les barres verticales correspondent à une étape de congélation à -80°C suivie d'une décongélation.

# 3.2.1.5. Etude de l'effet de l'expression d'Aβ<sub>1-40</sub> et de PrP sur la sensibilité de ces modèles cellulaires au stress oxydant

Les modèles cellulaires précédemment construits ont été utilisés pour une étude préliminaire de l'effet sur le stress oxydant de l'expression endogène d'A<sub>β1-40</sub> et de PrP. Nous avons choisi pour cette étude de nous concentrer sur les modèles cellulaires exprimant la sonde rxYFP, permettant de suivre le niveau d'oxydation des thiols, car ce sont ces modèles qui présentent les taux de coexpression de la sonde avec A<sub>β</sub> ou PrP les plus élevés. Or, cette sonde ne présente qu'un seul pic d'excitation fluorescent (Figure 25B, page 86), et ne permet donc pas de réaliser un suivi ratiométrique du niveau d'oxydation des sondes en temps réel par microscopie à fluorescence (Lukyanov and Belousov, 2014). Nous avons donc réalisé un suivi discret du niveau d'oxydation des sondes par western blot rédox en adaptant un protocole de (Banach-latapy et al., 2013). Dans un premier temps, nous avons contrôlé pour toutes les lignées cellulaires utilisées qu'un traitement des cellules par l'oxydant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduisait à une oxydation détectable de la sonde avec et sans induction de l'expression d'A $\beta_{1-40}$  ou PrP. La Figure 42A présente de façon schématique l'expérience réalisée dans ce but. Après 24 heures en culture, les cellules sont traitées par 100 ou 500 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 10, 30 ou 60 min. A l'issue du traitement, l'état rédox des sondes est bloqué, puis les sondes oxydée et réduite sont séparées par SDS-PAGE et révélées par western blot avant quantification. La Figure 42B présente un western blot rédox caractéristique obtenu avec une lignée cellulaire exprimant la sonde rxYFP dans les mitochondries avec induction de la synthèse d'A $\beta$ . Cette expérience montre, d'une part, que, sans traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la proportion de sonde oxydée est très faible (piste de gauche, bande du bas), et, d'autre part, que les traitements oxydants testés conduisent bien à une augmentation de la proportion de sonde oxydée, qui est plus importante pour les cellules traitées par 500 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pistes 3 à 6) que pour les cellules traitées par 100 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pistes 2 et 3). Nous avons ainsi vérifié pour tous les modèles cellulaires utilisés que le traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduisait à une oxydation détectable de la sonde.



## Figure 42 : Contrôle de la sensibilité des sondes à un oxydant exogène dans les lignées cellulaires utilisées

A : Après 24 heures en culture dans une plaque à 6 puits, les cellules sont traitées par 100 ou 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 10, 30 ou 60 minutes. Les thiols libres sont bloqués, ce qui permet de séparer par électrophorèse les formes oxydée et réduite de la sonde avant révélation par western blot et quantification.

B : Western blot rédox obtenu à partir de cellules RK13-A $\beta_{1-40}$  exprimant rxYFP dans les mitochondries, sans induction de la synthèse d'A $\beta$ , suite aux différents traitements par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'expression endogène d'Aβ<sub>1-40</sub> sur la proportion de thiols oxydés dans les cellules. Nous avons travaillé avec les cellules exprimant rxYFP dans les mitochondries, car c'est la seule lignée pour laquelle une bande oxydée est visible en western blot en l'absence de traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'expérience réalisée est schématisée par la Figure 43A. Des P6 sont ensemencées avec les cellules exprimant rxYFP dans les mitochondries, avec et sans coexpression inductible de la sonde avec A $\beta_{1-40}$ . Ces cellules sont exposées à la doxycycline pendant 1, 3, 5, 7 et 24h pour induire la synthèse d'A $\beta_{1-40}$  dans la lignée concernée. Le niveau d'oxydation des thiols est ensuite quantifié par western blot. La Figure 43B montre que l'expression d'A $\beta_{1-40}$  pendant 0, 1, 3, 5, 7 ou 24 heures n'est associée à aucun effet significatif sur le niveau d'oxydation des thiols dans les mitochondries.



## Figure 43 : Effet de la durée d'induction de l'expression d'A $\beta$ sur le niveau d'oxydation des thiols dans les mitochondries

A : Après 24 heures en culture dans des plaques à 6 puits, les cellules exprimant ou non A $\beta$  de façon inductible sont exposées à la doxycyline pendant 0, 1, 3, 5, 7 ou 24 heures. Les thiols libres sont bloqués, ce qui permet de séparer par électrophorèse les formes oxydée et réduite de la sonde avant révélation par western blot et quantification.

B : Pourcentage de sonde rxYFP oxydée dans les mitochondries en fonction du temps d'induction de la synthèse d'A $\beta_{1-40}$ .

Même si nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet significatif de la synthèse d'A $\beta_{1-40}$  sur le niveau d'oxydation des thiols cellulaires, nous avons souhaité savoir si l'expression du peptide pouvait modifier la réponse cellulaire à un oxydant exogène. En effet, si le peptide conduisait à une diminution des défenses anti-oxydantes cellulaires, cela pourrait être mis en évidence par une moins bonne élimination par les cellules d'un oxydant exogène. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de l'expression d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP sur la réponse cellulaire à un traitemen par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans ce cadre, nous avons traité les cellules exprimant rxYFP dans le cytoplasme ou les mitochondries, seule ou en coexpression avec A $\beta_{1-40}$  ou PrP, avec 100 ou 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant des temps compris entre 0 et 60 minutes (Figure 44A). La Figure 44B présente les résultats obtenus avec les cellules exprimant rxYFP

dans le cytoplasme. Ces expériences confirment que la sonde rxYFP est sensible à 100 et 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ce compartiment, mais l'augmentation de son niveau d'oxydation n'est pas significativement différente avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$  (courbes rouges vs courbes violettes) et de PrP (courbes vertes vs courbes violettes). De façon similaire, la Figure 44C montre la réponse à 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la sonde rxYFP dans les mitochondries, avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$ . L'expression du peptide ne modifie pas de façon significative la réponse de la sonde au traitement par 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans nos conditions expérimentales.



## Figure 44 : Influence de l'expression d'A $\beta_{1\text{-}40}$ ou de PrP sur le niveau d'oxydation des thiols cellulaires

A : Les cellules RK13 A $\beta_{1-40}$  ou RK13 PrP sont cultivées en P6 pendant 24 heures avec et sans induction de la synthèse du polypeptide d'intérêt. Les cellules sont ensuite traitées, selon les cas, par 100 ou 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 0, 2, 6, 9, 10, 15, 30 ou 60 minutes avant blocage des thiols libres et western blot.

B : Pourcentage de sonde rxYFP oxydée dans le cytoplasme en fonction du temps de traitement par 100  $\mu$ M (à gauche) ou 500  $\mu$ M (à droite) d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$ ou de PrP.

C : Pourcentage de sonde rxYFP oxydée dans les mitochondries en fonction du temps de traitement par 500  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$ .

La littérature indique un effet antioxydant de l'expression de la PrP<sup>C</sup> (Westergard et al., 2007), et un effet rédox d'A $\beta_{1-40}$ , même s'il est plus discuté (Baruch-Suchodolsky and Fischer, 2009; Kontush, 2001). De plus, dans un modèle très proche du nôtre, à savoir des

cellules RK13 génétiquement modifiées pour exprimer de façon inductible par la doxycycline une PrP<sup>C</sup> murine, l'effet antioxydant de la PrP<sup>C</sup> est partiellement médié par une augmentation de l'activité des glutathion réductases : on s'attendrait donc à un effet sur le niveau d'oxydation de rxYFP de l'expression de la PrP<sup>C</sup>, et, potentiellement, d'Aβ, dans nos expériences. Le fait qu'aucun effet de l'expression de ces protéines n'ait pu être mis en évidence pourrait être dû à un manque de sensibilité, qui a plusieurs causes. D'une part, une proportion non négligeable de cellules exprimant la sonde n'expriment pas la protéine ou le peptide d'intérêt, et ces cellules peuvent partiellement masquer de potentielles différences de niveau d'oxydation de la sonde dues à l'expression d'A<sub>β1-40</sub> ou PrP. Par exemple, pour la lignée coexprimant rxYFP dans les mitochondries et A<sup>β</sup>, près de 50% des cellules qui expriment la sonde et participent donc aux western blot n'expriment pas Aβ, ce qui divise par 2 la sensibilité de nos mesures. D'autre part, la méthode de suivi des sondes par western blot présente plusieurs inconvénients. Il est difficile d'avoir suffisamment de réplicats pour mettre en évidence des différences modérées car ces expériences sont lourdes et relativement longues : une semaine de travail est nécessaire pour obtenir 12 points de mesure. Le suivi de l'oxydation des sondes par western blot ne peut être que discret avec un pas de temps relativement élevé. En effet, l'arrêt de tous les traitements d'une plague prend plus d'une minute : chaque puits doit être rincé deux fois avec du PBS avant incubation dans du TCA froid. Le temps de traitement des cellules n'est donc précis qu'à une minute près environ, ce qui rend les durées de traitement trop faibles très imprécises. Or, il serait intéressant de pouvoir suivre en temps réel l'entrée d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules, car il s'agit d'un phénomène rapide médié par des aquaporines (Miller et al., 2010; Wang et al., 2020a). De plus, nous avons dû utiliser des concentrations élevées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour les expériences de suivi de la réponse des cellules à un oxydant exogène de façon à ce que la sonde oxydée reste détectable par western blot malgré les longs pas de temps utilisés, mais ces concentrations sont peut-être trop fortes devant la capacité de modulation par Aβ<sub>1-40</sub> et PrP de la réponse cellulaire à cet oxydant fort. Enfin, pour que la quantification de signaux sur des westerns blots soit fiable, il faut que ces signaux se situent dans la gamme linéaire de détection (Pillai-Kastoori et al., 2020). En effet, la relation entre intensité du signal et masse de protéines est sigmoïdale : les quantités de protéines trop faibles ne sont pas détectées et les quantités de protéines trop élevées conduisent à une saturation du signal (Figure 45A). Pour les quantités de protéines intermédiaires, le signal détecté est proportionnel à la quantité de protéines et la quantification peut donc être réalisée de manière fiable. Nous avons donc évalué la gamme linéaire de détection des sondes dans nos modèles cellulaires. Dans ce but, nous avons réalisé des westerns blots avec des dilutions sériées d'un échantillon préparé à partir de cellules exprimant rxYFP dans le cytoplasme avant de quantifier le signal obtenu. Cette expérience a été réalisée deux fois, avec deux concentrations différentes en protéines totales pour l'échantillon le plus concentré (Figure 45B et C).



#### Figure 45 : Relation entre signal quantifié par western blot et masse de protéines

A : Relation théorique entre masse de protéines dans l'échantillon et intensité du signal détecté. L'allure de la courbe est sigmoïde et peut être divisée en trois parties : la première partie correspond au bruit de fond, la deuxième partie, appelée gamme linéaire, correspond à des quantités de protéines pour laquelle l'intensité du signal détecté est proportionnelle à la quantité de protéines déposée, et la troisième partie correspond à des quantités de protéines pour lesquelles l'intensité du signal n'augmente plus quand la quantité de protéines augmente : le signal est saturé.

B : Intensité du signal en fonction de la masse totale de protéines déposée. Un échantillon concentré est préparé à partir de la lignée de cellules RK13 A $\beta_{1-40}$  exprimant la sonde rxYFP cytoplasmique en suivant le même protocole que pour le western blot rédox. Les échantillons suivants sont préparés par dilution sériée de deux en deux.

C : Réplicat biologique de l'expérience B avec une gamme plus étendue de quantités de protéines déposées. Cette expérience présente une gamme linéaire plus étendue, mais qui reste relativement faible (inférieure à 1,5 log).

u.a. : unité arbitraire.

Les deux courbes obtenues ont une allure sigmoïde. La gamme linéaire est plus étendue quand la quantité maximale de protéines totales déposée est de 30 µg (comme dans nos expériences de western blot rédox) que quand elle est de 15 µg, mais elle reste faible : de l'ordre de 1 log. Cela signifie que, même si le signal correspondant à la sonde oxydée est proche de la saturation, la sonde réduite ne pourra être détectée que si le signal correspondant est au moins égal au dixième de celui de la sonde oxydée. Ainsi, comme la proportion basale de sonde réduite dans le cytoplasme est faible, cette méthode n'est probablement pas assez sensible pour détecter des variations faibles du niveau d'oxydation des thiols dans ce compartiment.

Pour pallier les limites de cette première approche, nous avons développé d'autres modèles cellulaires avec une stratégie où toutes les cellules exprimant la sonde expriment également le polypeptide d'intérêt. Pour que le niveau d'oxydation des sondes puisse être suivi en temps réel en microscopie à fluorescence plutôt que par western blot, nous avons choisi d'utiliser pour ces nouveaux modèles des sondes ratiométriques en excitation : la sonde HyPer, spécifique d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et la sonde Grx1-roGFP, spécifique du glutathion et ratiométrique. Ces deux sondes sont adressées soit au cytoplasme avec exclusion du noyau, soit aux mitochondries, soit au noyau.

#### 3.2.2. Modèles avec coexpression inductible des sondes avec PrP ou A $\beta_{1-40}$

#### 3.2.2.1. Stratégie de construction des vecteurs de coexpression

Pour éviter que des cellules ne puissent exprimer la sonde sans exprimer le polypeptide d'intérêt (A $\beta_{1-40}$  ou l'allèle VRQ de la PrP), nous avons construit de nouveaux vecteurs d'expression inductible (Figure 46A et B). Ces vecteurs codent à la fois la sonde et le polypeptide d'intérêt, séparés par la séquence P2A. Il s'agit d'une séquence virale, qui conduit à un « patinage » du ribosome au niveau de l'ARN messager, induisant la synthèse de deux protéines distinctes (Kim et al., 2011). Ainsi, dans notre cas, les cellules cotransfectées par le vecteur pCMV Tet3G et le vecteur pTRE3G contenant la séquence codant la construction sonde + P2A + polypeptide d'intérêt coexprimeront de façon inductible, d'une part la sonde, prolongée en C-terminal par la séquence GSGATNFSLLKQAGDVEENPG, et d'autre part A $\beta_{1-40}$  46C). Dans les deux cas, le polypeptide d'intérêt est précédé d'une proline, qui ne devrait pas changer sa séquence finale après maturation et clivage du peptide signal. Des lignées contrôles, n'exprimant que les sondes, sont également construites par introduction d'un codon STOP à la fin de la séquence 2A, de façon à ce que les mêmes 21 acides aminés soient ajoutés en C-ter des sondes de toutes les lignées.



Coexpression inductible des sondes avec  $A\beta_{1\text{-}40}$  ou PrP

### Figure 46 : Stratégie de coexpression inductible des protéines d'intérêt et des sondes Les cellules sont cotransfectées avec :

A : Le vecteur codant le transactivateur Tet 3G sous contrôle du promoteur CMV

B : Le vecteur codant, sous contrôle du promoteur TRE3G, la sonde et la protéine d'intérêt (Aβ<sub>1-40</sub> précédé du peptide signal de l'insuline ou PrP), séparées par une séquence 2A.

C : Cette stratégie permet une coexpression inductible de la sonde avec PrP ou A $\beta_{1-40}$ . Figure adaptée du manuel d'utilisation du système d'expression inductible Tet-On® des laboratoires ClonTech, ©2014 Clontech Laboratories, Inc., (nka Takara Bio USA, Inc.) et de (Kim et al., 2011) (CC BY 4.0)

AmpR : gène de résistance à l'ampicilline, KanR : gène de résistance à la kanamycine, NeoR : gène de résistance à la néomycine, P<sub>CMV IE</sub> : promoteur *immediate early* du cytomégalovirus, SMC : site multiple de clonage, SV40 : virus simien 40.

### 3.2.2.2. Contrôle par immunofluorescence de l'expression et de la localisation des polypeptides d'intérêt

Le niveau d'expression et la localisation des protéines d'intérêt sont contrôlés par

immunofluorescence pour toutes les lignées construites. La Figure 47 présente des images
représentatives de quatre de ces lignées. Ces images montrent que la localisation des sondes, de PrP et d'Aβ est cohérente : la sonde adressée au cytoplasme est bien diffuse avec exclusion du noyau (colonne 2, ligne 2), la sonde HyPer adressée aux mitochondries est ponctiforme (colonne 3, ligne 2) et la sonde adressée au noyau est superposable avec les noyaux (colonne 5, ligne 2). En revanche, la sonde Grx1-roGFP2 adressée aux mitochondries semble nucléocytoplasmique, avec des structures cytoplasmiques indiquées par des flèches orange qui pourraient correspondre à des agrégats de la protéine (colonne 4, ligne 2). Malgré plusieurs répétitions de cette transfection avec les trois vecteurs codant cette sonde (Grx1-roGFP2 mitochondries P2A STOP, Grx1-roGFP2 mitochondries P2A AB1-40 et Grx1roGFP2 P2A VRQ), ce type de localisation a été observé pour toutes les lignées obtenues, suggérant que l'adressage aux mitochondries de notre construction Grx1-roGFP2-MLS ne fonctionne pas dans la lignée RK13, bien que l'expression mitochondriale de ce type de construction ait été validée dans d'autres lignées de cellules de mammifères (Albrecht et al., 2014). Une piste potentielle pour l'expression de roGFP2 en fusion avec Grx1 dans les mitochondries pourrait être d'inverser l'ordre des protéines, en utilisant une construction roGFP2-Grx1-MLS. Cette construction peut être exprimée dans les mitochondries de lignées de cellules non mammifères, dans lesquelles l'adressage aux mitochondries de la construction Grx1-roGFP2-MLS ne fonctionne pas (Albrecht et al., 2014). Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons cependant choisi, par manque de temps, de nous concentrer sur le suivi du niveau d'oxydation des sondes exprimées dans le cytoplasme.

Concernant les polypeptides d'intérêt, le marquage de PrP est bien membranaire à la surface des cellules (colonnes 2 et 4, ligne 3), et on observe un marquage cytoplasmique et périnucléaire d'A<sub>β1-40</sub> malgré la présence du signal d'excrétion (colonne 5, ligne 3). Comme pour la lignée RK13-A<sub>β1-40</sub> (Igel Egalon, 2013), nous avons contrôlé la localisation principalement extracellulaire du peptide (3.2.2.3.2, p. 147). Le peptide visible par immunofluorescence dans les cellules pourait être en transit dans le système

monomembranaire interne, ou correspondre à une internalisation par les cellules d'une partie du peptide excrété.



**Figure 47 : Immunofluorescence de certaines des nouvelles lignées cellulaires** Les immunomarquages sont réalisés après 24 h d'induction de la synthèse des polypeptides d'intérêt. Les flèches orange indiquent de potentielles zones d'agrégation de la sonde Grx1roGFP2 adressée aux mitochondries. Les flèches blanches indiquent des cellules qui n'expriment ni la sonde, ni le polypeptide d'intérêt.

Ces images permettent en outre de valider la coupure au niveau de la séquence 2A, puisque les sondes et le polypeptide d'intérêt ne sont visiblement pas localisés dans les mêmes compartiments : par exemple, pour la lignée coexprimant A $\beta_{1-40}$  et Grx-roGFP adressée au noyau (Figure 47, colonne de droite), la sonde est localisée exclusivement dans le noyau et le marquage du peptide est périnucléaire, avec exclusion du noyau.

Enfin, même si le taux d'expression des protéines d'intérêt n'est pas de 100%, toutes les cellules exprimant une sonde expriment également le polypeptide d'intérêt et réciproquement. Cela nous assure que toutes les cellules dans lesquelles le stress oxydant peut être suivi grâce aux sondes expriment également le polypeptide d'intérêt. De plus, nous avons vérifié que la croissance et la morphologie des cellules étaient similaires en présence et en absence de doxycycline dans le milieu, et, d'autre part, que la proportion de cellules exprimant la sonde et le polypeptide d'intérêt restait stable au cours des premiers passages. Nous n'avons travaillé qu'avec des lignées cellulaires satisfaisant ces deux critères.

# 3.2.2.3. Contrôle de la maturation et quantification de l'expression des protéines d'intérêt par western blot

#### 3.2.2.3.1. Optimisation de la détection d'A<sub>β1-40</sub> par western blot

Pour contrôler par western blot l'excrétion du peptide  $A\beta_{1-40}$  et la coupure au niveau de la séquence P2A, il a été nécessaire d'optimiser le protocole de western blot anti A $\beta$  utilisé au laboratoire dans le but d'en augmenter la sensibilité. Dans cette optique, nous avons réalisé des western blots dans différentes conditions en utilisant la même gamme d'A $\beta_{1-40}$  monomérique commerciale.



## Figure 48 : Amélioration de la sensibilité d'un protocole de western blot anti-A $\beta$

A : Deux western blots sont réalisés simultanément avec le même protocole, avec transfert, soit sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF), soit sur une membrane de nitrocellulose. La porosité des deux membranes est de 0,2 µm. La sensibilité est meilleure avec la nitrocellulose qu'avec le PVDF.

B : Deux western blots sont réalisés simultanément avec le même protocole (avec transfert sur nitrocellulose), avec ou sans saturation avec du lait (C. Jas). La suppression de la saturation permet d'améliorer la sensibilité du western-blot.

Deux modifications du protocole ont permis une augmentation importante de la sensibilité des western blots : le remplacement de la membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) par une membrane de nitrocellulose de même porosité (Figure 48A) et l'élimination de la saturation par du lait (Figure 48B).

# 3.2.2.3.2. Contrôle par western blot de la coupure au niveau de la séquence P2A et de la maturation des polypeptides d'intérêt

Pour contrôler la coupure totale des constructions au niveau de la séquence 2A, des western blots sont réalisés sur des lysats de cellules après 24 heures d'induction (Figure 49). Le western blot anti-Aβ indique que le peptide produit par les cellules n'est pas monomérique : on observe des assemblages de 36 kDa environ, que ce soit dans les lysats cellulaires ou dans le milieu de culture (Figure 49A), alors que la masse moléculaire du peptide Aβ<sub>1-40</sub> monomérique est de 4 kDa. Cela avait déjà été observé pour la lignée de cellules RK13 exprimant de façon inductible le seul peptide Aβ<sub>1-40</sub> (Igel Egalon, 2013). La taille des assemblages produits par cette lignée cellulaire est présentée plus en détails dans la partie suivante. Ce western blot anti-PrP permet de valider la maturation de la protéine, puisque les trois bandes correspondant à la protéine di-, mono- et non glycosylée sont retrouvées (Figure 49B). Enfin, dans les deux cas, on n'observe aucune bande dont la taille corresponde à la fusion entre sonde, peptide 2A et polypeptide d'intérêt, ce qui montre que le peptide P2A est bien coupé.

De plus, nous avons contrôlé, d'une part, l'absence d'expression des polypeptides d'intérêt en absence de doxycycline (Figure 49C, piste 1), et, d'autre part, l'absence d'expression d'Aβ dans les lignées n'exprimant que la sonde, transfectées avec des vecteurs pTRE3G soude P2A STOP Aβ (Figure 49C, piste 2).



# Figure 49 : Détection par western blot des sondes, d'A $\beta$ et de PrP dans les modèles cellulaires

A : Des lysats et milieux de culture des cellules coexprimant les sondes et A $\beta_{1-40}$  sont analysés par western blot anti-A $\beta$  (membrane de gauche) et anti-GFP (membrane de droite).

B : Des lysats des cellules coexprimant les sondes et PrP sont analysés par western blot anti-PrP (membrane de gauche) et anti-GFP (membrane de droite). Les trois flèches sur la membrane de gauche indiquent, de haut en bas, les formes bi-, mono- et non glycosylées de la PrP. La bande visible à 50 kDa correspond probablement à un dimère de la protéine non glycosylée. Les astérisques sur la membrane de droite pourraient correspondre à des produits de dégradation de la sonde.

C : Des lysats de cellules coexprimant HyPer dans le cytoplasme et A $\beta$  avec et sans induction du peptide sont analysés par western blot anti-A $\beta$ , ainsi que le lysat d'une lignée de cellules n'exprimant que la sonde (avec introduction d'un codon STOP en aval du P2A).

HC0 : HyPer cytoplasme P2A STOP A $\beta_{1-40}$ , HCA : HyPer cytoplasme P2A A $\beta_{1-40}$ , HMA : HyPer mitochondries P2A A $\beta_{1-40}$ , HNA : HyPer noyau P2A A $\beta_{1-40}$ , GGCA : Grx1-roGFP2 cytoplasme P2A A $\beta_{1-40}$ , HCV : HyPer cytoplasme P2A VRQ, HMV : HyPer mitochondries P2A VRQ (deux lignées sont analysées), GGCV : Grx1-roGFP2 cytoplasme P2A VRQ, GGNV : Grx1-roGFP2 noyau P2A VRQ, PM : poids moléculaire.

#### 3.2.2.3.3. Taille des assemblages d'A $\beta_{1-40}$ produits par les cellules

Pour identifier la taille des assemblages d'A $\beta_{1-40}$  présents dans le milieu de culture des modèles cellulaires concernés, nous avons réalisé une chromatographie d'exclusion de taille sur un échantillon de milieu de culture de cellules coexprimant la sonde et A $\beta_{1-40}$ . Le peptide a été révélé par western blot dans les fractions correspondant à des volumes d'élution compris entre 8 et 20 mL (Figure 50A). La quantification de ce western blot donne une idée de la distribution de taille des assemblages du peptide dans le milieu. Cette expérience indique que les assemblages d'A $\beta$  produits sont de tailles hétérogènes, même si la dénaturation partielle par le tampon de Laemmli additionné d'urée conduit à la présence d'une unique bande sur les western blots. La majorité des assemblages a une taille comprise entre 30 et 70 kDa (Figure 50B).



# Figure 50 : Chromatographie d'exclusion de taille sur le milieu de culture de cellules exprimant $A\beta_{1\text{-}40}$

A : Western blot des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion de taille d'un échantillon de milieu de culture de la lignée coexprimant HyPer dans le cytoplasme et A $\beta_{1-40}$ après 72 heures d'induction de la synthèse du peptide et de la sonde. VE : volume d'élution. B : Distribution de la taille des assemblages d'A $\beta$  présents dans le milieu de culture des mêmes cellules, obtenue par quantification à partir du western blot présenté en A.

#### 3.2.2.3.4. Cinétique de l'expression des protéines d'intérêt après induction

Dans le but de caractériser la cinétique de l'expression des sondes après induction par la doxycycline pour pouvoir choisir un temps d'induction optimal pour les expériences de suivi du stress oxydant en temps réel, nous avons quantifié par western blot la sonde HyPer dans des lysats de cellules RK13 HyPer cytoplasme P2A A $\beta_{1-40}$  après des temps d'induction compris entre 0 et 72 heures (Figure 51). Bien que le manuel de l'utilisateur des systèmes Tet indique qu'une expression maximale de la protéine d'intérêt puisse être atteinte en 9 heures, nos données indiquent que ce plateau n'est pas atteint avant environ 72 heures d'induction de l'expression de la protéine d'intérêt dans nos modèles (Figure 51B). Nous avons choisi de réaliser les expériences de suivi des sondes en microscopie après un temps d'induction de 48 heures de façon à maximiser l'expression de la sonde et du polypeptide d'intérêt tout en conservant une densité de cellules suffisamment faible pour permettre un suivi individuel de chaque cellule, et pour que les cellules soient encore en phase de multiplication au moment des observations. En effet, une expression élevée de la sonde permet de maximiser la gamme dynamique des images acquises en microscopie à fluorescence tout en conservant des paramètres d'excitation suffisamment doux pour ne pas induire de phototoxicité détectable.



# Figure 51 : Cinétique de l'induction de la synthèse de HyPer dans la lignée HyPer cytoplasme P2A A $\beta$

A : Détection par western blot de la sonde et de la  $\beta$ -actine dans des lysats de cellules de la lignée coexprimant HyPer dans le cytoplasme et A $\beta_{1-40}$ . Les deux protéines sont détectées en multiplex sur la même membrane. Les deux canaux sont visualisés grâce à de fausses couleurs.

B : Quantification du rapport entre l'expression de la sonde et l'expression de la  $\beta$ -actine en fonction du temps d'induction. La quantification est réalisée à partir des images brutes du western blot (A) avec ImageJ.

## 3.2.2.3.5. Quantification d'A $\beta_{1-40}$ et PrP dans les lysats et les milieux cellulaires

Pour quantifier l'expression des polypeptides d'intérêt dans les lysats et les milieux cellulaires de façon à pouvoir les comparer avec celles qui ont été rapportées dans d'autres modèles de maladies neurodégénératives, des cellules sont cultivées pendant 48 h en présence de doxycycline, puis lysées avec une concentration de 1000 cellules.µL<sup>-1</sup>. Le polypeptide d'intérêt est détecté par western blot et quantifié grâce à une gamme de PrP ou d'Aβ recombinante (Figure 52).



Figure 52: Quantification de l'A $\beta_{1-40}$  et de la PrP exprimée par les cellules A : Western blot anti-A $\beta$  sur une gamme d'A $\beta_{1-40}$  commerciale et sur les lysats et milieu de cellules RK13 HyPer cytoplasme P2A A $\beta_{1-40}$ .

B : Western blot anti-PrP sur une gamme de VRQ recombinante et sur les lysats et milieu de cellules RK13 HyPer cytoplasme P2A PrP et RK13 Grx1-roGFP2 cytoplasme P2A VRQ. HCV : HyPer cyto NES P2A VRQ, GGCV : Grx1-roGFP2 cyto NES P2A VRQ.

La Table XV présente les quantités de polypeptides d'intérêt produites par cellule pour les trois lignées cellulaires analysées. Toutes les quantifications ont été réalisées à partir des western blots présentés par la Figure 52. Dans les conditions physiologiques normales, la concentration en PrP<sup>C</sup> du cerveau de hamster doré est d'environ 7,5 µg.g<sup>-1</sup> (Gregori et al., 2008). Etant donné que le cerveau du hamster pèse en moyenne 1,02 g et contient environ 166,12×10<sup>6</sup> cellules (Herculano-Houzel et al., 2006), on peut estimer la concentration Concentration massique×mcerveau PrP<sup>C</sup> par cellule dans le moyenne cerveau : en nb<sub>cellules</sub> 4,60×10<sup>-5</sup> ng.cellule<sup>-1</sup>. La concentration en PrP<sup>C</sup> produite par nos modèles est ainsi 13,6 à 24,1 fois plus élevée que dans des neurones de hamster sain. Concernant le peptide A<sub>β1-40</sub>, environ 69% du peptide produit par la lignée HyPer cytoplasme P2A Aβ<sub>1-40</sub> est sous forme extracellulaire. La concentration du peptide dans le milieu est estimée à 1,11 nM pour les expériences de suivi des sondes par microscopie, pour lesquelles 1000 cellules sont cultivées dans 2 mL de milieu pendant 48h. Cette concentration est plus de cinq fois supérieure à la concentration en A $\beta_{1-40}$  soluble rapportée dans le cerveau sain, qui est de 0,8 µg.g<sup>-1</sup> en moyenne (Lue et al., 1999), soit 0,201 nM, mais environ 12 fois inférieure à la concentration en A $\beta_{1-40}$  soluble rapportée dans le cerveau de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, qui s'élève en moyenne à 1,4 µg.g<sup>-1</sup> (Lue et al., 1999), soit 13,5 nM. La concentration en A $\beta_{1-40}$  dans le milieu de nos modèles cellulaires convient donc pour l'étude de la pathogénèse précoce de la maladie d'Alzheimer, qui correspond à une phase d'accumulation progressive du peptide A $\beta$  (Figure 18, p.62).

Table XV : Estimation des quantités de protéines produites par les lignées cellulaires

Lignée cellulaire	Quantité de polypeptide produit				
HyPer cytoplasme P2A VRQ	6,26×10 <sup>-4</sup> ng.cellule <sup>-1</sup>				
Grx1-roGFP2 cytoplasme P2A VRQ	11,1×10 <sup>-4</sup> ng.cellule <sup>-1</sup>				
	$4,33 \times 10^{-3}$ ng A $\beta_{1-40}$ intracellulaire.cellule <sup>-1</sup>				
Hyper cytopiasme PZA A $\beta_{1-40}$	$9,62 \times 10^{-3}$ ng A $\beta_{1-40}$ extracellulaire.cellule <sup>-1</sup>				

# 3.3. Optimisation des conditions d'acquisition en microscopie à fluorescence pour le suivi des sondes protéiques HyPer1 et Grx1-roGFP2

Avant d'utiliser nos modèles cellulaires pour comparer les effets rédox des différents assemblages de protéines, il a été nécessaire d'ajuster et d'harmoniser les protocoles expérimentaux utilisés pour suivre le niveau d'oxydation des sondes, en particulier les paramètres d'excitation des cellules, de façon à minimiser la phototoxicité de l'excitation et à maximiser la reproductibilité de nos expériences. Dans ce but, nous avons réalisé plusieurs fois une même expérience de suivi de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la sonde HyPer exprimée dans le cytoplasme de cellules de la lignée RK13, de façon à pouvoir évaluer l'homogénéité des résultats obtenus avec ces différents réplicats. Cette partie présente les optimisations expérimentales successives qui nous ont permis d'améliorer la reproductibilité de cette expérience de suivi de la réponse cellulaire à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.3.1. Principe de l'acquisition et de la quantification des données

Dans un premier temps, nous avons contrôlé le bon fonctionnement des sondes exprimées dans nos modèles cellulaires, en vérifiant que des traitements rédox exogènes conduisaient bien à un shift de leur spectre d'excitation *in cellulo*. La Figure 53 présente ainsi les spectres d'excitation de deux lignées cellulaires exprimant les sondes HyPer et Grx1-roGFP2 après différents traitements oxydants ou réducteurs. Pour HyPer1, les pics d'excitation se situent vers 420 nm pour la forme réduite et 500 nm pour la forme oxydée, avec un point isobestique vers 450 nm. Pour Grx1-roGFP2, les pics d'excitation se situent vers 488 nm pour la forme oxydée et 380 nm pour la forme oxydée, avec un point isobestique vers 420 nm. Ces valeurs correspondent à celles qui sont publiées pour les sondes purifiées ou exprimées dans d'autres lignées cellulaires (Belousov et al., 2006; Meyer and Dick, 2010).

Pour suivre le stress oxydant en temps réel dans ces modèles cellulaires, des acquisitions sont réalisées en time-lapse par microscopie à fluorescence. Les cellules sont imagées séquentiellement à deux longueurs d'ondes proches, soit des deux pics d'excitation, soit d'un pic d'excitation et du point isobestique, avec un très faible délai entre les deux images. Les paramètres d'excitation testés sont détaillés et discutés dans les paragraphes suivants.





A : Spectre d'excitation d'une suspension de cellules coexprimant HyPer1 dans le cytoplasme et A $\beta_{1-40}$ .

B : Spectre d'excitation d'une suspension de cellules coexprimant Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme et PrP.

Les spectres d'excitation des suspensions cellulaires sont acquis après un potentiel traitement de 5 minutes avec le réducteur dithiotréitol (DTT) ou l'oxydant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les longueurs d'onde observées pour les maxima d'excitation (flèches orange) et les points isobestiques (flèches violettes) sont conformes à celles publiées pour les sondes purifiées (Belousov et al. 2006 ; Hanson et al. 2004). La fin des spectres n'a pas pu être acquise car les longueurs d'onde d'excitation auraient chevauché les filtres d'émission. La fin théorique des spectres a donc été tracée en pointillés à partir des données de la littérature (Belousov et al., 2006; Hanson et al., 2004). La Figure 54 présente des images représentatives extraites d'une acquisition réalisée avec les cellules exprimant HyPer dans le cytoplasme, ainsi que le ratio de ces images (ratio <u>Acquisition au maximum d'excitation de la sonde oxydée</u> <u>Acquisition au maximum d'excitation de la sonde réduite</u>) après un traitement par 40 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



#### Figure 54 : Réponse à 40 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cellules exprimant la sonde HyPer

Des cellules exprimant la seule sonde HyPer dans le cytoplasme sont observées en microscopie à fluorescence. Deux acquisitions simultanées en time-lapse sont réalisées, en excitant les cellules à des longueurs d'onde proches des pics d'excitation de la forme oxydée de HyPer (ligne du haut) et de sa forme réduite (ligne du milieu). Le ratio des deux acquisitions est calculé et visualisé par de fausses couleurs, indiquées par les barres de calibration (à droite), graduées en niveaux de gris. Au cours de l'acquisition, les cellules sont traitées par 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les trois colonnes correspondent aux images obtenues 5 min avant le traitement (colonne de gauche), 3 min après le traitement (colonne du milieu) et 60 min après le traitement (colonne de droite).

L'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consécutive au traitement est associée à une augmentation de la fluorescence sur l'acquisition réalisée au pic d'excitation de la sonde oxydée (ligne du haut), accompagnée d'une diminution de l'intensité de fluorescence sur l'acquisition réalisée au pic d'excitation de la sonde réduite (ligne du milieu). Comme la sonde HyPer est ratiométrique, l'augmentation de l'intensité dans la cellule sur l'image du ratio entre ces deux canaux (ligne du bas) est indépendante des variations locales de la concentration de la sonde et, dans notre exemple, de la perte de la mise au point (Meyer and Dick, 2010) : c'est donc cette valeur de ratio qui doit être quantifiée en fonction du temps. Les intensités de fluorescence moyennes de chaque cellule sur les deux acquisitions sont également quantifiées à titre de contrôles.

Pour quantifier les intensités de fluorescence sur chacune des deux acquisitions ainsi que sur le ratio à l'intérieur de chaque cellule, nous avons adapté et automatisé un protocole établi par l'équipe du créateur de la sonde HyPer (Mishina et al., 2013b, 2013a). La méthode employée est décrite en détails dans l'article méthodologique (Lévy et al., 2020), reproduit en annexe, et son principe est présenté sur la Figure 55.

Quantification

Transfert du masque sur les deux images débruitées

Quantification de l'intensité de fluorescence moyenne

#### Acquisition

• 2 acquisitions en timelapse en utilisant des DEL proches des pics d'excitation.



# Figure 55 : Principe de la quantification du niveau d'oxydation des sondes en fonction du temps

Deux acquisitions en time-lapse sont réalisées, correspondant à la sonde réduite et à la sonde oxydée (à gauche, en haut). Les étapes suivantes sont illustrées avec des images extraites d'une expérience de suivi de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la sonde HyPer exprimée dans le cytoplasme. Chacune des deux acquisitions est débruitée par un éventuel filtrage, puis par la soustraction de la valeur moyenne du bruit de fond (à gauche, au milieu). Les cellules sont ensuite segmentées par seuillage sur les deux images débruitées, ce qui permet d'obtenir un masque qui prend en compte les déplacements et variations morphologiques de la cellule en fonction du temps (à gauche, en bas). L'intensité de fluorescence à l'intérieur de la cellule ainsi délimitée est quantifiée sur chacune des deux acquisitions et sur l'image du ratio (à droite, en haut). Ces trois variables peuvent être tracées en fonction du temps (à droite, en bas). Après une étape de débruitage des images, les deux acquisitions sont seuillées et sommées pour obtenir une image binaire dont les pixels blancs correspondent à la cellule et les pixels noirs au fond. Cette opération est répétée sur chaque image de la pile d'images, ce qui permet de segmenter la cellule en tenant compte de ses mouvements et de ses changements de morphologie en fonction du temps. L'intensité est ensuite quantifiée à l'intérieur de la cellule sur chacune des deux acquisitions et sur le ratio.

#### 3.3.2. Optimisation des conditions d'acquisition et de culture cellulaire

Les premières expériences de microscopie à fluorescence en temps réel menées avec des cellules exprimant les sondes HyPer ont donné des résultats très hétérogènes, présentés dans le premier paragraphe de cette partie (3.3.2.1). Les deux paragraphes suivants présentent donc les améliorations et standardisations successives mises en place dans le but d'améliorer la qualité des images obtenues et la reproductibilité des expériences, et qui ont abouti au protocole utilisé pour les expériences présentées dans les parties suivantes.

#### 3.3.2.1. Des premiers résultats très hétérogènes

Les premières expériences de suivi en temps réel du niveau d'oxydation des sondes sont réalisées avec un microscope confocal équipé de lasers 405 nm et 488 nm utilisés pour exciter respectivement les formes réduite et oxydée de HyPer, et les formes oxydée et réduite de Grx-roGFP. Pour ces expériences, des boîtes à fond en verre sont ensemencées avec 5000 cellules.cm<sup>-2</sup> la veille du suivi par microscopie. Après adhésion des cellules, le milieu est remplacé par du milieu à 2% de sérum contenant de la doxycycline pour induire la synthèse de la sonde et du polypeptide d'intérêt, pour une durée de  $24\pm6$  heures. Cette durée avait été choisie sur la base du manuel d'utilisation des systèmes Tet, qui indique que le plateau de synthèse de la protéine d'intérêt est atteint dès neuf heures, mais nous avons montré par la suite que l'expression des sondes au bout de 24 heures d'induction était relativement faible dans les modèles que nous avons construits (Figure 51, p. 150), ce qui contribue au faible rapport  $\frac{signal}{bruit}$  des images acquises dans ces conditions. Les cellules sont ensuite observées en time-lapse, et traitées par 0 ou 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après quelques minutes d'acquisition. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est dilué au dernier moment à partir d'une solution stock concentrée et on ajoute directement 100 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué sur les 2 mL de milieu de culture. La Figure 56A présente de façon schématique l'expérience réalisée, et la Figure 56B présente les courbes de ratio obtenues avec la lignée coexprimant HyPer dans le cytoplasme avec PrP en réponse à 0 ou 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chaque courbe correspond aux variations de ratio d'une cellule au cours du temps.





B : Variation du ratio de HyPer dans la lignée de cellules coexprimant HyPer dans le cytoplasme avec PrP en réponse à 0 ou 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les conditions résumées en A.

Les courbes de ratio obtenues pour les cellules non traitées (Figure 56B, graphe du haut) sont stables ou légèrement croissantes. Cette augmentation du ratio indique une augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui pourrait être due à une légère phototoxocité induite par l'excitation par les lasers. Les variations de ratio quantifiées en réponse à 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont extrêmement hétérogènes et les courbes sont très bruitées (courbes du bas) : certaines cellules ont une réponse immédiate à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, caractérisée par une augmentation du ratio suivie d'une diminution et, éventuellement, d'une deuxième augmentation, tandis que d'autres cellules ont une réponse très tardive, voire absente, à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le fait que les courbes de ratio soient bruitées peut s'expliquer par les intensités de fluorescence relativement faibles des cellules, dues d'une part aux faibles puissances laser utilisées dans ces expériences pour limiter la phototoxicité et d'autre part au temps d'induction court devant la cinétique de synthèse de la sonde en réponse à la doxycycline (voir Figure 51, p. 150).

L'hétérogénéité des courbes peut avoir plusieurs causes. D'une part, certaines courbes demeurent constantes après l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces courbes pourraient correspondre à des cellules qui n'expriment pas la sonde. En effet, des expériences ultérieures ont montré que les cellules RK13 n'exprimant pas la sonde présentaient une très forte autofluorescence sur des images acquises dans les mêmes conditions que pour les expériences de suivi de HyPer, et le taux d'expression de la sonde dans la lignée utilisée n'est pas de 100% (voir Figure 47, p.145). Pour pallier ce problème, nous avons modifié les conditions expérimentales de façon à augmenter le rapport  $\frac{\text{signal}}{\text{bruit}}$  comme décrit dans les paragraphes suivants, de façon à ce que l'autofluorescence des cellules soit négligeable devant la fluorescence spécifique de la sonde. D'autre part, même si la culture des cellules dans un milieu pauvre en sérum est couramment utilisée dans des expériences visant à étudier l'effet de traitement oxydants pour éviter que le traitement n'oxyde les protéines contenues dans le sérum, diminuant ainsi son pouvoir oxydant (Banach-latapy et al., 2013; Wang et al., 2004), cette privation de sérum n'est pas anodine. Dans des neurones granulaires de cervelet primocultivés, la diminution de la proportion de sérum dans le milieu de culture conduit à des dysfonctionnement mitochondriaux visibles en 6 à 8 heures, qui aboutissent à un stress oxydant conduisant à l'apoptose des cellules en 24 à 48 heures (Atabay et al., 1996). Même en absence de mort cellulaire détectable, on peut ainsi imaginer que la privation en sérum conduise à des dysfonctionnements mitochondriaux dans les cellules RK13, induisant un stress oxydant cellulaire chronique qui pourrait altérer les systèmes antioxydants cellulaires et ainsi être responsable des réponses aberrantes à H2O2 observées. Le fait que les cellules d'un même champ puissent avoir des sensibilités différentes à cette privation en sérum, conduisant à une hétérogénéité des réponses des cellules d'un même réplicat, pourrait être dû à une densité cellulaire trop importante : nos expériences ultérieures ont en effet montré une homogénéité supérieure avec des densités cellulaires environ 15 fois plus faibles, comme discuté dans le paragraphe 3.3.2.3. De plus, le temps de culture en milieu pauvre en sérum est variable (18 à 30 heures), ce qui pourrait partiellement expliquer l'hétérogénéité des courbes observées entre les différents réplicats.

#### 3.3.2.2. Amélioration du rapport signal/bruit des images

Pour améliorer le rapport  $\frac{\text{signal}}{\text{bruit}}$  des images, la synthèse de la sonde a été induite pendant 48 heures au lieu de 24, ce qui permet d'augmenter la quantité de sonde dans chaque cellule, et donc le signal. Le microscope confocal a été remplacé par un microscope plein champ équipé de DEL permettant d'exciter à 423 et 469 nm les formes réduite et oxydée de la sonde. Cela présente plusieurs avantages. D'une part, la sonde réduite est ainsi exitée à une longueur d'onde plus proche de son pic d'excitation (420 nm) que lors d'une excitation à 405 nm avec un laser, et donc d'augmenter le signal. D'autre part, le fait d'utiliser une longueur d'onde plus élevée permet de diminuer la phototoxicité. En outre, l'utilisation d'un microscope plein champ permet d'obtenir une image correspondant à la totalité de l'épaisseur de la cellule plutôt qu'à un plan, ce qui, dans notre cas, est un avantage, puisque cela permet d'obtenir un signal moyen sur l'épaisseur de la cellule. De plus, les légères pertes de mise au point qui peuvent se produire au cours de l'acquisition sont moins perceptibles avec un microscope plein champ qu'avec un microscope confocal. Le temps d'exposition et la puissance des DEL sont fixées de façon à obtenir des intensités de fluorescences initiales similaires pour les deux canaux et supérieures dans la mesure du possible à 1500 niveaux de gris (Mishina et al., 2013a). Avec ces paramètres d'excitation, aucune autofluorescence n'est détectable pour les cellules n'exprimant pas les sondes. Les conditions de culture cellulaire sont également standardisées par l'homogénéisation des temps d'induction (48±3 heures) et le maintien des cellules dans un milieu riche en sérum. Ce nouveau protocole est schématisé par la Figure 57A. La Figure 57B montre des courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la sonde HyPer caractéristiques obtenues avec ces nouvelles conditions.

159



# Figure 57 : Résultats des optimisations expérimentales visant à améliorer le rapport signal/bruit des images

A : Schéma des expériences réalisées. Des boîtes de pétri sont ensemencées avec 5000 cellules.cm<sup>-2</sup>. La synthèse de la sonde est induite pendant 48 heures dans du milieu à 10% de SVF. Les cellules sont observées avec un microscope plein champ. Après cinq minutes d'acquisition, de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajoutée sur les cellules (100 µL dans les 2 mL de milieu).

B : Variation du ratio de HyPer dans la lignée de cellules coexprimant HyPer dans le cytoplasme avec PrP en réponse à 0 ou 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les conditions résumées en A. Un panel de courbes représentatives est extrait de l'ensemble des résultats.

Les courbes de réponse à 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restent constantes : la légère augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observée pour les expériences en microscopie confocale n'est pas retrouvée, ce qui confirme que les nouveaux paramètres d'excitation sont moins toxiques pour les cellules. Les courbes de réponse à 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> paraissent moins bruitées, et le ratio de la sonde augmente pour toutes les cellules exposées à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, même si cette augmentation ne se produit dans certains cas que quelques minutes après l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Toutefois, les réponses des cellules à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restent très hétérogènes dans ces conditions, avec des courbes d'allures différentes : suite à l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, toutes les courbes sont dans un premier temps croissantes, avec une pente très élevée, puis décroissantes, avec une pente plus faible. Certaines courbes présentent ensuite une deuxième augmentation rapide du ratio, suivie ou non d'une diminution, tandis que d'autres courbes restent décroissantes pendant la durée de l'observation. Nous avons donc poursuivi nos efforts dans le but d'améliorer la reproductibilité de nos expériences.

#### 3.3.2.3. Amélioration de la reproductibilité des expériences

Pour que nos expériences permettent de tirer des conclusions quant à l'effet rédox de nos polypeptides d'intérêt, elles doivent être reproductibles. Cette partie présente ainsi les améliorations expérimentales nous ayant permis de diminuer drastiquement la variabilité des résultats.

Nous avons réalisé des expériences avec différentes densités cellulaires dans le but de sélectionner la densité cellulaire donnant les résultats les plus homogènes. Pour ces nouvelles expériences, nous avons utilisé les protocoles décrits au paragraphe précédent (3.3.2.2, p. 159), mais en diluant davantage l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant le traitement, de façon à ce que le volume d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté sur les cellules soit de 1 mL, pour 2 mL de milieu de culture (contre 100 µL précédemment). Cet ajustement a pour objectif de garantir une diffusion rapide du traitement oxydant dans le milieu de culture, et a permis d'obtenir des augmentations du ratio suite au traitement simultanées pour toutes les cellules.

Ce sont les cellules confluentes (ensemencées à 32000 cellules.cm<sup>-2</sup>) qui présentent les réponses à 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> les plus hétérogènes d'une cellule à l'autre : même si la confluence des cellules rend la quantification des ratios de fluorescence difficile à réaliser de manière individuelle, la simple observation des images permet de voir que, sur un même champ, certaines cellules répondent fortement au traitement, tandis que d'autres conservent un ratio guasiment constant au cours du temps (Figure 58). Pour ces dernières cellules, on peut avancer l'hypothèse que la confluence protège les cellules contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Par exemple, dans la lignée Caco-2, l'activité des glutathion réductases et des catalases est plus importante quand les cellules sont confluentes (Duthie and Collins, 1997). L'hétérogénéité des réponses observées peut être due à l'hétérogénéité de densité cellulaire locale : il a été montré avec la lignée de cellules épithéliales de rein de chien MDCK que, même dans une population de cellules globalement confluentes, des cellules dont les divisions sont complètement arrêtées par inhibition de contact coexistent avec des cellules motiles et en division (Puliafito et al., 2012). On peut ainsi supposer que la désynchronisation du cycle cellulaire d'une cellule à l'autre soit responsable de la forte hétérogénéité des réponses à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observées dans une population de cellules confluentes.



Ratio des images correspondant aux pics d'excitation de la sonde oxydée et de la sonde réduite

Figure 58 : Réponse à 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cellules confluentes exprimant la sonde HyPer Des cellules coexprimant la sonde HyPer dans le cytoplasme et PrP sont ensemencées à une densité de 32000 cellules.cm<sup>-2</sup> 48h avant les observations. Deux acquisitions simultanées en time-lapse sont réalisées avec un microscope plein champ, en excitant les cellules à des longueurs d'onde proches des pics d'excitation de la forme oxydée de HyPer (ligne du haut) et de sa forme réduite (ligne du milieu). Le ratio des deux acquisitions est calculé et visualisé par de fausses couleurs, indiquées par les barres de calibration (à droite), graduées en niveaux de gris. Au cours de l'acquisition, les cellules sont traitées par 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les trois colonnes correspondent aux images obtenues 5 min avant le traitement (colonne de gauche), 3 min après le traitement (colonne du milieu) et 60 min après le traitement (colonne de droite).

A l'inverse, ce sont les cellules ensemencées à la densité cellulaire la plus faible (320 cellules.cm<sup>-2</sup>) qui présentent des ratios de fluorescence les plus homogènes. Ainsi, les réponses à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont toutes une allure similaire : une augmentation rapide du ratio aussitôt après l'ajout, suivie d'une diminution rapide dans un premier temps, puis plus lente (Figure 59C). De plus, l'augmentation du ratio suite au traitement est guasiment immédiate et simultanée pour les cellules, ce qui peut être dû au fait que, pour ces expériences, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été dilué dans un plus grand volume de milieu avant d'être ajouté sur les cellules, assurant une homogénéisation plus rapide de l'oxydant dans le milieu de culture (Dickinson et al., 2013). Ce type de courbes est retrouvé pour des traitements par 10 et 40 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réalisés dans les mêmes conditions. Par comparaison à l'hétérogénéité des résultats obtenus pour les cellules confluentes, la reproductibilité des résultats obtenus avec des cellules ensemencées à une très faible densité pourrait être due à un stade de prolifération plus homogène entre cellules, mais nous n'avons pas trouvé de données étayant cette hypothèse dans la littérature. Même si la raison de cette meilleure reproductibilité suite à la diminution de la densité cellulaire reste conjecturale, nous avons conservé cette faible densité cellulaire pour les autres expériences.



**Figure 59 : Réponse de la sonde HyPer à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une très faible densité cellulaire** A : Schéma des expériences réalisées. Des boîtes de pétri sont ensemencées avec 320 cellules.cm<sup>-2</sup>. Après adhésion des cellules, leur milieu est remplacé par du milieu contenant la doxycycline, sans modification de la concentration en sérum. La synthèse de la sonde est ainsi induite pendant 48 heures. Les cellules sont observées avec un microscope plein champ. Après cinq minutes d'acquisition, de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajoutée sur les cellules (1 mL dans les 2 mL de milieu).

B : Variation du ratio de HyPer dans la lignée de cellules coexprimant HyPer dans le cytoplasme avec PrP en réponse à 0 ou 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les conditions résumées en A.

Des ajustements expérimentaux successifs ont donc permis d'améliorer sensiblement la reproductibilité des expériences de suivi du ratio de la sonde HyPer en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces optimisations sont résumées par la Table XVI. Les résultats de suivi des sondes rédox présentés dans la suite de ce manuscrit ont tous été obtenus dans les conditions expérimentales ainsi optimisées. Table XVI : Ajustement des paramètres d'acquisition pour minimiser la variabilitéSources de variabilitéAiustements

Conditions de culture cellulaire variable d'une boîte à l'autre	<ul> <li>Culture des cellules uniquement en milieu à 10% de SVF</li> <li>Standardisation du temps d'induction</li> <li>Faible nombre de passages</li> </ul>
Forte phototoxicité Fort bruit électronique avec le mi- croscope confocal	<ul> <li>Excitation par des DEL plutôt que des lasers</li> <li>Utilisation d'un microscope plein champ</li> </ul>
Segmentation délicate Stade de croissance de la culture	- Très faible densité (≈ 320 cellules.cm <sup>-2</sup> )
Faible intensité de fluorescence	<ul> <li>Augmentation du temps d'induction</li> <li>Binning additif 2×2 post acquisition</li> </ul>
Mauvaise homogénéisation du traitement rédox dans le milieu de culture	<ul> <li>Augmentation du volume total de traite- ment pour une meilleure homogénéisation avec le milieu</li> </ul>

# 3.4. Nouveaux outils pour l'analyse d'image et l'analyse statistique des résultats obtenus

#### 3.4.1. Vue d'ensemble des outils mis en place

Les expériences de suivi des sondes par microscopie à fluorescence génèrent un grand nombre d'images dont il faut extraire puis analyser des données quantitatives de manière reproductible. Dans ce but, nous avons automatisé par une macro un protocole d'analyse d'images adapté d'une méthode publiée par l'équipe des créateurs de la sonde HyPer (Mishina et al., 2013b, 2013a), permettant de quantifier les données de ratio à partir des images de manière plus rapide, tout en conservant sa reproductibilité. Les données obtenues sont fonctionnelles : elles correspondent à des courbes de ratio en fonction du temps. Pour pouvoir comparer les groupes de courbes obtenues dans les différentes conditions expérimentales, nous avons fait le choix de décrire chaque courbe grâce à un petit nombre de paramètres permettant de rendre compte, soit des points clés de chaque courbe, soit de son allure globale. Les médianes des valeurs obtenues pour ces paramètres dans les différentes conditions expérimentales peuvent être comparées grâce à l'utilisation d'un test statistique approprié. Ces outils, résumés par la Figure 60, sont publiés dans un article reproduit cidessous (Lévy et al., 2020), dont les points clés sont ici présentés en français. Les scripts sont disponibles en ligne : <u>https://github.com/EliseLevy/PiQSARS</u>.



#### Figure 60 : Développement et implémentations de nouveaux outils

Les images brutes sont analysées par une procédure en deux étapes, représentée dans le rectangle gris. La macro FIJI extrait les données quantitatives des images, tandis que les scripts R et MATLAB permettent de réaliser l'analyse statistique des données. Adapté de (Lévy et al., 2020) (CC-BY-ND).

Pour valider ces nouvelles méthodes d'analyse, nous nous sommes basés sur une expérience simple : des cellules exprimant la sonde HyPer dans le cytoplasme sont imagées en time-lapse, et traitées au bout de 5 minutes d'acquisition par 0, 10, 40 ou 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les courbes de ratio obtenues sont présentées par la Figure 61. Ces résultats démontrent qu'il est possible de suivre grâce à la sonde HyPer les variations de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytoplasme de nos modèles RK13 suite à des traitements par des concentrations modérées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





Nous avons fait le choix de décrire les courbes par les paramètres représentés graphiquement par la Figure 62A, qui rendent compte de points précis de chaque courbe, et par le score sur le premier mode de variation (ou score sur la première harmonique), qui permet de décrire globalement l'allure de la courbe, comme détaillé dans la section Matériels et méthodes. Les paramètres représentés en violet n'ont pas de sens pour les courbes de réponse à 0 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui sont plates, tandis que les paramètres en bleu peuvent être calculés pour tout type de courbe.





L'analyse de chaque paramètre en fonction de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisée permet de montrer que, pour les cellules traitées par 0 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le ratio final, le ratio maximal et le score sur le mode de variation principal sont les plus faibles. Pour les cellules traitées par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on observe que l'augmentation du ratio est plus lente que pour les cellules traitées par 40 et 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avec des valeurs plus élevées pour les différents temps 166 caratéristiques et une pente plus faible au point d'inflexion. Le ratio est également plus faible, que ce soit au niveau du point d'inflexion, du maximum, ou de la fin des courbes, et le score sur le premier mode de variation est plus faible également que pour les cellules traitées par 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cela montre que les paramètres choisis sont efficaces pour différencier les courbes obtenues en fonction du traitement oxydant exogène utilisé. On n'observe globalement pas de différence entre les paramètres calculés pour les cellules exposées à 40 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui pourrait être dû à une saturation de la sonde HyPer.

Nos résultats indiquent enfin que les temps d'apparition du point d'inflexion et du ratio maximal doivent être considérés avec précaution, car le pas de temps avec lequel les acquisitions en time-lapse sont réalisées est relativement élevé (30 secondes) de façon à limiter la phototoxicité de l'excitation des cellules, ce qui rend le calcul de ces temps carac-téristiques imprécis.

### 3.4.2. Article méthodologique publié dans le journal MethodsX



# PiQSARS: A pipeline for quantitative and statistical analyses of ratiometric fluorescent biosensors



Elise Lévy<sup>a, c</sup>, Florence Jaffrézic<sup>b</sup>, Denis Laloë<sup>b</sup>, Human Rezaei<sup>a</sup>, Meng-Er Huang<sup>c</sup>, Vincent Béringue<sup>a</sup>, Davy Martin<sup>a,</sup> \*, Laurence Vernis<sup>c</sup>, \*

<sup>a</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, VIM, 78350 Jouy-en-Josas, France <sup>b</sup> Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France
<sup>c</sup> Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France

#### Abstract

Genetically encoded ratiometric fluorescent probes are cutting-edge tools in biology. They allow precise and dynamic measurement of various physiological parameters within cell compartments. Because data extraction and analysis are time consuming and may lead to inconsistencies between results, we describe here a standardized pipeline for

- Semi-automated treatment of time-lapse fluorescence microscopy images.
- Quantification of individual cell signal.
- Statistical analysis of the data.

First, a dedicated macro was developed using the FIJI software to reproducibly quantify the fluorescence ratio as a function of time. Raw data are then exported and analyzed using R and MATLAB softwares. Calculation and statistical analysis of selected graphic parameters are performed. In addition, a functional principal component analysis

allows summarizing the dataset. Finally, a principal component analysis is performed to check consistency and final analysis is presented as a visual diagram. The method is adapted to any ratiometric fluorescent probe. As an example, the analysis of the cytoplasmic HyPer probe in response to an acute cell treatment with increasing amounts of hydrogen peroxide is shown. In conclusion, the pipeline allows to save time and analyze a larger amount of samples while reducing manual interventions and consequently increasing the robustness of the analysis.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND licenses (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Corresponding authors.
 E-mail addresses: davy.martin@inrae.fr (D. Martin), laurence.vernis@cnrs.fr (L. Vernis).

https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101034 2215-0161/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) articleinfo*Method name*: PiQSARS *Keywords*: Ratiometric fluorescent probes, Automated image analysis, Biostatistics, Data analysis pipeline, Oxidative stress *Article history*: Received 22 May 2020; Accepted 12 August 2020; Available online 26 August 2020

#### Specifications table

Subject Area More specific subject area Method name Name and reference of original method Resource availability Bioinformatics Quantitative and statistical analyses of data from ratiometric fluorescent biosensors PiQSARS Not applicable https://fiji.sc/ https://rstudio.com/ https://uk.mathworks.com/products/matlab.html Macro and scripts are provided as separate documents as supplementary materials

#### Method details

#### Introduction and general background information

Since their discovery, fluorescent probes have been engineered to accurately monitor and quantify in real-time an increasing variety of physiological parameters in living cells such as ion concentration variations [1], cysteines [2], pH[3], enzymatic activity [4] or oxidative stress [5–8], but also various cellular compounds [9–12]. Genetically-encoded fluorescent proteins are of particular interest as they can be addressed to specific organelles, such as the nucleus or the mitochondria, allowing a subcellular resolution [13, 14]. For some probes, the readout is a simple change in their fluorescence intensity, whereas others show a shift in their excitation or emission spectrum. These latter are the most reliable since their spectral shift is independent of the illumination intensity, the probe concentration or photobleaching [15–18]. To record a cell parameter in real time with these probes, either simultaneous excitation at two different wavelengths or simultaneous signal recovery at two emission wavelengths is performed depending if the shift deals with the excitation or the emission spectrum. The ratio of both signals is then calculated, which is independent of the probe local concentration. These probes are thus called ratiometric.

Image acquisition with ratiometric probes generates a tremendous amount of data. Data processing and analysis are laborious, yet crucial for a reproducible and efficient exploitation of these biological tools. Macros, like FluoQ[19] and softwares, like Friker's one [18] are available for analysis of multidimensional images. Fricker's software, for example, enables to quantify ratio data from 4D- images (x,y,z,t) with up to 5 fluorescence channels in a single analysis round [18]. However, this software is rather dedicated to optical sections of entire plants or fungi and does not perform individual cell segmentation. In the same way, the FluoQ macro allows the rapid processing of large quantities of images, but the cells are segmented on a t-projection of the timelapse, which is efficient only for cells with no or little mobility [19]. Consequently, both tools do not allow easy tracking of individual moving mammalian cells in culture. To circumvent this drawback, we developed a complementary approach that considers morphological changes and movements of individual cells over time during image acquisition, in response to an exogenous stimulus. Derived from Belousov's methods related to a redox ratiometric probe [20, 21], we developed an automated FIJI-encoded, user-friendly macro that preprocesses and quantifies data from any ratiometric probe. Secondly, we developed a set of tools for statistical analyses of the generated data using R software. This method paper describes this pipeline step-by-step, as summarized in Fig. 1.

As a proof-of-concept, we used time-lapse data collected from cells treated with varying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and expressing the ratiometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-specific HyPer probe, which is routinely used in our laboratory [22, 23]. HyPer is a widely used, genetically encoded fluorescent redox biosensor based



Fig. 1. Schematic diagram of the analysis pipeline. Starting from raw images, a two-step analysis procedure is shown within the gray rectangle. The FIJI macro extracts quantitative data from images, while R and MATLAB scripts perform and display data statistical analysis.

Table I

Theoretical fluorescence peaks of HyPer and possible experimental setups for fluorescence microscopy acquisition. Theoretical maxima are compiled from our observations and from Meyer and Dick [17].

		Theoretical maxima	Possible setups
Excitation	Oxidized probe	500 nm	488 nm laser 469 nm LED 511 nm LED
	Reduced probe	420 nm	405 nm laser 423 nm LED
Emission	Oxidized and reduced probe	516 nm	> 500 nm

on the Yellow Fluorescent Protein (YFP). It senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration variations within living cells allowing oxidative stress monitoring [24]. Of note, other YFP-derived or GFP-derived probes may also be used, such as roGFP2 [17]. The reliability and robustness of our method is discussed.

### Experimental setup

Cell line and performed experiments

We stably expressed nucleus-excluded cytoplasmic HyPer under the control of a doxycycline- inducible promoter in rabbit kidney epithelial cells (RK13 cell line [25]). HyPer fluorescence was monitored for 65 min and 0, 10, 40 or 75  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to the cells 5 min after beginning the acquisition. Each field contained 3 to 6 cells, and each experiment was repeated 3 times. Between 10 and 20 curves for each H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration tested were thus obtained.

## Cell culture

Before time-lapse acquisitions, cells were plated in glass-bottom dishes using a weakly fluorescent red phenol-free culture medium. Cell density must be low  $(300 - 500 \text{ cells.cm}^{-2})$  for easier single cell analysis.

## **Cell** imaging

- 1. Perform acquisition at each excitation peak of your probe of interest. Table 1 provides the theoretical values of the excitation wavelengths for HyPer, as well as possible experimental acquisition setups.
- 2. Set acquisition parameters so that cells are bright enough to ensure a satisfactory dynamic range without any noticeable phototoxicity. The image dynamic is satisfactory when it reaches at least



Fig. 2. Image formating, macro opening and editing. A: The image is a 2-channel stack containing as many frames as time points (here: 131). B: Screenshot of the menu to open the macro. C: Screenshot of FIJI macro editor. The language "IJ1 Macro" has to be selected to edit or run the macro.

half of the maximum dynamic range (*i.e.* 2048 gray levels for a 12-bit image). Dynamic can be improved by post acquisition additive binning using the provided macro (see Step 2: image processing).

3. With HyPer, perform excitation near 420 nm first for each frame, as this reverses photo-conversion that occurs when exciting the probe at 500 nm [20].

- 4. Acquisition parameters optimization was based on previous work [20]. Initial fluorescence intensities in both channels must be similar and the ratio curve of cells exposed to  $0 \mu M H_2 O_2$  has to remain flat.
- 5. Save or format the acquired image as a 2-channel stack. Channel 1 must correspond to the near- 420-nm acquisition and channel 2 to the near-500-nm acquisition. (Fig. 2 A).
- 6. For quantification, images must not be compressed and a high dynamic range (at least 12 bits) is preferable. Any image format supported by FIJI is acceptable, such as tiff or czi.

Required softwares for image quantification and data analysis

**FIJI or ImageJ**: Use either ImageJ (imagej.nih.gov/) or FIJI (https://fiji.sc/) to run the macro. **R and MATLAB:** Most of statistical analyses are performed using R (cran.r-project.org) through the Rstudio interface (https://rstudio.com/). Parameters calculation is performed using MATLAB (https://uk.mathworks.com/products/matlab.html), but free analysis softwares like Scilab (https://www.scilab.

org/) or spreadsheet programs like LibreOffice Calc can also be used.

Further details regarding softwares are described in the Materials and Methods section.

#### Data extraction from raw acquired images

We developed a macro, based on the image analysis protocol established by the creators of the HyPer probe [20, 21]. Briefly, the raw 2-channel image is split into two images (STEP 1), which are then processed to improve their signal-to-noise ratio as well as dynamic range (STEP 2). The ratio of the two denoised images is then calculated. For each single cell, a rectangle containing the cell on each slice is duplicated on each image (STEP 3). The cell is then segmented, and both fluorescence intensities are quantified within the cell for each time step, as well as ratio values (STEP 4). The macro eventually exports (i) a summary table containing the time values in minutes and the fluorescence intensities for each analyzed cell and (ii) a report including all the choices made by the user (STEP 5).



Fig. 3. Importing images and choosing the export folder using the macro. Dialog boxes enable the user to choose the folder for saving the control data (A) and to open the raw image (B). If the Bio-Format importer is used, there is no need for further action (B). The image is automatically split into two channels, which are renamed "C1.tif" and "C2.tif". They are displayed using the HiLo LUT (C).

At every step, the macro saves regions of interest (ROIs) and/or intermediates images. These files are referred as "control data" in the following text.

#### STEP 0: Macro installation

- 1. Download a recent version of FIJI or ImageJ software.
- 2. Save the provided macro in the file of your choice.
- 3. Open the macro using the Macros  $\rightarrow$  Edit menu and select the IJ1 macro Language (Fig. 2 B).

Alternatively, the macro can simply be run using the Macros  $\rightarrow$  Run... menu.

4. If desired, edit the macro parameters. Then launch it by clicking run (Fig. 2 C).

STEP 1: Image import and working folder selection

- 1. Click "OK" on the 1<sup>st</sup> dialog box and choose the folder to save the control data (ROIs positions, intermediates images...), later referred as "working folder" (Fig. 3 A).
- 2. Click "OK" on the 2<sup>nd</sup> dialog box and open the image to analyze. If the bioformat importer is used, choose "view stack with Hyperstack" and do not tick any box (Fig. 3 B). The image is automatically split by the macro into two channels, which are renamed "C1.tif" and "C2.tif" respectively. Both images are automatically displayed using the HiLo LUT to easily visualize the zero and saturated pixels (colored in blue and red respectively) (Fig. 3 C).

#### STEP 2: Image processing

Image processing is a crucial step as it improves image quality and signal-to-noise ratio, and makes cell segmentation easier.

- Observe the images and decide whether or not to use additive binning before clicking "OK" on the dialog box (Fig. 4A). The analyse → Histogram menu enables to check the dynamic range. Additive binning increases the signal dynamic range but decreases resolution (Figure S1).
- 2. Select the desired image processing options (Fig. 4B):
  - Ratio to be calculated: for instance, choose  $\frac{C2}{C1}$  for a HyPer-based probe.
  - Post-acquisition additive 2 × 2 binning: useful to improve signal dynamic range for low- fluorescence cells with sufficient resolution (Figure S1). If this box is checked, both binned images are saved in the working folder as C1\_binning.tif and C2\_binning.tif.
  - Background subtraction (recommended): subtraction of the mean gray value of a cell- devoid rectangle from the gray value of each pixel (on the binned images, if so) on the corresponding slice.
     Background mean gray values as a function of slice number are saved in the working folder as C1\_background.csv and C2\_background.csv, as well as the images from which the background noise has been subtracted (as C1\_background\_substraction.tif



Fig. 4. Image processing options. A: Before clicking OK on the 1 <sup>st</sup> dialog box, the user is free to check image dynamics and resolution to decide whether using binning or not. B: A dialog box enables to choose among several options of image processing. C: To subtract background, the user defines a background-containing rectangle on the channel of his choice. D: The quantification will be performed on denoised images. Potentially blurred images are used for cell segmentation. E: The ratio image is calculated as a 32 bit stack from both denoised images.

and C2\_background\_substraction.tif). The position of the background rectangle is saved as "back-ground\_rectangle.zip".

- Median filter: useful to decrease the electronic noise of images acquired with a confocal microscope (Figure S2). If the box is checked, please adjust the filter radius (default: 2 pixels). The denoised images are saved as C1\_med.tif and C2\_med.tif respectively.
- Gaussian filter: useful to smooth punctiform signal of mitochondrial probes to facilitate cell segmentation (Figure S2). If this box is checked, please adjust the filter radius (default: 4 pixels). The smoothed images are saved in the working folder as C1\_gauss.tif and C2\_gauss.tif respectively.

After this step, only denoised images (for quantification) and potentially blurred images (for segmentation) are opened (Fig. 4 D). The fluorescence ratio of both denoised images is then calculated as a 32bit image in order to maximize its dynamic range (Fig. 4 E). This image is exported in the working folder as ratio.tif.



Fig. 5. Selection of individual cell-containing regions of interest. A: The user can adjust the contrast and scroll through the frames to count the cells to be analyzed before clicking "OK" on this dialog box. B: The user indicates how many cells he wants to analyze (default: 1). C: The user can choose on which channel to draw the ROIs. D: For each cell, the user draws a rectangle before clicking "OK" on this dialog box. E: The numbered ROIs are displayed on the active image as overlays. The ROI manager (right) displays the ROI position.

STEP 3: Creation of regions of interest with a single cell inside

- 1. Count the cells to be analyzed and fill the dialog box accordingly (Fig. 5 A and B).
- 2. Choose the channel on which you want to draw the ROI (Fig. 5C).
- 3. For each cell, draw a rectangular ROI that contains the cell on all frames of the stack (Fig. 5 D) before clicking "OK" on the dialog box (Fig. 5 E).

The ROIs are displayed on the image as numbered overlays. Their positions and numbering are saved in the working folder as "analyzed\_cells.zip", it enables to check afterwards the numbering of each cell Fig. 5 E.

Each ROI is automatically duplicated on both denoised acquisitions, on both blurred acquisitions and on the ratio image.

#### STEP 4: Cell segmentation

Identifying cells as separate objects different from the image background (cell segmentation) is a determinant step for successful further analysis, especially since changes in cells shapes or cells movements may occur during the acquisition.

Next steps are performed sequentially on each duplicated ROI.

- 1. Threshold the 1<sup>st</sup> channel (*i.e.* choose a gray value above which the signal is considered as cell and below which it is considered as background) (Fig. 6 A).
- 2. Click "OK" on the dialog box (Fig. 6 B) to binarize the 1<sup>st</sup> channel (Fig. 6 C).
- 3. Repeat these two steps on the 2<sup>nd</sup> channel (Fig. 6 D, E, F)
- 4. Choose the binary image that will be used for segmentation: it can be either one of the two binary images or the sum of both. Choose whether you want to analyze edge-touching cells (Fig. 6G).



Fig. 6. Cell segmentation using the macro. Both channels are thresholded (A, B, D, E) and binarized (C, F). Then, according to the user's choice, cells are detected either on one binary image or on the sum of both (G).

Summing both binary images usually optimizes cell segmentation (Figure S 3A). However, better results may be obtained with one of the two binary images only, *e.g.* if the fluorescence of the probe on a whole channel is insufficient to achieve a clear segmentation. It is recommended to exclude edge-touching cells, to ensure that the whole cell is considered for all measurements. The default parameters for cell detection are:

- Size ( $\mu$ m<sup>2</sup>): >100  $\mu$ m<sup>2</sup>.
- Circularity: 0.00 1.00 (1 corresponding to a perfectly circular particle). No hole inclusion (to exclude the nucleus region).

Depending on cell size, cell morphology and probe localization, these parameters can be modified in the script of the macro before running it (Figure S 3B). We advise to perform segmentation tests by varying size and circularity parameters to check whether these settings are accurate for a proper segmentation of the user's cells.

At the end of this step, for each cell, both binary images are automatically saved in the working folder as i\_C1\_binary.tif and i\_C2\_binary.tif, with i being the number of the considered cell. The mask, *i.e.* the binary image corresponding to the segmented cell after size and circularity filtering, is saved as "i\_mask.tif", to check cell segmentation if desired.

STEP 5: Fluorescence intensity quantification

- 1. Choose the folder where the quantification results will be saved (Fig. 7 A).
- 2. The macro automatically performs the quantification.
- 3. The images are automatically closed.
- 4. These results are stored in a 5-column matrix (Fig. 7 B):
  - Column 1 (entitled "cell\_number"): number of the cell
  - Column 2 (entitled "time"): acquisition time extracted from the image metadata
  - Column 3 (entitled "i\_C1"): mean fluorescence intensities on the 1  $^{\rm st}$  channel
  - Column 4 (entitled "i\_C2"): mean fluorescence intensities on the 2<sup>nd</sup> channel
  - Column 5 (entitled "ratio"): mean fluorescence intensities on the ratio image

This stacked data format allows to gather data from time-lapses with different time bases and is adequate for analysis using R software. 5. A report of all image processing and segmentation parameters chosen for each cell is automatically exported in the result folder (Fig. 7 C).

The mean fluorescence intensity quantification is performed as follows (Figure S 3B): each image of the mask stack is divided by 255 so that the pixel value within the cell equals 1 (= 255/255) and back-ground pixels equal 0 (= 0/255). Each image of the three stacks to be analyzed is divided by the



**Fig. 7.** Quantification results. A: A dialog box enables the user to choose the file to save the quantification results. B: The quantification results are a 5-column matrix containing the fluorescence intensities of both channels and on ratio image for each frame of each cell (3 <sup>rd</sup> to 5 <sup>th</sup> columns). Time values in minutes are extracted from the image metadata (2 <sup>rd</sup> column). C: Report of all image processing and segmentation parameters that have been chosen for each cell.

corresponding image of the mask stack. This operation does not alter the signal inside the segmented cell but assigns "not a number" (NaN) to each background pixel. The mean fluorescence intensity over the ROI is calculated for each image of the three stacks. This value corresponds to the mean gray value of each image. *Data analysis* 

### STEP 0: R configuration

- 1. Download a recent version of R (www.r-project.org) and Rstudio (https://rstudio.com/).
- 2. Save the provided R script in the folder of your choice.
- 3. Open the script using the File  $\rightarrow$  open menu (Fig. 8 A to C).
- 4. Install the required packages: {tidyr} [26], {xlsx} [27], {reshape2} [28], {ggplot2} [29], {ggpubr} [30], {gridExtra} [31], {FactoMineR} [32] and {factoextra} [33]. This step can be performed either by using the Packages tab (Fig. 8 D) or the install.packages function. The installed packages will stay installed for your next working session using R.
- 5. Load the required packages by running the 1st lines of the script (Fig. 8 C), for example by using the Ctrl + Enter shortcut. This step needs to be performed at each new working session.

#### STEP 1: Qualitative variable implementation and data compilation

Qualitative variables are required for data analysis. They must be implemented in each raw data file exported by the macro. Here, we added the following variables:  $H_2O_2$  concentration, date,



Fig. 8. Opening the script and installing the packages with Rstudio. A: Rstudio interface overview. The left window enables to script directly into the R console. The "environment" tab (top right window) gives an overview of all the objects (here, the a, b and c variables). Plots are displayed in the bottom right window. B: The File  $\rightarrow$  Open file menu enables to open any R script in a new window above the console. C: Overview of the script window. A single line can be run using the Ctrl + enter shortcut. The script can be run either by clicking on "run" or by using the Ctrl + Enter shortcut. D: The "Packages" tab enables to install and load the required packages.

replicate number, cell passage number, image number, and a unique identifier for each cell (Table 2). Some variables like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration are expected to be important parameters for the analysis. Others like the replicate number or the cell passage number can be added to examine their potential implication in the final results. Based on these variables, data can easily be filtered and analyzed accordingly. The cell identifier is useful to retrieve the initial image. Then, these completed datasets must be completed together.

We provide a method to perform these actions using R (Fig. 9).

1. Open a new R script using the Ctrl + Shift + n shortcut.

 $_{\rm 2.}\,$  Set as working directory the folder where the raw data are saved using the setwd function.  $_{\rm Table\,2}$ 

Meaning of the dataset columns.

/ariables already present in the raw ta- bles exported by FIJI				- cell_number time			Number of the cell in the image Time from the start of acquisition in minutes (extracted from the image metadata)											
i_C1 i_C2 ratio					i_C1				Mean cell fluorescence intensity on the 1 <sup>st</sup> channel									
					i_C2				Mean cell fluorescence intensity on the 2 $^{\mbox{\scriptsize nd}}$ channel									
							Mean cell fluorescence intensity on the ratio image											
dditional qualitative variables					C_H2O2				D <sub>2</sub> conce	ntration	applied c	n cells	(leve	els: 0, 10, 4	0 and 75 μ	.M)		
						date			Date	e of the e	xperimei	nt (yyyyn	1mdd 1	orma	it)			
					I	replicate				licate nu ime day	mber: e.g	. 2 if the	experi	ment	t is done fo	r the 2nd t	ime on the	
					I	passa	ge		Num	nber of p	assages a	ifter stab	le trar	sfect	ion (see Ma	&M)		
					i	induc	tion_ti	ne	Prot	oe expre	sion time	e (from d	охусус	line a	addition)			
					i	image	e_num		Ima	ge numb	er for a g	iven date	•					
					i	id_cel	II		Unic	que cell i	dentifier,	obtained	l by co	ncate	enating the	date, the i	image numb	
									fo	or a giver	date and	d the nun	nber o	f the	cell in this i	mage, sep	arated by "_	
A setwd("c:/users/	/Levy/Do	ocuments	s/probe	es/201	90614"	)			fo	or a giver	date and	d the nun	nber o	f the	cell in this i	mage, sep	arated by "_	
A setwd("C:/Users/ # 1. Hyper c expe("c_H202")<- expe["dref"]<-" expe["replicat"] expe["replicat"] expe["induction, expe["induction, expe["id_cell"]-	/Levy/Do cyto H20 e("1_H20 -"75" 20190614 ]<-"6" _time"]< "]<-"1" <-paste( <-paste( r,sep="	ocuments 2 75 μM 22_75uM. 5" "46" (expe§da '_")	s/probe M .txt",H ate,exp	es/201 header peSnum	90614" =TRUE) _image	)	<pre># 2. expe</pre> expe["c_ expe["da expe["in expe["in expe["in expe["in expe["id expe[	HyPer of ad.table H202"]<"2 te"]-"2 ssage"]- duction, m_image" _cell"]. 11_numbe	fc cyto H2 ("2_H2" "40" col9061 [<-"1" c-"6" time"] ']<-"1" :paste er,sep=	co2 40 μM co2_40 μM co2_40uM.τ 4" (<-"46" c(expe\$dat "_")	date and ct",header= e,expeSnum_	the nun	nber o	f the	cell in this i	mage, sep	parated by "_	
A setvd("C:/Users/ # 1. HyPer c expe:-read.table expe['dtat"]<-? expe['matur]	/Levy/Do cyto H2C e("1_H2C 75" 20190614 ]<-"1" <-"6" time"]< "]<-"1" <-paste( er,sep="	ocuments 2 75 μM 22_75uM 4" c="46" (expe\$da '_")	s/probe M .txt",H ate,exp	es/201 header peSnum	90614" =TRUE) _image	þ	<pre># 2. expe&lt;-re expe["c_ expe["re expe["pa expe["nu expe["nu expe["ru expe["ru expe["zd expe2&lt;-e</pre>	HyPer c ad.table H202"]<- te"]<-" plicat"] ssage"]- duction cell"]- ll_numbe xpe	fc ====================================	or a giver 202 40 µм 202_40µм.т 44" (expesdat (expesdat ("_")	date and	(TRUE)	nber o	f the	cell in this i	mage, sep	parated by "_	
A setwd("c:/Users, # 1. Hyper or exper-read table transformer (transformer) experiment (tran	/Levy/Do cyto H20 "75" 20190614 ]<-"1" _time"]<-"1" _=-"1" er,sep="	ocuments 02 75 µм 02_75им. " " - "46" (expe5da '_")	s/probe M .txt",ł	es/201 header peSnum	90614" =TRUE) _image	c	<pre># 2. expe&lt;-re expe["c_ expe["c_ expe["da expe["re expe["nu expe["re expe["c_ expe2&lt;-e </pre>	HyPer c ad.table H202"]<-te"]<-"2 plicat"] ssage"] duction_ image" cell"] ll_numbe xpe	fc cyto H2 "40" col9061 <-"1" "6" ']<-"1" paste rr,sep=	102 40 μM 102 40 μM 102_40uM,τ 14" ( <r*46" 1(expe5dat "_")</r*46" 	date and	(inage	nber o	f the	cell in this i	mage, sep	arated by "_	
A setud("c:/Users, # 1. Hyper C: expe("c_H202") expe["c_H202"] expe["replicat"] expe["rinduction, expe["rin	/Levy/Do cyto H20 "75" 20190614 <-"6" _time"]< "1<-"1" <-paste( er,sep="	ocuments 2 75 μM 22_75uM. 4" c="46" (expeSda _")	s/probe M .txt",P ate,exp	es/201 header peSnum	90614" =TRUE) _image	C	<pre># 2. expe&lt;-re expe["da expe["da expe["in expe["in expe["in expe["in expe["da expe["d</pre>	HyPer c ad.table H202"]<-" plicat"] ssage"]- duction, m_image" 	fc (yto H2 ("2_H2 "40" (-"1" "6" ']<-"1" 	02 40 μM 102_40 μM 102_40uM,τ 14" (expe5dat "_")	date and	,image	nber o	f the	cell in this i	mage, sep	arated by "_	
A setwd("c:/Users, # 1. HyPerc expe("c.2.102")	/Levy/Dd cyto H20 e("1_H20 75" 20190614 ]<-"1" 6" "time"] 75" er,sep="	cuments 2 75 μM 22_75uM. 4" (expeSda "_")	s/probe M .txt",} ate,exp	ratio	90614" =TRUE) _image	C	# 2. expe<-re expe["c_ expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["re expe["c_ expe["c_ expe["c_ expe["c_ expe["re expe["c_ expe["re expe["	HyPer of ad.table H202"]<-" te"]<-"" plicat"] ssage"]- duction, m_image" _cell"]- ll_numbe xpe empt × tor tor 0.000	fc cyto H2 c("2_H2 "40" c-"6" time"] '76" time"] '78 ter, sep= LC1 322,286	102 40 μM 102_40 μM 102_40uM.τ 14" (expe5dat (expe5dat "_")	date and kt",header= k,expeSnum_ s c,H202 s 75	TRUE)	plicat	essage .	Induction, time	mage, sep	arated by "_	
A setud("c:/Users, # 1. hyperc expe["c=AL302"]   expe["c=AL302"]   expe["c=Black"]   expe["c=Black"]  <	/Levy/Do cyto H20 e("1_H20 ="75" 20190614 ]<="1" "]<="1" "]<="1" e'-paste( er,sep=" time 0.000 0.500	ccuments 22 75 μh 22_75uM. 4" c="46" (expeSda '_') LC1 ' 1 322.289 1 326.301 1	5/probe M ate,exp 1_C2 = 385.407 388.110	ratio 1.188	90614" =TRUE)	C C 1 2	<pre># 2. expe&lt;-re expe["c_ expe["c_ expe["re expe["nu expe["re expe["nu expe["ru expe["xu expe["x</pre>	HyPer c ad.table H202"]< tell=" ssage"]- duction_ image" 	fc ::yto H2 :("2_H2 :("3_H2") :0019061 :(~"1" :(~"6" :time") :(~"6" :time") :(-"6" :time") :(-"6" :time") :(-"6" :("2_H2") :("1_H2") :("1_H2") :("1_H2") :("1_H2") :("1_H2") :("1_H2") :("2_H2") :("	to2 40 µM to2_40uM.t (expeSdat "_")	date and kt",header= k,expeSnum, 5 C,H202 5 75 1 75	(TRUE) (image (date range) (20190514 1 20190514 1	plicat	Harsage	<sup>2</sup> induction, time 66	mage, sep	M.cell 20100041_11 2010004_11	
A setud("c:/Users/ # 1. hyperc expe("c.H202")< expe['r.H202"] <td>/Levy/bd cyto H2C "75" 20190614 2-"1" -~"6" time"]- a-"6" time"]- a-"6" time"]- a-"6" time"]- a. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b.</td> <td>Cuments 22 75 μλ 32_75uM. 46" (expeSda -") 122.289 122.289 122.289 1329.301 1329.381 1331.001</td> <td><pre>s/probe % % txt", } ate,exp 4(_C2 = 385.407 386.042 385.441</pre></td> <td>ratio 1.188 1.181 1.154</td> <td>90614" =TRUE)</td> <td>C C 1 2 3 4</td> <td><pre># 2. expe&lt;-re expe["da expe["ba expe["ba expe["ba expe["in expe["i</pre></td> <td>HyPer c ad.table H2O2"]&lt; tet"]&lt;-"2 plicat" ssage"] duction. </td> <td>fc ::yto H2 :("2_H2"40" :1019061 :(-"1" :'-"6" :'-"5 ::ter") :'-"-"paste :rr, sep= : :222.050 :222.050 :223.9381 :323.9381 :331.001</td> <td>to2 40 µM to2_40uM.t (4" (expeSdat "_") 385.407 11 386.10 11 386.10 11 385.410 11 385.410 11</td> <td>date and ct",header e,expeSnum 1 75 1 75 1 75 1 75</td> <td>(TRUE) (image 20190514 1 20190514 1 20190514 1</td> <td>plicat</td> <td>assage</td> <td>induction, time</td> <td>nage, sep</td> <td>arated by "_ M_emi 2010014_11 2010014_11 2010014_11 2010014_11</td>	/Levy/bd cyto H2C "75" 20190614 2-"1" -~"6" time"]- a-"6" time"]- a-"6" time"]- a-"6" time"]- a. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b. b.	Cuments 22 75 μλ 32_75uM. 46" (expeSda -") 122.289 122.289 122.289 1329.301 1329.381 1331.001	<pre>s/probe % % txt", } ate,exp 4(_C2 = 385.407 386.042 385.441</pre>	ratio 1.188 1.181 1.154	90614" =TRUE)	C C 1 2 3 4	<pre># 2. expe&lt;-re expe["da expe["ba expe["ba expe["ba expe["in expe["i</pre>	HyPer c ad.table H2O2"]< tet"]<-"2 plicat" ssage"] duction. 	fc ::yto H2 :("2_H2"40" :1019061 :(-"1" :'-"6" :'-"5 ::ter") :'-"-"paste :rr, sep= : :222.050 :222.050 :223.9381 :323.9381 :331.001	to2 40 µM to2_40uM.t (4" (expeSdat "_") 385.407 11 386.10 11 386.10 11 385.410 11 385.410 11	date and ct",header e,expeSnum 1 75 1 75 1 75 1 75	(TRUE) (image 20190514 1 20190514 1 20190514 1	plicat	assage	induction, time	nage, sep	arated by "_ M_emi 2010014_11 2010014_11 2010014_11 2010014_11	
A stud("c;/Users, # 1. HyPer c expe://actal expe:/	/Levy/Do cyto H20 e("1_H20 "75" 20190614 c-"6" time"]4" "4-"1" "4" "4" "4" "4" "4" "4" "4" "4" "4"	bcuments 22 75 μλ 22 75 μλ 20 75	5/probe M att,ext", 385.407 388.104 389.341 389.544 389.783	ratio 1.188 1.181 1.184 1.150 3.053 1.128	90614" TRUE)		<pre># 2. expe</pre> expe["c_ expe["c_ expe["back expe["nu expe["nu expe["nu expe["nu expe["scale expe2<-e  part:<  for the state of the state interpet of the state i	HyPer c ad.tabl/2021]<- tell/2021]<- tell/2021]<- tell/2021]<- tell/2021]- ssage"]. ductionimage" c.ell/1]_number tell/2021 tell/2021 tell/2021 c.ell/1]_ tell/2021 c.	fc ::yto H2 :4("2_H2"40" (-1019061 <-"1" :-"6" :time"] :<-"5" :time"] :-"sep= : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	CO2 40 μM CO2_40 μM. τ (-"46" (expe5dat "_")	date and ct",header= c,expeSnum_ c,expeSn	(TRUE) (image date reaction (20190644 1 20190644 1 20190644 1 20190644 1	plicat i	Harssage	Induction_time	mage, sep	Arated by " M M M	
A stud("c:/users, # 1. HyPer c exper-read.table expe["c_JAD2"] <= expe[Tc_JAD2"]	<pre>//Levy/Dc cyto H2C cyto H2C cyto H2C cyto H2C cyto cyto cyto cyto cyto cyto cyto cyto</pre>	Cuments 22 75 µh 22_75uM. "" (cr46" (cree5da _") 22228 226 501 22228 226 501 228 501 228 501 228 501 228 501 228 501 228 501 228 501 229 501 220 501 220 501 200 500 200 500 200 200 500 200 200 200 200 200 200 200 200 200	s/probe % .txt", } ate, exp .c2 .385.407 .386.100 .386.544 .589.783 .592.592 .202.655 .592.592 .202.6555 .202.6555 .202.6555 .202.6555 .202.	ratio 1.188 1.181 1.181 1.181 1.181 1.181 1.182 1.184 1.150 3.053 1.128	90614" =TRUE)	C 0 0 00 1 1 2 3 4 131 132 762 265	<pre># 2. expe&lt;-re expe</pre> <pre># 2. expe</pre> <pre># 2. expe</pre> <pre>#</pre>	HyPer ( dad.tabla H202"] <= 2 Sage"] - 2 Sage"] - 2 Sage"] - 2 Time * time * time * time * time * 0.0000 0.0000 0.00	fc :yto H2 ("2_H2 "40" 019061 :time"]  <<"li>"-paste :time"] 232.266 328.502 238.501 239.316 280.352 280.35	LC2 / 0 µM 102_40 µM.t (="46" (="46" (expe5dat "_") 1385.07 11 385.07 12 385.07 12 385	e         C, 1002           e         C, 1002           e         C, 1002           i         75	(1000000000000000000000000000000000000	elicat i	assege	anduction, time           44           45           46           46           46           46           46           46           46	mage, sep	arated by "_ #d_emi // 20100014_11 20100014_11 20100014_12 20100014_12 20100014_12 20100014_12	
A setud ("c:/users, # 1. HyPer c exper-read.table expe["c.N202"] <= expe["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[[["c.N202"] <= expe[["c.N202"] <= expe[[["c.N202"] <= expe[[["c.N202"] <= expe[[["c.N202"] <= expe[[["c.N202"] <= expe[[[["c.N202"] <= expe[[["c.N202"] <= expe[[[["c.N202"] <= expe[[[["c.N202"] <= expe[[[[["c.N202"] <= expe[[[[["c.N202"] <= expe[[[[[[["c.N202"] <= expe[[[[[[[[["c.N202"] <= expe[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[[	//Levy/Dc cyto H2C ("1_H2C "75" 2019061 "15" "1"c"1" "1"	Locuments 22 75 µh 32_75µk " " "46" expešda 322 38 328 301 329 351 329 351 329 351 329 351 329 351 227 338 54 a 227 338 54 a	s/probe % .txt",} ate,exp 162 385.407 388.102 383.341 886.544 389.783 881.2392 402.059 755.767	ratio 1.188 1.181 1.181 1.182 1.182 1.182 1.184 1.180 2.940 1.214 2.940	90614"	C C 1 2 3 4 1311 132 263 263	<pre># 2. expe&lt;-re expe("rd expe("r</pre>	HyPer c ad.table H202"]<- plicat"] sage"]- duction, mage cell"]- mub tor tor tor tor tor tor tor tor tor tor	fc ::yto H2 s("2_H2 "40" 019061 (-~"1" ~"6" '-~"5" '-~"5" ~"5" exps * (_Ct 322.209 323.901 223.801 233.821 23	tc2         μM           to2         40 μM           to3         30 μM           to3	adte and           eta         ct", header           eta         cta           eta         <	date         rrrue)           image         2019054 2           2019054 2         2019054 2           2019054 3         2019054 3           2019054 4         2019054 4           2019054 4         2019054 4           2019054 4         2019054 4	plicat	assage	Induction, time           46	mage, sep	Mideil 20100014_11 20100014_11 20100014_11 20100014_12 20100014_12 20100014_12 20100014_12 20100014_13 20100014_13 20100014_13	
A setud ("c:/Users, # 1. HyPer c experced.tabl': expe['c_1202']<= expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<='2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe['idate']<'2 expe[	/Levy/DC ("1_H2 013061/") ("75" 2013061/") (-"1" (-"1" (-"1" (-"1" (-"1" (-"1" (-"1") (-"1" (-"1") (-"1" (-"1") (-	LC1   (cx252) (cx252) (cx253) (cx25	5/probe % .txt",} ate,exp 285.407 388.110 388.110 388.544 389.783 886.544 389.783 881.2.392 402.059 755.797 346.694	ratio 1.188 1.1181 1.1181 1.1181 1.1182 1.128 2.949 1.214 2.939 1.136	90614"	) C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	# 2, sxpe="rd_sxpe"/rd_sx	HyPer c ad.table HyDer c Sage"]- duction, sage"]- duction, mage cell"]- must sage"]- duction, sage"]- duction, sage"]-	fc ::yto H2 ("2 H4" :"40" (<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" i<~"1" :"-"5" : -"25 : : : - : - : - : - : - : - : - : - :	LC2 reference in the intervence intervence in the intervence inter	adate and           ct",header=           ct,expeSnum           ct,expeSn	image           image           2039054	plicat I	assage a a	Induction, time           66	mage, sep mage, sep mage / n n n n n n n n n n n n n	M.deff 1 20100014_11 20100014_11 20100014_11 20100014_12 20100014_13 20100014_13 20100014_13	
A setud("c;/Users, # 1. HyPer of exper-read-table expectations exp	/Levy/bc e("1-42c e("1-4	L(21 ) 22 75 μλ 22 75 μ	s/probe 4 ttxt", } ate, exp 285.407 386.642 383.341 865.544 389.763 812.392 402.065 755.797 334.664	ratio 1.158 1.151 1.152 1.124 1.125 2.549 1.124 2.549 1.125 2.549	90614" =TRUE)	C C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	# 2. expe["cexpe["dexpe["cexpe["dexpe["cexpe["rates are	HyPer c dd.tabl/2021 te"]<" ssage"] liat" ssage"] liat" ssage cell to to to to to to to to to to to to to	fc cyto H2 c("2_H2" "40" c-"6" c-"6" c-"6" c-"6" c-"6" c-mste c-"6" 222.299 223.381 333.1001 220.552 242.513 226.45 225.45 2	C2 40 µм to2_40 µм to2_40uм.t (4" (expeSdat ") 385.407 11 385.407 11 385.407 11 385.407 11 385.407 11 385.407 11 385.407 11 385.407 12 385.407 12 3	date and           ct", header=           c, expeSnum,           ct	dthe num TRUE) Simage date re 20190614 1 20190614 1 20190614 1 20190614 1 20190614 1 20190614 1 20190614 1 20190614 1	plicat i	assage	Induction, time           6           45           46	mage, sep mage, sep 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Arated by "_	
A setud("c;/Users, "	/Levy/Dc e("1_12C e("1_12C ="5") 01.921 01.921 01.921 01.921 01.921 0.0000 0.0000 0.000 0.0000 0.0000 0.0000 0.0000 0.0000 0.0000 0	Locuments 22 75 μλ 22_75uA "" (expe5dd 222209 5 222209 5 222209 5 336.001 5 336.001 5 336.001 5 222.35 336.001 5 220.552 ( 223.4697 227.234 256.155	s/probe M ttxt", } ate, exp 385.407 386.42 383.41 866.544 389.783 812.392 402.069 755.797 386.664 753.667	ratio 1.188 1.181 1.184 1.124 2.949 1.126 2.932	90614" TRUE)	C 0 00 1 1 2 3 4 1 1 2 2 3 4 1 1 2 2 3 4 1 1 2 2 3 4 4 5 2 6 2 6 2 6 1 6 1 6 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	<pre>expe&lt;-re&gt; expe</pre> expe exp	HyPer c dd.tabl 2202"]<-(2202") te"]<-(27) ssage"] liar" ssage"] liar" ssage cell te" te" tme to tme to to tme to so so so so so so so so so so so so so	fc :yto H2 :("2_H2" :"40" :"40" :"40" :"50" :"50" :"50" ::"50	C,220 ри 102 40 µм 102_40µм, т (4" (скре5dat "_") 1383.407 11 388.100 11 388.1000 11 388.1000 1	adate and           ct", header=           c, expeSnum,	dthenun TRUE) Simage date re 20190614 1 20190614 1	plicat (	assage	cell in this i hduction, time 45 45 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46	mage, sep mage, sep mage / sep 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Arated by "_	
A setud("c;/users, # 1. Hyper c syse("data") <- " expe("fata") <- " expe("fata") <- " expe("fata") <- " expe("nduction, expe("nduction, expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) expe("fata(ent)) set("fata(ent)) set("fata(ent)) set("fata(ent)) expe("fata(ent)) set("fata(ent)) expe("fat	/Levy/bc cyto H2C (~1_L+2C ~75" (~1_L+2C ~75" (~1_L+2C ~75" (~1_L+2C) (~1)(~1)(~1)(~1)(~1)(~1)(~1)(~1)(~1)(~1)	LC1	<pre>s/probe % .txt",} ate,ext 385,407 388,104 389,703 388,104 389,703 388,341 586,544 389,703 383,341 586,544 389,703 383,341 586,544 389,703 383,341 59,705 51,707 384,694 753,667 753,667</pre>	ratio De Snum 1.188 1.181 1.184 1.130 1.214 2.949 1.136 2.949 1.136 2.949	90614" -TRUE)	C 0 00 1 1 2 3 4 1 1 2 2 3 3 4 1 3 2 4 3 3 4 5 2 4 5 2 4 5 2 4 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	<pre># 2. ************************************</pre>	HyPer C 4 (1202) - (-202) -	fc :yto H2 ("2-4" "40" (-"19" -"1" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"2" -"40" 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" 75 74" -	CC2 40 µM CO2 40 µM	adate and           ct".header=           ct".header=           c.tr.peSnum,           ctr.peSnum,           ctr.peSn	date         race           image         date           image         20190614           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1           20190614         1	plicat 1	e i li 4	Induction_time           6           66           66           66           66           66           66           66           66           66           66           66           66           66	mage, Sep           num,image           1           1           1           1           1           1           1           1           1           2           1d_cett           2090710_l_1	Arated by "_	
A setud ("C:/Users, # 1. Hyper C: expe:/restart.sbl experimation of the setup of the setu	<pre>/Levy/bc cyto H2C ("1_L42 "75" ("1_L122 c"1_" c"1_L12 c"1_" c=paste( c=6" 1 time 1 c=0 1 c=0 1 c=</pre>	bcuments           22         75         μμ           2-75 μμ         μμ          "46"         "           ''expedd        "46"           122289         326.301           333.001	<pre>s/probe % .txt",} ate,ext 285,407 388,102 384,102,102 384,102,102,102,102,102,102,102,102,102,102</pre>	ratio 1.188 1.181 1.181 1.182 2.949 1.214 2.992 E	90614" TRUE)	C C 262 263 303 364 524 524	<pre># 2, xxpe://c. xx</pre>	HyPer C 4 dd.table 2027 - (-2027)	fc :yto H2 ("2_H2" "40" colision -"6" "1" - paste - "6" - "20" - "6" - "1" - paste - 1" - 22.289 - 232.289 - 234.289 - 234.289	C2 40 µM to2 40 µM to2_40uM.t 44" (c**46" (c**66" (c**66" (c**66" (c**66" 1383.407 1 383.407 1 393.407 1 493.407 1 493.	date and           ct", header           e         C, 1202           e         F, expeSnum           e         75           10         75           11         75           12         75           13         75           14         75           15         75           16         75           17         75           18         75           19         75           12         75           2         0190710           20190710         01000000	date         rrue           image         date         r           image         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         20190514         1           20190514         1         1         1           20190514         1         1         1           20190514         1         1         1           20190514         1         1         1           20190514         1         1         1           1         1         1         1	plicat 1	e i li 4 4	cell in this i           induction, time           45           46	mage, Sep mage, Sep man, Image 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Micell 1	
A stud("C:/Users, # 1. HyPer c expe:-rad.table expe:(r_dir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? expe:[rdir")<-"? setud("C:/Users2, setud("C:/User	/Levy/bd (1_H2Cyr) H2C (1_H2Cyr) H2C (2_1]_H2C (2_1)	vcuments           22 75 μs           ys           vc-"46"           (expeidd           32235           32235           32235           32235           32235           32235           32235           323431           225435           323431           233432           234231           235435           me(rbi)           xy/Docum           xy/Docum           xy/Docum	<pre>s/probe % .txt", } ate, exp 185.407 388.642 383.341 866.544 389.783 812.392 202.669 735.787 346.694 785.787 73.346.694 783.667 nd ) ments</pre>	ratio De Snum 1181 1186 1183 1186 12949 1214 2.939 1135 2.949 1214 2.939 1135	90614" =TRUE)	C C 0 Market 1 2 3 4 3 3 3 4 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 4 3 3 3 4 3 3 4 3 3 4 3 3 4 3 3 4 3 3 4 3 3 4 3 5 4 5 4 5 4 5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5		HyPer C dd.tably te"]<"] sage"] licat"] sage"] licat" sage cell sage cell triat cell sage cell sage sage sage sage sage sage sage sage	fc ("2 + V2 ("2 + V2 ("2 - V2 "40" 0190051 1202 2030 20 20300 2030 2030 20300 2030 2030 2030 20300 2030 2030 2030 2030 2030 2030 2030	LC2 / 0 µM to2_40 µM to2_40uM.t (4" (expeSdat "	date and           ct", header-           c, expeSnum           c, expeSn	image           image           image           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           2019084           1           1           1           1           1           1           1	pilcat pi	e i ii iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii	Induction, time           46           47	mage, Sep mage, Sep mage, Sep mage, Sep mage, Sep sep sep sep sep sep sep sep s	Arated by "	
A setud("c;/Users, # 1. HyBer C expe("data")<-" expe("fata")<-" expe["fata")<-" expe["fata"]<-" expe["fata["]-" expe["fata["]-" expe["fata["]-" expe["fata["]-" expe["fata["]-" expe["fata["]-" expe["fata["]-" expe[-" expe["fata["]-" expe[-" expe] - expe] - expe] - expe[-" expe] - expe]	/Levy/bc (1_1,220) (1_1,220) (2_1)	LCI = 0 - "46" (expedda 22290 22290 222200 222200 222200 222200 222200 222200 222200 222200 222200 222200 2202200 220320 220320 220320 220320 220320 2205200 220520 20050 200	s/probe 4 ate,exp ate,exp ate,exp ass.407 385.407 385.407 386.422 389.783 381.209 386.544 389.783 381.209 386.544 389.783 386.544 389.783 386.544 389.783 386.544 785.795 785.795 346.694 785.795 785.697 196.785	ratio 1.189 1.181 1.181 1.181 1.181 1.182 1.184 1.185 2.949 1.124 2.949 1.125 2.949 2.949	90614" =TRUE)	C 0 0 0 1 1 2 2 2 42 2 4 2 4	<pre>expe<re expe</re </pre> -re expe("c_ expe("n_ expe("n_ expe("n_ expe("n_ expe("n_ expe("n_ expe	HyPer c 4 d. tab le tad. tab le tab la tab la tabb la tabb la tabb la tabb la tabb la	fc ("2 H2 "40" 019061 12-"6" 12-"6" 12-"1" "6" 12-"1" "5" 12-"1" 	LC2 ref (4" (expeSdat (expeSdat "	date and           ct", header-           e, expe Snum,           8, expe Snum,           10           12           75           13           75           14           75           15           75           16           75           17           18           75           19           75           12           79           20190710           20190710           20190814	date         result           image         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         20190614         2         20190614         2         20190614         2         2         20190614         2         2         2         2         2         2         2         1         2         2         2         1         2         2         1	plicat i passag 3 3 3 3 9	**************************************	Induction, time           46           47           48           49	mage, Sep rum_Image / Sep 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Marated by "	
A setud("c;/users, "	/Levy/bc cyto H2c cyto H2c cyto H2c c"Js" "75" c"_Lime"] c-"a" time "] c-"6" time "] c-"6" time "] c-"6" c-"6" time "] c-"6" c-"6" time "] c-"6" c-"6" time "] c-"6" c-"6" time "] c-"6" c-"6" time "] c-"6" c-"6" time "] c-"6" c-000 c-0	vcuments 22 75 µs 22 75 µs 22 75 µs (expe§da 222 280 222 280 223 280 224 280 225 225 225 225 225 225 225 22	s/probe % ate,exp 385.407 385.407 386.100 386.042 386.101 386.042 386.	ratio 1.189 1.181 1.181 1.181 1.182 1.130 2.949 1.124 2.949 1.126 2.949	90614" -TRUE) image	C C 262 263 263 263 263 263 263 263 263 263		HyPer c C 4 d. tab le 4 d.	fc	C2 40 µM C2 40	date and           ct" , header-           ct" , header-           e, expeSnum           0         75           10         75           10         75           10         75           11         75           12         75           14         75           15         6           16         75           17         75           18         75           19         75           10         75           11         75           12         75           13         75           14         75           15         date for 20000000           16         7000000000000000000000000000000000000	date         replicate           image         20190614         1           20190614         1         20190614         1           20190614         1         20190614         1           20190614         1         20190614         1           20190614         1         20190614         1           20190614         1         20190614         1           20190614         1         1         1           1         1         1         1         1           1         1         1         1         1	plicet	e i li 4 4 4 4 4 4 4 4	Induction, time           44           45           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           46           47           48           48           49           49           40           41           42           43           44           45           46           47           48           49           49           9	mage, Sep	Marated by "	

Fig. 9. Data completing and compiling prior to statistical analysis. A: Example of R script for raw data importing, completing with qualitative variables and renaming. B: Visualization of the 1 <sup>st</sup> raw data file. C: Visualization of the 1 <sup>st</sup> data file after qualitative variables implementation. D: Example of R script for data compiling and exporting. E: Visualization of the complete dataset.

#### setwd("folder\_where\_your\_data\_are\_saved") # Sets the proper working directory

3. Import the 1<sup>st</sup> raw data file using the read.table function (Fig. 9 A and B).

rawdata < -read.table(''data1.csv'', sep = '','') # Imports the dataset and names it rawdata

4. Add the 1<sup>st</sup> required qualitative variable as shown on the following example; it adds a column entitled C\_H2O2 which is filled of "10". Quotation marks around "10" allow the software to consider the variable "C\_H2O2" as a multi-level factor rather than a quantitative variable.

rawdata ["C\_H2O2"] < - "10" # Adds a full column of "10" entitled C\_H2O2

5. Repeat step 4 to add any other desired qualitative variable (Fig. 9 A).

6. One of these qualitative variables must be a unique identifier for each cell (Id\_cell column, Fig. 9 C and E). This allows (i) to represent the results as curves using the {ggplot2} package, and (ii) to easily retrieve the cell and experiment associated to a particular curve.

7. Rename this 1 <sup>st</sup> completed data frame using the following script line, which creates a new data frame called data1 that equals the rawdata data frame (Fig. 9 A):

data1 < - rawdata

8. Perform steps 3 to 7 with the other raw data files, renaming each completed data file with a new name (for example data2, data3, ..., datak).

9. Compile these completed data files using the rbind function as follows (Fig. 9 D and E):

dataset < - rbind (data1, data2, ..., datak)

10. Export the complete dataset in the chosen folder using the write.table function (Fig. 9 D):

setwd ("the pathway of the chosen working directory") write.table (dataset, file = "TheNameYouWant.txt")									
A # Raw data visualising									
<pre>pl&lt;-ggplot(mydata,aes(time,ratio,group=id_cell,col=paste(date,replicate)))+ # define the variables to pl geom_line()+</pre>	ot tin ding to [H2O2]								
<pre>B # Interpolation (aim = get the same timebase for every cell) C interpol_data&lt;-data.frame(matrix(ncol=3,nrow=0))</pre>	Cell 65								
<pre>colnames(interpol_data)&lt;-c("id_cell","time","ratio") for (i in levels(mydatašid_cell)){     subdata&lt;-subset(mydata,id_cell==i)     interpol-spline(x=subdataštime,y=subdata\$ratio,xmin=0,xmax=65     ,n=131) # adjust xmin, xmax and n according to your own data     (n=number of knots)     temporary&lt;-data.frame(matrix(ncol=0,nrow=length(interpol\$x)))     temporaryStime&lt;-interpol\$x     temporarySidio&lt;-interpol\$x     temporarySidio&lt;-interpol\$x     interpol_data&lt;-su,data.frame(rbind(interpol_data,temporary)) } </pre>	BN 20190814.2.3 0.944 0.917 0.94 0.97 1.023 0.944 1.06 0.942 1.467 2.894								
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	paste(date,replicate) 2016/710 1 2016/711 1 2016/711 1 2016/711 1 2016/713 1 2016/612 1 2016/612 1 2019/614 1								
Fig. 10. Data visualization and processing. A: Script to plot the ratio curves facetted by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentrations applied on cells (0, 10, 40 or 75 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>). B: Script enabling to get the same time base for all curves. C: Spread data are exported into an excel file. D: Plot of the raw data ratio curves facetted by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentrations. E: Plot of the interpolated data using the same settings.

#### STEP 2: Data visualization and processing

Even though the provided script is customized to our dataset, with minor adjustments it enables the complete analysis of any dataset.

- 1. Go back to the R script.
- 2. Load the dataset by running the script lines entitled "raw data loading".
- 3. To visualize data, the provided script (Fig. 10 A) uses the {ggplot2} package to display the ratio curves colored according to the experiment date and replicate. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> addition time is indicated by vertical bars. The facet\_grid function is used to split the response curves as a function of the 1 <sup>st</sup> qualitative variable: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration (Fig. 10 D). These settings can directly be modified in the script (see https://ggplot2.tidyverse.org/ for more details).
- 4. If the time base is not the same for all cells, run the part of the script enabling to interpolate your data (Fig. 10 B) using the spline function from the {stats} package (R Core Team 2019). The number of knots can be set to the number of data points (= 131 in the provided example).
- 5. Check that the interpolation does not noticeably alter the shape of the curves by plotting the interpolated ratio curves (Fig. 10 E).
- 6. Spread this interpolated dataset using the spread function of the {tidyr} package. This step changes the dataset from a long table, in which all the cells are one above the other (Fig. 9 E), to a wide table with one cell per column (Fig. 10 C).
- 7. Export the spread dataset as an excel file in the working directory, using the write.xlsx ({xlsx}) function (Fig. 10 C).

STEP 3: Choosing kinetic parameters

- 1. Save the provided MATLAB script in the same folder as the excel file generated at previous step.
- 2. Open the script in MATLAB.
- 3. Adjust the following variables at the beginning of the script (Fig. 11 A):
  - The imported file name if required



Fig. 11. Kinetic parameters calculation using the MATLAB script. A: Overview of the beginning of the MATLAB script. Strings preceded by "%" (in green) are comments. The string underlined in green has to be the name of the excel file containing your spread data. Numbers framed in red must be adjusted to your own number of time points. Numbers framed in purple enable to adjust the smoothing level. B: Parameters calculated using the MATLAB script are exported as an excel spreadsheet with one line per cell. C: Overview of the calculated parameters for one curve.

- The number of time points before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition

- The smoothing parameters if required

Indeed, the curves are smoothed before the kinetic parameters are calculated. In our case, the slope of the curve increased sharply upon addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We therefore chose to smooth separately the two parts of each curve (before and after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition) to take this into account. For this reason,

the number of time points before  $H_2O_2$  addition is required.

4. Run the script by clicking "run" (Fig. 11 A).

The following parameters, summarized in Fig. 11 C, are calculated on smoothed curves:

- The maximum ratio, **rmax**
- The time of the maximum ratio in minutes, **tmax**
- The slope at the maximal inflexion point in minutes -1, noted **infl**



Fig. 12. Kinetic parameters of ratio curve analysis after cell exposure to 0, 10, 40 and 75 µM H 2 O 2 (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).

- The time of the maximal inflexion point in minutes, tinfl
- The ratio value at the maximal inflexion point, noted rinfl
- The lag time, in minutes, noted **tlag**, is estimated by extending the tangent at tinfl to the initial baseline (y = rinit, where rinit is the median ratio before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition).

Except the maximal ratio, these parameters cannot be estimated for flat curves, as observed in absence of treatment. The tmax, infl, tinfl, rinfl and tlag parameters are calculated for curves whose maximum ratio is arbitrarily at least two-fold the initial ratio and reached within 30 min. This filter

can directly be customized in the script.

- The calculated parameters are automatically saved as an excel spreadsheet in the working folder (Fig. 11 B).
- 6. From the R script, run the script lines entitled "Analysis of the parameters calculated by MATLAB". This part of the script merges the kinetic parameters with the complete dataset and plots each parameter as a function of qualitative variable 1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in our example).

As our samples are small (less than 30 individuals per  $H_2O_2$  concentration tested), we chose to superimpose boxplots and dotplots to visualize the parameters as a function of  $H_2O_2$  concentration. The boxplots give a simple visualization of the variables by showing median and extreme values. The overlapping dotplots precisely show the data distribution since each cell is shown. The p- values associated with the Kruskal-Wallis multiple comparison test are calculated and displayed on each graph using the stat\_compare\_means ({ggpubr}) function. The null hypothesis tested by this nonparametric test is H0 = "All  $H_2O_2$  concentrations give identical results". We rejected this hypothesis (*i.e.* we considered that there was at least one significant difference) as soon as the associated p-value was below 0.05. Mann Whitney pairwise comparison tests were also performed to compare  $H_2O_2$  concentrations two by two. The plots are presented in Fig. 12. We observed that:

- The maximal ratio is reached later for  $10\,\mu M\,H_{\,2}\,O_{\,2}$  than for 40 and  $75\,\mu M\,H_{\,2}\,O_{\,2}\cdot$  Final HyPer ratio according to C\_H2O2 after 55 - 60 min timelapse



Fig. 13. Final ratios analysis after cells exposure to 0, 10, 40 and 75 µM H 2 O 2 during ≈ 1 h (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).

- The maximal ratio is minimal for cells treated with  $0\,\mu M\,H_2O_2$  . It is lower for  $10\,\mu M$  than for 40 and  $75\,\mu M\,H_2O_2$  .
- The inflexion point is reached later for 10 than for 40 and 75  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Surprisingly, it is reached later for 75 than for 40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (but with a higher p-value).
- The slope at the inflexion point is lower for  $10 \,\mu M$  than for  $40 \,and \, 75 \,\mu M \,H_2 \,O_2$ .
- The lag time is longer for 10 than for 40 and 75  $\mu M\,H_{2}O_{2}$  .

All these observations strongly suggest that the lower the  $H_2O_2$  concentration, the slower the ratio increases and the lower the maximal ratio. These conclusions are valid for low  $H_2O_2$  concentrations, but we do not observe any significant difference between the kinetic parameters of the curves obtained with 40 and 75  $\mu$ MH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Overall, these results highlight that, in our cell model, HyPer ratio increase is lower and slower for cells treated with  $10 \,\mu$ M H  $_2$  O  $_2$  than for cells treated with 40 and 75  $\mu$ M. Consistency of these results with those presented in the following sections is shown in Table III (see Supplementary).

STEP 4: End-point ratio analysis

1. Run the R script section entitled "Analysis of the final median ratios". The median ratio between 60 and 65 min is calculated for each curve and this new variable, named r\_end, is added to the dataset (Fig. 11 C). Final ratios are then plotted as a function of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (Fig. 13).

We observed that the final ratio increased with H  $_2$  O  $_2$  concentration, reaching a plateau at 40  $\mu$ M H  $_2$  O  $_2$ . Therefore, in our cell model, HyPer ratio returned to its basal state more efficiently for cells treated

with  $10 \mu M H_2 O_2$  than for cells treated with 40 and 75  $\mu M H_2 O_2$ . These results are consistent with results of step 3 (Fig. 12).

STEP 5: Assigning a global score to each curve using functional principal components analysis

In this section, each curve is replaced by a single score using functional Principal Components Analysis (fPCA). This approach enables to preserve almost the entire variability of the initial dataset, allowing a fast and accurate comparison of the responses obtained under the different experimental conditions. Moreover, in contrast to the previous kinetic parameters, this approach can be used for



**Fig. 14.** Functional principal components analysis of the dataset. A: Script for the functional data object generation from the spread dataset. Adjust the numbers framed in red according to your dataset and desired smoothing level. B: Visualization of the dataset 1<sup>st</sup> two principal variation modes. The 1<sup>st</sup> harmonic (left) is a pharmacokinetic-type function whose score quantifies the amplitude of the variation and the overall height. This is the overwhelming mode of variation in our dataset as it accounts for 99% of its variability. The score on the second harmonic (right) indicates whether the curve tends to have a high maximum ratio and a low final ratio. This mode of variation only accounts for 0.4% of the variability in our dataset, so we chose to neglect it. C: Curves colorization according to their score on harmonic 1. The lower the score of a curve, the closer its color is to light orange. The higher the score of a curve, the closer its color is to dark blue. The higher the score of a curve, the higher its and the greater its amplitude. D: Curves score on the 1<sup>st</sup> harmonic of fPCA after cells exposure to 0, 10, 40 and 75 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).

all curves including flat shaped curves. According to fPCA principle, each curve is decomposed into a sum of components called harmonics representing their main variation modes.

- 1. Go to the R script section entitled "functional PCA".
- 2. Load both the stacked and spread datasets by running the appropriate script lines.
- 3. Convert the spread dataset into a functional data object by executing the corresponding section of the script (Fig. 14A). A spline basis is created, whose parameters need be adjusted: rangeval must be set to the time range and nbasis to the number of spline functions of order norder that are summed to fit the curves. The higher the values of these two parameters, the lower the smoothing will be (Fig. 14A).
- 4. Perform the functional PCA and plot the types of variation represented by the 1<sup>st</sup> two harmonics (Fig. 14 B).

The 1<sup>st</sup> harmonic, namely the function type that is able to best describe the set of curves, is a pharmacokinetics-like function with a lag time followed by a growing phase and by a slow decrease (Fig. 14 B, left). This harmonic accounts for 99% of our dataset variability. The 2<sup>nd</sup> harmonic only accounts for 0.4% of the variability and can thus be neglected (Fig. 14B).

5. Plot all ratio curves colored according to this score (Fig. 14C).

The plot unambiguously shows that the higher the score of a curve on the first harmonic, the higher the overall ratio: cells with an overall high cytoplasmic  $H_2O_2$  concentration have a high score and cells with an overall low cytoplasmic  $H_2O_2$  concentration, *e.g.* cells treated with  $0 \mu M H_2O_2$ , have a low score.

6. Plot the score on the 1<sup>st</sup> harmonic of fPCA as a function of the qualitative variable of your choice (the H <sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in our example) (Fig. 14D).

We noticed that the score increases with  $H_2O_2$  concentration, except for 40 and 75  $\mu$ M  $H_2O_2$  where no significant difference is observed. The score on the 1 <sup>st</sup> harmonic of the fPCA is thus an excellent way to summarize a complex dataset.

## STEP 6: Principal components analysis of all parameters

To get an overview of the above kinetic parameters and scores, we performed a Principal Components Analysis (PCA) on all these variables. PCA is a procedure enabling to simplify a dataset by replacing an important number of variables by a limited number of new variables. These new variables are called axes and are computed to account for the variability of the original dataset [34].

- 1. Go to the R script section entitled "PCA with every qualitative parameter".
- 2. The individuals factor maps (*i.e.* the projection of each cell in the plane formed by the 1<sup>st</sup> two axes) and the correlation circle (*i.e.* the projection of the variables in the same plane) are automatically displayed.
- 3. The {factoextra} package enables to plot these data in a more esthetic and customizable way. Individuals and variables were colored according to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (Fig. 15 A), and to the quality of their representation (cos<sup>2</sup>), respectively (Fig. 15 B). The closer to 1 the cos<sup>2</sup> value is (green vectors), the better the corresponding variable is represented in the plane formed by the 1st two axes of the PCA. Variables with a cos<sup>2</sup> close to 0 (red curves) are poorly represented.
- 4. Individuals and variables factor maps can also be superimposed (Fig. 15 C).

From these plots, we note that the 1<sup>st</sup> two axes account for 78.39% of the total variability. The projection of the variables onto the plane formed by these two axes is thus a good image of the complete dataset Fig. 15. Excepting the ratio at the inflexion point, all the variables are well represented on this projection (Fig. 15 C). The ratio at the inflexion point is thus set aside in the following interpretations.

The variable projection highlights two independent (orthogonal) groups of variables being collinear to each other (Fig. 15 D). These sets of variables are complementary:

- Set 1: kinetics of the ratio increase (blue vectors). The time the inflexion point is reached, the lag time, and the time the maximum is reached, are highly correlated. Expectedly, this set of variables is highly anticorrelated with the slope at the inflexion point, corresponding to the speed of ratio increase.

- Set 2: overall ratio height (purple vectors). The maximal ratio, the final ratio and the score on the 1<sup>st</sup> harmonic of the fPCA are highly correlated. This set of variables is not correlated with the one described above. Both sets of variables are thus complementary with each other.

The joint observation of the circle of correlations and the projection of individuals leads to the following conclusions (Fig. 15 D):

- The cells treated by 0  $\mu$ M H  $_2$  O  $_2$  are grouped together along the set 1 of variables, because tinfl, tlag, tmax and infl were not calculated for these cells. Consistently, they exhibit low overall ratio heights.
- The cells treated by 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the one hand and by 40 or 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the other hand are well discriminated along both sets of variables. Consistently, 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells have both a slower (or more delayed) ratio increase and a lower overall ratio than 40 or 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells.

Overall, these analyses show that the response is faster and higher as the H  $_2$  O  $_2$  concentration increases. Individual cells treated with 0, 10, 40 or 75  $\mu$ MH $_2$ O $_2$  can be efficiently discriminated, using various statistical parameters as shown in Fig. 15 D.



**Fig. 15.** PCA on all quantitative variables. A: Individuals projection in the plane formed by the first 2 axes of the PCA with coloration according to the  $H_2$  O 2 concentration. B: Correlation circle with vectors coloration according to the quality of representation of variables. The shorter the vector representing a variable and the closer to 0 its cos<sup>2</sup>, the less well it is represented. Here, all variables are satisfactorily represented except for rinfl. C: Projection of the entire dataset (variables and individuals) in the plane formed by the first two axes of the PCA. Individuals are colored according to the  $H_2$  O 2 concentration. The center of gravity of each point cloud is presented as a larger point. Two independent (orthogonal) groups of variables collinear to each other were identified. Variables in the set 1 (blue vectors) describe the ratio increase kinetics, while variables in the set 2 (purple vectors) describe the overall ratio height.

Method validation

Related to the widespread utilization of GFP- and YFP-based biosensors in the scientific community, methods have been proposed by several authors with the common objective of rendering microscopy data analysis less fastidious and time-consuming [18, 19]. In this study, we describe a procedure, which is simple to use, reproducible and robust, to analyze microscopy data obtained from ratiometric biosensors. Considering cell morphology changes during the acquisition time is a major advantage of our provided macro. Following image acquisition and quantification, we further developed a complete set of tools for analysis, including the automatic determination of key "diagnostic" kinetics parameters (representative time, slope and ratio values, see STEP3) for appropriate curve mathematical definition. Functional PCA was introduced to simplify each curve by a single score yet retaining variability. This dataset can be analyzed using parametric or non-parametric statistical tests, depending on data size and distribution. Final PCA on all quantitative variables allows a global overview of the conclusions, through a clear and visual presentation of the results.

As previously mentioned, our free method mainly uses open source softwares (FIJI and R) and associated packages, allowing easy access to all. Although some parameters were calculated using the MATLAB software, calculation can be performed using any curve analysis free software like Scilab or spreadsheet program like LibreOffice Calc.. Moreover, scripts or macros are easily editable and intelligible thanks to many embedded commentaries. Modifications for particular needs are thus straightforward.

Through this presentation, the user is guided step by step. Moreover, since the process is semi- automated, the user can check and adjust the parameters at key steps, avoiding errors in data processing. In contrast, this could not be easily performed when using fully automated methods. Further, checking intermediary results or retrieving analysis parameters is made possible thanks to results saving at each step of the process.

To evaluate the performance of our procedure in analyzing data and reaching biological conclusions, we used an experimental scenario involving cultured epithelial rabbit kidney RK13 cells expressing the ratiometric HyPer probe in the cytoplasm. Cells were treated with increasing H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> concentrations (0, 10, 40 and 75  $\mu$ M) and time-lapse fluorescence microscopy data were collected. Substantial changes occurred in the measured parameters when increasing the exogenous H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> concentration. Statistical significance was established for all parameters between 0 and 10  $\mu$ M, and between 10 and 40  $\mu$ MH<sub>2</sub> O<sub>2</sub> (data are summarized in Table III, see Supplementary), showing an efficient discrimination between cells treated with various H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> concentrations ranging from 0 to 40  $\mu$ M by our method. This demonstration in a standard experiment involving dose-dependent oxidation of the sensors validates that the set of tools is capable of reflecting biological changes, accurately and quantitatively.

Noticeably, no statistically significant difference was found between 40 and 75  $\mu$ M H  $_2$  O  $_2$  for most of the parameters. It is possible that HyPer fluorescence ratio evolution within this range of H  $_2$  O  $_2$ 

concentrations is not linear anymore, consistently with previous studies that described that probe signal is linear within the 5–25  $\mu$ M range in E. coli and eukaryotic cells [24] or within the 0–10  $\mu$ M range in human cells [35]. It is also possible that the actual intracellular H  $_2$  O  $_2$  concentration might not linearly correlate with increasing exogenous H  $_2$  O  $_2$  concentration, as intracellular antioxidant proteins such as peroxiredoxins and catalases may act to metabolize H  $_2$  O  $_2$  when it is above a certain threshold [36]. It is very likely that the absence of statistically significant difference between some of the parameters within the 40–75  $\mu$ M range originates in cell physiology or in sensors oxidation dynamics *in vivo*.

One potential discrepancy also appeared. We identified that tinfl was higher for 75 than for 40  $\mu$ M H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> (otherwise expected to remain equal or to decrease as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration increases), in a statistically significant manner (see Fig. 12). This discrepancy may very well be due to the parameters calculation imprecision, as the curves have a step of 0.5 min and the inflection point generally appears a few minutes after H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> addition. Decreasing time between time points during acquisition, if technically feasible, should likely resolve this point.

As a conclusion, we provide here a step-by-step semi-automated method to analyze microscopy data obtained from ratiometric biosensors. This method proved to be effective and accurate, and provides robust statistical analysis. Results are shown as a visual diagram. Its applications to various experimental contexts and within different organelles should be helpful to many researchers interested in the utilization of ratiometric sensors.

#### Construction of the HyPer-expressing cell line

#### - Construction of HyPer cyto NES expression vector

The original pHyPer-cyto vector encoding HyPer was purchased from Evrogen [24]. Nucleus- excluded HyPer was constructed by amplifying the HyPer sequence using primers 719 and 720 (Table V, Supplementary) introducing a Nuclear Export Signal (NES). The PCR product, fusing NES in frame to the 3' end of HyPer, was then cloned in pCMV/myc/cyto vector (Life Technologies) at PstI/NotI sites, leading to pCMV HyPer cyto NES plasmid. HyPer cyto NES encoding sequence was then amplified by PCR using primers HyPer cyto NES for and HyPer cyto NES rev (Table V, Supplementary), and cloned at the *Sal I/Nde* I sites in the pTRE3G plasmid (Clontech laboratories) for inducible gene expression.

- Construction and culture of the RK13 HyPer cyto cell line

We used the rabbit kidney epithelial lineage RK13[37]. We first established a stable Tet3G expressing cell line by transfection with the pTetOn3G vector (Clontech) using Lipofectamine 20 0 0 (ThermoFisher) and selection with 500 µg/mL G418 (Sigma-Aldrich). About three million RK13 pTetOn3G cells were then stably cotransfected with 2 µg pTRE3G HyPer cyto NES (not encoding any antibiotic resistance) and 100 ng of a selection plasmid encoding puromycin resistance by electroporation using the Nucleofector system (Lonza). The transfection was performed in Opti-MEM medium with fetal bovine

serum (FBS) (Eurobio) but without antibiotics using the pre-recorded program optimized for MDCK cells. After selection of transfected cells with 1 µg.mL -<sup>1</sup> puromycin (Sigma-Aldrich), a clonal cell line was isolated from the population by limiting dilution to maximize the level of probe expression as well as the proportion of probe-expressing cells. Aliquots of cells were frozen on the first passage after checking for the absence of mycoplasma using the MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza).

The cells were passaged to the fifth once a week in Opti-MEM medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 100 I.U.mL<sup>-1</sup>penicillin,  $100 \mu$ g.mL<sup>-1</sup> streptomycin (PS) (Eurobio),  $1 \mu$ g.mL<sup>-1</sup> puromycin and  $500 \mu$ g.mL<sup>-1</sup> G418. Cells were kept at  $37 \degree$ C under a water-saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

#### Fluorescence microscopy

Two days before acquisition, 10 0 0 cells were seeded on the coverslip of a 35 mm glass bottom dish (MatTek) in 500  $\mu$ L OptiMEM supplemented with 10% FBS and PS. Cells were incubated until they adhere to the glass (90 min at 37 °C). Then, the medium was replaced by 2 mL FluoroBrite DMEM (Gibco) with 10% FBS, 1 I.U..mL -<sup>1</sup> PS, 2 mM l -glutamine, 25 mM HEPES pH 7.3 and 1  $\mu$ g.mL -<sup>1</sup> doxycycline and the cells were incubated for 48 *h* ± 2 h at 37 °C before microscopy acquisitions.

Timelapse images were acquired using a Zeiss AxioVert.A1 wide field fluorescence microscope (LD Plan-Neofluar 40x magnification/0.6 Korr M27 dry objective) using LED illumination at 423/44 and 469/38 nm (colibri-7). Images were acquired in 12 bit using an AxioCam MR R3 imaging device (Zeiss). Two-channel time-lapse images were acquired by exciting cells sequentially at 423 and at 469 nm. Acquisition at 423 nm was performed first for each frame. For both channels, light emitted between 500 and 550 nm was collected.

The parameters used for the acquisitions must be the same for all the experiments compared with each other. To set the optimal conditions, the objective is to maximize the signal on both channels while maintaining a low phototoxicity due to the excitation itself. In particular, it is important to check that the ratio remains constant under the chosen acquisition conditions in the absence of exogenous redox treatment. The authors also recommend having an initially similar fluorescence intensity on both channels (see [20] for further details). The excitation parameters we used are summarized in Table IV (see Supplementary) for information purposes. We performed 65-minute acquisitions with 2 images per minute. After 5-min acquisition, 1 mL culture medium with a given H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration was added to the cells. Culture medium alone was added to the control cells. The .czi stacks we obtained were directly processed and analyzed using the macro presented in the present paper.

Softwares used for macro development and subsequent data analysis

- Macro development

We used the FIJI distribution of ImageJ to develop the macro, that can be executed either with the simple ImageJ or with FIJI. FIJI is an open source project based on the ImageJ software [38–40]. - R, RStudio and associated packages

R is a powerful language for statistical computing and graphics based on an open source environment highly compatible with every operating system [41]. The Rstudio interface was used for programming [42].

The following packages were used:

- . {tidyr} for data spreading [26]
- . {xlsx} for excel spreadsheet exporting [27]
- . {reshape2} for data melting [28]
- . [43] for functional PCA performing [44]
- . {ggplot2} for esthetic plotting [29]
- . {ggpubr} for p-value associated with nonparametric tests displaying on plots [30]
- . {gridExtra} for graphs faceting [31]
- . {FactoMineR} for PCA performing[32]
- . {factoextra} for PCA results visualization[33]

-MATLAB

MATLAB is a particularly suitable language for matrices manipulation. To write the script for parameters calculation, the MATLAB version 9.5.0.1033004 [45] was used.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Pierre Adenot (MIMA2, Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods, https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12) and Dorothée Baïlle (Institut Curie) for helpful advice in setting fluorescent microscopy. This research was funded by regular funding from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de Recherche en Agriculture, Alimentation et Environment (INRAE) and Institut Curie. E.L. is supported by a doctoral research fellowship from the Doctoral School ABIES, AgroParisTech. F.J., D. L., H.R., V.B., and D.M. are supported by INRAE and by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20150331689). L.V. is supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM).

## **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### **Supplementary materials**

#### Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi: 10.

#### 1016/j.mex.2020.101034.

#### References

- [1] S.-H. Park, et al., Synthetic ratiometric fluorescent probes for detection of ions, Chem. Soc. Rev. 49 (1) (2020) 143–179.
- [2] X. Li, et al., Ratiometric fluorescent probe based on ESIPT for the highly selective detection of cysteine in living cells, Talanta 194 (2019) 717–722.
- [3] V.I. Martynov, et al., Genetically encoded fluorescent indicators for live cell pH imaging, Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subjects 1862 (12) (2018) 2924–2939.
- [4] C. Gao, et al., A sensitive ratiometric fluorescent probe for quantitive detection and imaging of alkaline phosphatase in living cells, Anal. Chim. Acta 1066 (2019) 131–135.
- [5] B.C. Dickinson, V.S. Lin, C.J. Chang, Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells, Nat. Protoc. 8 (6) (2013) 1249–1259
   [6] X. Jiang, et al., Challenges and Opportunities for Small-Molecule Fluorescent Probes in Redox Biology Applications, Antioxid. Redox Signal. 29 (6) (2018) 518–540.
- [7] K.A. Lukyanov, V.V. Belousov, Genetically encoded fluorescent redox sensors, Biochim. Biophys. Acta 1840 (2) (2014) 745–756.
- [8] Y. Wen, F. Huo, C. Yin, Organelle targetable fluorescent probes for hydrogen peroxide, Chin. Chem. Lett. 30 (10) (2019) 1834–1842
- [9] L. Zhang, et al., A High-Affinity Fluorescent Sensor for Catecholamine: application to Monitoring Norepinephrine Exocytosis, Angew. Chem. Int. Ed. 58 (23) (2019) 7611–7614.
- [10] M. Xu, S.P. Kellev, T.E. Glass, A multi-component sensor system for detection of Amphiphilic compounds, Angew. Chem. Int. Ed. 57 (39) (2018) 12741–12744.
- [11] W. Zhang , et al. , Heat stroke in cell tissues related to sulfur dioxide level is precisely monitored by light-controlled fluorescent probes, J. Am. Chem. Soc. 142 (6) (2020) 3262–3268 .
- [12] Y. Yang, et al., Thiol–Chromene "Click" reaction triggered self-immolative for NIR visualization of thiol flux in physiology and pathology of living cells and mice, J. Am. Chem. Soc. 142 (3) (2020) 1614–1620.
- [13] A. Banach-Latapy, et al., Monitoring dynamic changes of glutathione redox state in subcellular compartments of human cells an approach based on rxYFP biosensor, Free Radic. Biol. Med. 75 (Suppl 1) (2014) S33.
- [14] G.T. Hanson, et al., Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators, J. Biol. Chem. 279 (13) (2004) 13044–13053.
- [15] L. Tanasugam, et al., Microspectrofluorometry by digital image processing: measurement of cytoplasmic pH, J. Cell. Biol. 98 (2) (1984) 717–724.
- [16] G.R. Bright, et al., Fluorescence ratio imaging microscopy: temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH, J. Cell Biol. 104 (4) (1987) 1019–1033.
- [17] A.J. Meyer, T.P. Dick, Fluorescent protein-based redox probes, Antioxid. Redox Signal 13 (5) (2010) 621–650
- [18] M.D. Fricker, Quantitative Redox Imaging Software, Antioxid. Redox Signal. 24 (13) (2016) 752–762.
- [19] F. Stein , et al. , FluoQ: a Tool for Rapid Analysis of Multiparameter Fluorescence Imaging Data Applied to Oscillatory Events, ACS Chem. Biol. 8 (9) (2013) 1862–1868 .
   [20] N.M. Mishina , et al. , Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe, in: Methods in Enzymology, Elsevier, 2013, pp. 45– 59
- [21] N.M. Mishina, et al., Imaging H 2 O 2 microdomains in receptor tyrosine kinases signaling, in: Methods in Enzymology, Elsevier, 2013, pp. 175–187.
- [22] N. El Banna, et al., Redox modifications of cysteine-containing proteins, cell cycle arrest and translation inhibition: involvement in vitamin C-induced breast cancer cell death, Redox Biol. 26 (2019) 101290.
- [23] E. Hatem, et al., Auranofin/Vitamin C: a Novel Drug Combination Targeting Triple-Negative Breast Cancer, J. Natl. Cancer Inst. (2019).
- [24] V.V. Belousov, et al., Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, Nat. Methods 3 (4) (2006) 281–286
- [25] D. Vilette, et al., Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (7) (2001) 4055–4059.
- [26] Wickham, H. and L. Henry, tidyr: easily Tidy Data with 'spread' and 'gather' Functions. 2019.
- [27] Dragulescu, A.A. and C. Arendt, xlsx: Read, Write, Format Excel 20 07 and Excel 97/20 0 0/XP/20 03 Files . 2018.
- [28] H. Wickham, Reshaping Data with the reshape Package, J. Stat. Softw. 21 (12) (2007) 1–20.
- [29] H. Wickham, ggplot2: Elegant Graphics For Data Analysis, Springer-Verlag, New York, 2016.
- [30] Kassambara, A., ggpubr: 'ggplot2 Based Publication Ready Plots. 2019.
- [31] Auguie, B., gridExtra: miscellaneous Functions for "Grid" Graphics. 2017.
- [32] S. Lê, J. Josse , F. Husson , FactoMineR: a Package for Multivariate Analysis, J. Stat. Softw. 25 (1) (2008) 1–18
- [33] Kassambara, A. and F. Mundt, factoextra: extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. 2017.
- [34] R. Bro , A.K. Smilde , Principal component analysis, Anal. Methods 6 (9) (2014) 2812–2831 .
- [35] O. Lyublinskaya, F. Antunes, Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H2O2 biosensor HyPer, Redox Biol. 24 (2019).
- [36] L.E. Tomalin , et al., Increasing extracellular H2O2 produces a bi-phasic response in intracellular H2O2, with peroxiredoxin hyperoxidation only triggered once the cellular H2O2buffering capacity is overwhelmed, Free Radic. Biol. Med. 95 (2016) 333–348.
- [37] G.J. Christofinis, A.J. Beale, Some biological characters of cell lines derived from normal rabbit kidney, J. Pathol. Bacteriol. 95 (2) (1968) 377–381.
- [38] C.A. Schneider , W.S. Rasband , K.W. Eliceiri , NIH Image to Imagel: 25 years of image analysis, Nat. Methods 9 (7) (2012) 671–675 .
- [39] C.T. Rueden, et al., ImageJ2: imageJ for the next generation of scientific image data, BMC Bioinform. 18 (1) (2017) 529
- [40] J. Schindelin, et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nat. Methods 9 (7) (2012) 676–682.
- [41] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019 https://www.R-project.org/ .
- [42] RStudio Team, RStudio: Integrated Development Environment for R, Studio, Inc., Boston, MA, 2018 http://www.rstudio.com/
- [43] S. van den Berg, et al., Improved solubility of TEV protease by directed evolution, J. Biotechnol. 121 (3) (2006) 291–298.
- [44] Ramsay, J.O., et al., fda: functional Data Analysis. 2018.
- [45] MATLAB, version 9.5.0.1033004 (R2018b) Update 2. 2018, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.

#### Supplementary figures

2x2 additive binning								Background subtraction																			
																										]	
A	15	15	15	15	15	15	15	15	5 15	5 1	5 ´	5 18	В			*					С					7	
	15	15	15	15	15	15	15	15	5 15	5 1	5 ·	5 15		60	60	60	60	60	60			0	U	U	U	0	U
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 10	0 1(	. oc	5 18										^	140			220	•
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 10	0 1(	00 ·	5 15		60	200			400	60			0	140			330	U
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 50	) 5	0	5 18										•	440				~
	15	15	50	50	50	50	50	50	9 50	) 5	0 ·	5 15		60	200				60			U	140				U
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 50	) 5	0	5 1										0	140				0
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 50	) 5	0	5 18		60	200				60			v	140				v
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 50	) 5	0	5 18										0	140				0
	15	15	50	50	50	50	50	50	) 50	) 5	0	5 1		60	200				60			v	140			140	Ŭ
	15	15	15	15	15	15	15	15	5 18	5 1	5 <sup>-</sup>	5 1							<b></b>			^	0	0	0	0	0
	15	15	15	15	15	15	15	15	5 15	5 1	5	5 18		60	60	60	60	60	60			U	U	U	U		U
	Dynamic range = 100-15 = 85 Dynamic ra						range =	ange = 400-60 = 330 Dynamic r						nic rang	ange = 330-0 = 330												
$\frac{\text{Signal}}{\text{Noise}} = \frac{100}{15} \simeq 6.67 \qquad \qquad \frac{\text{Sign}}{\text{Noise}}$						Signal Noise	$\frac{1}{60} = \frac{100}{15} \simeq 6.67 \qquad \qquad \qquad \frac{\text{Signal}}{\text{Noise}} \longrightarrow \alpha$				► 00																

Figure S 1: Dynamic range and signal-to-noise enhancement using additive binning and background subtraction.

A: A theoretical 12-pixel-side raw image is displayed with the grayscale value of each pixel as an overlay.

B: 2×2 additive binning increases its dynamic range despite a loss of resolution.

C: Background subtraction makes the signal-to-noise ratio tend to infinity for a homogeneous background.

These three images are displayed with the same contrast.



8 pixels radius gaussian filter

## Figure S 2: Image quality enhancement and facilitation of cell segmentation enabled by macro-provided processing

A: Raw images (left) and binned images (right) are shown with the same contrast.

B: Histograms of the same image with (red) and without (blue) 2×2 additive binning. Binning enables to enhance the dynamic range.

C: A 2 pixel-radius median filter strongly decreases the salt & pepper noise often associated with confocal microscopy acquisitions.

D: A 8 pixel-radius Gaussian filter efficiently blurs the punctiform signal associated with mitochondrial probes and thus facilitates segmentation.



#### Figure S 3: Cell segmentation and intensity quantification using the macro.

A: Example of cell segmentation using the macro. Here, following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, the cell is less bright on channel 1 (right panel, left image) than on channel 2 (right panel, middle image). The sum of both thresholded images (left panel) allows segmenting the cell accurately on all slices of each of the two channels and the ratio.

B: Default parameters, as well as parameters used for size and circularity filtering of particles to analyze, can be customized at the beginning of the script. Comments (in green) indicate the possible alternatives.

C: Principle of mean grey intensity within cell segmentation using the macro: the mask is divided by 255 so that the pixels within the cell are 1 and the background pixels are 0 (middle image). Then, the image to quantify (left) is divided by this binary image. The background pixels on the resulting image (right) are thus "not a number" (NaN). The mean grey value of the latter image is quantified by the macro. This step is repeated for both channels and ratio of each cell.

#### Supplementary tables

#### Table S1: Summary table for biological conclusions. Inconsistent conclusions are highlightened.

Parameter	Condition for parameter calculation	Conclusion
harmonic_1	none	Higher for 40 and 75 $\mu M$ than for 10 $\mu M$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Higher for 10 $\mu$ M than for 0 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
r_end	none	Higher for 40 and 75 $\mu M$ than for 10 $\mu M$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Higher for 10 $\mu$ M than for 0 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
tmax	tmax<30&rmax>2rinit	Higher for 10 $\mu M$ than for 40 and 75 $\mu M$ $H_2O_2$
rmax	none	Higher for 40 and 75 $\mu M$ than for 10 $\mu M$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Higher for 10 $\mu$ M than for 0 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
tinfl	tmax<30&rmax>2rinit	Higher for 10 than for 40 and 75 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Higher for 75 than for 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
infl	tmax<30&rmax>2rinit	Higher for 40 and 75 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> than for 10 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
rinfl	tmax<30&rmax>2rinit	Higher for 10 than for 40 and 75 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
tlag	tmax<30&rmax>2rinit	Higher for 10 than for 40 and 75 $\mu M~H_2O_2$

Table S2: Excitation parameters overview for time-lapse acquisition

	Excitation $\lambda$	Emission $\lambda$	Light source intensity	Exposure
Channel 1	423/44	525/25	8%	400 ms
Channel 2	469/38	525/25	15%	500 ms

Table S3: Sequ	ences of primers used	for cloning. Rest	triction sites are ur	nderlined. NES is
shown in bold i	italic in Oligo720.			

Primer name	Primer sequence
Oligo719 (PstI)	CCC <u>CTGCAG</u> ATGGAGATGGCAAGCCAGCAGGGCG
Oligo720 (NotI)	CCC <u>GCGGCCGC</u> TTA <b>GCCCAAGGTCAA-</b>
	GCGCTCCAAGGGGGGGCAAGCCGCCGCCAAC-
	CGCCTGTTTTAAAACTTTATCG
HyPer cyto NES for	5' CGTAAAAA <u>GTCGAC</u> ACCATGGAGATGGCAAGC
(SalI)	
HyPer cyto NES rev	5' GCTTCC <u>CATATG</u> GCCCAAGGTCAAGCG
(NdeI)	

## 3.5. Effet rédox de l'expression endogène de PrP et d'A $\beta_{1-40}$

Le premier objectif de ce projet de thèse était d'étudier l'effet sur le stress oxydant de l'expression endogène des formes physiologiques de PrP et d'A $\beta$  dans nos modèles cellulaires. Dans ce but, nous avons suivi grâce aux sondes protéiques exprimées dans le cytoplasme la réponse des cellules à différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pour évaluer l'effet de l'expression de ces protéines sur la sensibilité des cellules au stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.5.1. Réponse de la sonde HyPer dans le cytoplasme à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 3.5.1.1. Allure des courbes

Nous avons suivi grâce à la sonde HyPer les variations de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en réponse à l'ajout au milieu de culture des cellules de 0, 10, 40 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour les trois lignées cellulaires exprimant la sonde seule, la sonde et A $\beta_{1-40}$ , la sonde et PrP. Les courbes sont d'allures relativement homogènes, avec une augmentation rapide du ratio suite à l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui indique une bonne sensibilité des sondes.





Variation du ratio de HyPer en réponse à 0, 10, 40 ou 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les lignées de cellules exprimant HyPer dans le cytoplasme (ligne du haut), HyPer dans le cytoplasme et A $\beta_{1-40}$  (ligne du milieu), HyPer dans le cytoplasme et PrP (ligne du bas). Les courbes sont colorées en fonction de la date et du réplicat de chaque expérience. Les barres verticales indiquent le temps de l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.5.1.2. ACP de l'ensemble des variables quantitatives

Différents paramètres sont calculés pour décrire les courbes : le temps du point d'inflexion maximal, la pente de la courbe au niveau de ce point d'inflexion, le ratio au point d'inflexion, le temps de latence, le ratio initial, le ratio final, le ratio maximal, le temps d'apparition du ratio maximal et le score sur le premier mode de variation. La Table XVII présente les abréviations utilisées dans la suite du manuscrit. Le calcul des paramètres ainsi que le principe de l'ACP fonctionnelle et les tests statistiques utilisés sont détaillés dans la section Matériels et méthodes (2.9.2, p. 118).

Abréviation	Description
tinfl	Temps d'apparition du point d'inflexion maximal
infl	Pente de la courbe au niveau du point d'inflexion
rinfl	Ratio au point d'inflexion
tlat	Temps de latence
rinit	Ratio initial médian (au cours des 5 premières minutes d'acquisition)
rfin	Ratio final médian (au cours des 5 dernières minutes d'acquisition)
rmax	Ratio maximal
tmax	Temps d'apparition du ratio maximal
harm1	Score sur le premier mode de variation

 Table XVII : Paramètres descriptifs des courbes de réponse des sondes à H2O2

 Abréviation
 Description

Certaines de ces nouvelles variables pourraient être très corrélées entre elles, puisqu'elles donnent des informations similaires. Par exemple, tinfl et tlat sont tous deux caractéristiques de la cinétique de l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules. Regrouper les variables redondantes permettrait alors de simplifier l'analyse du jeu de courbes. Dans ce but, une ACP classique (Lê et al., 2008) est réalisée sur l'ensemble des variables quantitatives. Cette analyse permet de simplifier le jeu de données en le projetant sur un petit nombre d'axes, également appelés dimensions, et ainsi d'en obtenir une vue d'ensemble. Chaque dimension est une combinaison linéaire des différentes variables quantitatives analysées. Les deux premières dimensions de l'ACP rendent compte de 71% de la variabilité totale (Figure 64A), ce qui est suffisant pour visualiser globalement le jeu de données en deux dimensions (Duby and Robin, 2006). Sur le cercle des corrélations (Figure 64A), les variables sont colorées en fonction de la qualité de leur représentation dans le plan formé par ces deux dimensions : les variables dont le cos<sup>2</sup> est proche de 1 (vecteurs verts) sont bien représentées, celles dont le cos<sup>2</sup> est proche de 0 (vecteurs rouges) sont mal représentées. Ici, toutes les variables sont bien représentées, à l'exception du ratio au point d'inflexion et

du temps auquel le ratio maximal est atteint : l'ACP ne permettra donc pas de tirer de conclusion au sujet de ces deux dernières variables.

Parmi les variables bien représentées, deux groupes indépendants de variables fortement corrélées entre elles peuvent être identifiés : un premier groupe comporte le temps de latence, le temps du point d'inflexion maximal (fortement corrélés entre eux), et la pente au niveau de ce point d'inflexion (fortement anticorrélée aux deux premières variables). Ce groupe de variables décrit la vitesse de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement. De façon cohérente, les cellules traitées par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se situent globalement dans le quart supérieur gauche du graphe, ce qui correspond à un temps de latence et à un temps au niveau du point d'inflexion élevés et à une pente faible au niveau du point d'inflexion, autrement dit à une augmentation lente de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 64B). Le deuxième groupe de variables fortement corrélées entre elles, orthogonal au premier, comprend le score sur le premier axe de l'ACP fonctionelle, le ratio maximal et le ratio final (Figure 64A). Des valeurs élevées pour ces variables correspondent à des cellules dont la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est globalement élevée au cours de l'acquisition. Les cellules traitées par 0 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pour lesquelles les variables du premier groupe n'ont pas pu être calculées, sont, de façon logique, regroupées le long de la direction des vecteurs des variables appartenant à ce deuxième groupe, et dans le quart inférieur gauche du graphe, ce qui correspond à une concentration faible en  $H_2O_2$ . Les cellules traitées par 40 et 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se situent plutôt dans la partie droite du graphe, et présentent donc des concentrations globales en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relativement élevées et une augmentation rapide de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement (Figure 64B).

Si l'on s'intéresse aux centres de gravité des nuages de points correspondant aux cellules exprimant la sonde seule (triangle bleu),  $A\beta_{1-40}$  (cercle violet) et PrP (carré vert), on peut remarquer que les centres de gravité des cellules exprimant  $A\beta_{1-40}$  et PrP sont très proches l'un de l'autre, et plus proches de la partie gauche du graphe que le centre de gravité des cellules n'exprimant que la sonde (Figure 64B). Cela suggère que les cellules exprimant

 $A\beta_{1-40}$  ou PrP présentent une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> globalement moins élevée et dont l'augmentation est plus lente par rapport aux cellules exprimant la sonde seule. Cela suggère que l'expression d'A $\beta_{1-40}$  et PrP atténue l'effet pro-oxydant du traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 64 : Résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des variables quantitatives** A : Cercle des corrélations. Les variables sont colorées en fonction de la qualité de leur représentation dans le plan formé par les deux premiers axes : plus le cos<sup>2</sup> d'une variable est proche de 1 (vecteurs verts), mieux elle est représentée. Plus son cos<sup>2</sup> est proche de 0 (vecteurs rouges), moins bien elle est représentée.

B : Projection de l'ensemble des individus dans le plan formé par les deux premiers axes de l'ACP. La forme des points et la couleur de leur contour indiquent le polypeptide exprimé de façon endogène. La couleur de remplissage des points indique la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisée. Le cercle violet, le carré vert et le triangle bleu de plus grande taille, proches de l'origine, présentent les centres de gravités des nuages de points correspondant aux cellules exprimant respectivement A $\beta_{1-40}$ , PrP et la sonde seule.

## 3.5.1.3. Analyse quantitative des paramètres descriptifs

L'ACP suggère ainsi un effet protecteur de l'expression de PrP et d'A $\beta$ , mais ne permet pas de conclure quant à sa significativité. Nous avons donc comparé par des tests statistiques les différents paramètres descriptifs calculés avec et sans expression de PrP et d'A $\beta$ .

## 3.5.1.3.1. Concentrations initiales en $H_2O_2$

Dans un premier temps, les ratios initiaux, représentatifs de la concentration cytoplasmique initiale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sont comparés en fonction du polypeptide exprimé de façon endogène : les valeurs de ratio correspondant aux 5 premières minutes de chaque courbe sont extraites et, pour chaque cellule, le ratio initial médian est calculé (Figure 65). Malgré l'effectif élevé, on n'observe pas de différence significative entre les ratios initiaux des trois lignées cellulaires (Figure 65), ce qui indique que l'expression endogène d'Aβ<sub>1-40</sub> et PrP pendant 48 h n'a pas d'influence observable sur la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence de traitement.



Figure 65 : Concentration initiale en  $H_2O_2$  avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP Les ratios médians des cinq premières minutes d'acquisition sont calculés pour chaque cellule.

## 3.5.1.3.2. Cinétique d'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les paramètres permettant de décrire la cinétique de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement exogène par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont calculés et comparés avec et sans expression endogène d'A $\beta_{1-40}$  et PrP :

- Temps auquel le ratio maximum est atteint
- Temps d'apparition du point d'inflexion maximal
- Temps de latence
- Pente au point d'inflexion.

La Figure 66 présente le détail de la comparaison de ces paramètres avec et sans expression d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP pour les différentes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testées. Ces paramètres n'ont de sens que pour les courbes qui présentent un point d'inflexion, ce qui explique qu'ils ne soient pas calculés pour les cellules exposées à 0 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dont les courbes de ratio sont relativement constantes.

Pour les cellules exprimant A $\beta_{1-40}$ , le temps auquel le ratio maximal est atteint (Figure 66A), le temps du point d'inflexion maximal (Figure 66B) et le temps de latence (Figure 66C) sont plus élevés que pour les cellules n'exprimant que la sonde suite aux traitements par 10 et 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cela indique que l'expression d'A $\beta_{1-40}$  rend l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus tardive suite à ces deux traitements. La pente au point d'inflexion est plus faible pour les cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  suite aux traitements par 10 et 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 66D) : l'expression d'A $\beta_{1-40}$  est donc associée à une augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus lente suite aux traitements par 10 et 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>, le temps du ratio maximal (Figure 66A) et le temps de latence (Figure 66C) sont plus élevés que pour les cellules n'exprimant que la sonde suite au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et le temps du point d'inflexion (Figure 66B) est plus élevé suite aux traitements par 10 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cela indique que l'expression de la PrP<sup>C</sup> retarde l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : à cette concentration, les conclusions tirées grâce à ces trois temps caractéristiques sont en effet cohérentes entre elles. La pente au point d'inflexion est plus faible pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> suite au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donc l'expression de la PrP<sup>C</sup> retarde à ce traitement l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus lente suite à ce traitement l'augmentation de la concentration cytoplasmique au point d'inflexion est plus faible pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> suite au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donc l'expression de la PrP<sup>C</sup> retarde terment également l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus lente suite à ce traitement.



Figure 66 : Paramètres descriptifs de la cinétique de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  avec et sans expression d' $A\beta_{1-40}$  et PrP

A : Temps auquel le ratio maximal est atteint.

- B : Temps auquel le point d'inflexion maximal est atteint.
- C : Temps de latence.

D : Pente au niveau du point d'inflexion maximal.

Les comparaisons en vert correspondent à des différences significatives au seuil de 5% après correction de Holm-Bonferroni.

L'expression d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP rend ainsi l'augmentation du ratio à la fois plus tardive et plus lente suite au traitement par des concentrations de 10 ou 40 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour A $\beta_{1-40}$ , et de 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour PrP. Or, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est capable d'induire un stress oxydant cellulaire, toxique (Coyle et al., 2006). L'atténuation de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'expression d'A $\beta_{1-40}$  ou PrP peut donc être interprétée comme un effet protecteur de ces polypeptides vis-à-vis du stress oxydant induit par ce traitement.

#### 3.5.1.3.3. Concentration cytoplasmique globale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les paramètres permettant de décrire la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en certains points clés et de façon globale sont également calculés et comparés entre eux :

- Le ratio au point d'inflexion
- Le ratio maximal
- Le ratio final
- Le score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle (qui représente ici 98,7% de la variabilité).

Les comparaisons sont présentées sur la Figure 67.

L'expression d'A $\beta_{1-40}$  ne modifie pas le ratio au point d'inflexion (Figure 67A). Par rapport aux cellules exprimant la sonde seule, elle est associée à un ratio maximal plus faible suite au traitement par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 67B), à un ratio final plus faible suite aux traitements par 0 et 75 d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 67C) et à un score plus faible sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle suite au traitement par 40 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 67D). Ces trois derniers paramètres suggèrent donc une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible pour les cellules exprimant A $\beta_{1-40}$ , mais pas pour les mêmes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogènes. On ne peut donc pas tirer de conclusion définitive quant à l'effet d'A $\beta_{1-40}$  sur la concentration cytoplasmique globale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, même si ce peptide semble plutôt associé à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible.

L'expression de la PrP<sup>C</sup> est associée à un ratio plus faible au point d'inflexion suite au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 67A), à un ratio maximal plus faible suite aux traitements par 0 et 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 67B), à un ratio final plus faible suite au traitement par 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 67C) et à un score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle plus faible suite au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, à l'exception du ratio final, tous ces paramètres indiquent que l'expression de la PrP<sup>C</sup> conduit à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativement plus faible en réponse au traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A part le score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle, ils indiquent également une concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible suite au traitement par 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c'est-à-dire en réponse à la seule acquisition.



Figure 67 : Paramètres descriptifs de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement, en différents points clés et de manière globale

A : Ratio au niveau du point d'inflexion.

B : Ratio maximal.

- C : Ratio final médian calculé sur les 5 dernières minutes de l'acquisition.
- D : Score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle.

L'expression endogène d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP<sup>C</sup> sont ainsi protectrices vis-à-vis d'un traitement oxydant exogène dans nos modèles cellulaires. L'analyse détaillée des courbes indique qu'A $\beta_{1-40}$  est capable de ralentir et de retarder l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais son effet sur la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des points clés apparaît incertain. La PrP<sup>C</sup>, quant à elle, est à la fois associée à une augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ralentie et retardée, et à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible suite au traitement pro-oxydant. Cela implique probablement des mécanismes de protection différents pour les deux polypeptides. Cet effet protecteur n'est observable que pour des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suffisamment faibles : 10 et 40 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour A $\beta$ , et 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour PrP. Le traitement par 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait conduire à un stress oxydant trop élevé pour être modulable par l'expression de ces polypeptides. Le fait qu'A $\beta_{1-40}$  soit protecteur vis-à-vis de concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevées que PrP pourrait être dû, soit à la différence des mécanismes en jeu, soit à sa concentration molaire plus élevée dans les cellules (Table XV, p. 152).

#### 3.5.2. Réponse de la sonde Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le suivi de la sonde HyPer met donc en évidence un effet protecteur de l'expression endogène de PrP<sup>C</sup> et d'A $\beta_{1-40}$  vis-à-vis de traitements exogènes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui se traduit par un ralentissement et un retard dans l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement, et, concernant PrP, à une atténuation de cette augmentation. Comme le glutathion est l'un des antioxydants les plus efficaces et abondants dans les cellules, il est envisageable qu'il soit impliqué dans cet effet antioxydant.

#### 3.5.2.1. Allure des courbes

Pour analyser le rôle potentiel du glutathion dans l'effet protecteur exercé par PrP<sup>C</sup> et A $\beta_{1-40}$  vis-à-vis des traitements par certaines concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons suivi les variations du niveau d'oxydation du glutathion cytoplasmique en réponse à des traitements par 0, 10, 40 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les lignées de cellules exprimant la sonde Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme, avec et sans expression de PrP ou d'A $\beta_{1-40}$ . La Figure 69 présente les variations du ratio de la sonde Grx1-roGFP2 cytoplasmique dans les trois lignées cellulaires exprimant la sonde seule, la sonde et PrP ou la sonde et A $\beta$ .

Les courbes sont hétérogènes, tout particulièrement pour la lignée de cellules exprimant A $\beta_{1-40}$  (Figure 69). L'intensité de fluorescence de cette lignée est très faible avec les paramètres d'excitation utilisés, tout particulièrement sur le canal correspondant au point isobestique de la sonde, ce qui conduit à une plus grande variabilité des résultats et à des courbes bruitées, puisque le dénominateur du ratio est proche de 0.





Pour n'analyser que des courbes raisonnablement bruitées et moins hétérogènes, nous avons donc fait le choix d'éliminer les points pour lesquels l'intensité de fluorescence est trop faible sur le canal correspondant au point isobestique de la sonde (acquisition à 423 nm). Pour choisir le seuil appliqué, nous nous sommes basés sur le graphe représentant le ratio en fonction de l'intensité de fluorescence suite à l'excitation à 423 nm (Figure 69A). Les cellules pour lesquelles cette intensité de fluorescence est trop faible ont un ratio extrêmement variable. Le seuil de 75 niveaux de gris permet d'éliminer ces données très bruitées, tout en conservant un maximum de courbes. La Figure 69B présente les courbes retenues, qui sont relativement homogènes entre elles. L'intensité de fluorescence des cellules coexprimant Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme avec A $\beta_{1-40}$  étant inférieure au seuil fixé ((Figure 69A), points orange), ces cellules ont toutes été éliminées de l'analyse : nous ne pourrons donc comparer le niveau d'oxydation du glutathion en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que pour les cellules exprimant la sonde seule et en coexpression avec PrP. Pour ces deux lignées, environ 10% des courbes ont été éliminées de l'analyse (21 courbes sur un total de 190).



Figure 69 : Elimination des données les plus bruitées de cinétique de l'oxydation du glutathion cytoplasmique en réponse à différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A : Ratio en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée sur l'acquisition à 423 nm pour chaque point analysé.

B : Variation du ratio de Grx1-roGFP2 en réponse à 0, 10, 40 ou 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les lignées de cellules exprimant Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme, seule (ligne du haut) ou en coexpression avec PrP (ligne du bas), après élimination des données issues des cellules de faible intensité de fluorescence. Les courbes sont colorées en fonction de la date et du réplicat de chaque expérience.

Que les cellules expriment ou non PrP, le ratio reste relativement constant en fonction du temps pour les cellules exposées à 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 69B, première colonne), ce qui confirme l'absence de phototoxicité importante de ces conditions d'imagerie. Le glutathion s'oxyde rapidement en réponse à 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui montre une bonne sensibilité de la sonde, puis le niveau d'oxydation diminue faiblement avant d'atteindre un plateau (Figure 69B, deuxième colonne). Pour les cellules traitées par 40 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 69B, troisième et quatrième colonne), la plupart des courbes ont une allure similaire à celle qui est observée pour les réponses à 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais avec un ratio maximal qui semble plus élevé, et une plus grande amplitude entre le maximum atteint et le plateau final. Quelques cellules présentent une deuxième augmentation du ratio en fin d'acquisition, surtout parmi celles qui sont traitées par 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 69, deux colonnes de droite). Le phénotype des cellules donnant ce type de réponse paraît normal (voir la Figure 70 pour un exemple). Environ 15% des courbes présentent ce type de profil.



Figure 70 : Deux réplicats de suivi de la réponse de Grx1-roGFP2 à 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A : Aperçu de deux acquisitions réalisées dans les mêmes conditions, avec des cellules coexprimant Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme et PrP, avec ajout de 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'acquisition. Chaque ligne correspond à un réplicat. Les images acquises une minute avant l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (première colonne), deux minutes après l'ajout (deuxième colonne), quinze minutes après l'ajout (troisième colonne) et une heure après l'ajout (quatrième colonne) sont extraites, leur ratio est calculé et visualisé par de fausses couleurs, indiquées par la barre de calibration (à droite).

B : Courbes de ratio moyennes sur les deux champs visualisés à gauche. Le graphe du haut correspond au champ 1 et le graphe du bas au champ 2.

## 3.5.2.2. Analyse quantitative des paramètres descriptifs

L'objectif de cette section est d'analyser l'influence de l'expression de la PrP<sup>C</sup> (i) sur le niveau d'oxydation basal du glutathion, (ii) sur la cinétique d'oxydation du glutathion en réponse à un traitement exogène par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et (iii) sur le niveau d'oxydation du glutathion, global et en différents points clés, suite au traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.5.2.2.1. Niveau d'oxydation initial du glutathion

La Figure 71 compare les ratios initiaux médians de la sonde, calculés sur les cinq premières minutes d'acquisition. Malgré les effectifs élevés, le test de Mann-Whitney n'est pas significatif. Cela indique que l'expression de PrP pendant 48 heures ne modifie pas de façon significative le niveau d'oxydation basal du glutathion dans ces cellules.



**Figure 71 : Niveau d'oxydation initial du glutathion avec et sans expression de PrP** Les ratios médians des cinq premières minutes d'acquisition sont calculés pour chaque cellule. Les points sont colorés en fonction de la date et du réplicat de chaque expérience.

#### 3.5.2.2.2. Cinétique de l'oxydation du glutathion

La Figure 72 présente les paramètres décrivant la cinétique de l'oxydation du glutathion suite à l'ajout exogène d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : temps auquel le ratio maximum est atteint, temps d'apparition du point d'inflexion maximal, temps de latence et pente au point d'inflexion. Ces paramètres ne sont calculés que sur les vingt-cinq premières minutes d'acquisition, de façon à ne considérer que la première augmentation du ratio, qui fait suite à l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et pas le deuxième pic qui apparaît pour certaines courbes. Ces paramètres n'ont de plus pas de sens pour les courbes plates : nous avons donc conservé pour leur calcul uniquement les courbes dont le ratio maximal est supérieur à 1,2 fois le ratio mesuré après 5 min d'acquisition, donc juste avant l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce filtre a conduit à l'élimination de la totalité des courbes de réponse à 0 et 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour les courbes de réponse à 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le filtre a éliminé 67% des 21 courbes correspondant aux cellules exprimant la sonde seule, et seulement 33% des 24 courbes correspondant aux cellules exprimant PrP, ce qui correspond à 49% du total des courbes. Pour les courbes de réponse à 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 41% des 17 courbes correspondant aux cellules exprimant la sonde seule et 18% des 28 courbes correspondant aux cellules exprimant PrP sont considérées comme plates et éliminées, ce qui correspond à 30% du total des courbes. Ainsi, les paramètres calculés avec ces courbes doivent être considérés avec précaution, car une part non négligeable de courbes a dû être éliminée de l'analyse. Il est néanmoins intéressant de noter que, que ce soit en réponse à 40 ou à 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il y a une plus grande proportion de courbes plates ou presque plates pour les cellules n'exprimant que la sonde que pour les cellules coexprimant la sonde avec la PrP<sup>C</sup> : cela pourrait suggérer que l'oxydation du glutathion en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est plus importante en présence de PrP<sup>C</sup>.

Malgré le faible effectif, le point d'inflexion maimal est atteint significativement plus vite avec expression de PrP suite à l'exposition à 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 72B), et le temps de latence est significativement plus faible pour les cellules exprimant PrP suite au traitement par 40 et 75 M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 72C).



# Figure 72 : Paramètres descriptifs de la cinétique d'oxydation du glutathion dans la réponse précoce à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- A : Temps auquel le premier ratio maximal est atteint.
- B : Temps auquel le premier point d'inflexion est atteint.
- C : Temps de latence de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- D : Pente de la courbe de ratio au niveau du premier point d'inflexion.

Il semble donc que l'expression de la  $PrP^{C}$  soit associée à une oxydation plus rapide du glutathion en réponse au traitement par 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et peut-être par 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le fait que les tests sur le temps du ratio maximal et sur la pente au point d'inflexion ne soient pas significatifs pourrait être dû aux effectifs trop faibles.

## 3.5.2.2.3. Proportion globale de glutathion oxydé dans le cytoplasme

Les paramètres graphiques présentés sur le panel du haut de la Figure 73 décrivent ici la proportion de glutathion oxydé en certains points clés et de façon globale :

- Le ratio au point d'inflexion
- Le ratio maximal
- Le ratio final
- Le score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle (qui représente ici 99,9% de la variabilité).

A l'exception du ratio au point d'inflexion, ces paramètres ont pu être calculés sur l'ensemble des courbes correspondant à des cellules suffisamment brillantes : les effectifs sont donc plus élevés et les résultats risquent moins d'être biaisés que ceux du paragraphe précédent.

L'expression de la PrP<sup>C</sup> par les cellules est associée à un ratio plus élevé au point d'inflexion suite au traitement par 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 73A), à un ratio maximal plus élevé suite aux traitements par 0 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 73B), à un ratio final médian plus élevé suite au traitement par 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 73C) et à un score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle plus élevé suite aux traitements par 0 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Figure 73 : Paramètres descriptifs de la proportion de glutathion oxydée, en différents points et de manière globale, après un traitement par  $H_2O_2$ 

- A : Ratio au niveau du premier point d'inflexion.
- B : Ratio maximal au cours de l'acquisition.
- C : Ratio final médian calculé sur les 5 dernières minutes de l'acquisition.
- D : Score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle.

Il apparaît que la proportion de glutathion oxydé est plus importante pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> suite au traitement par 0 et par 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à la fois au niveau des points observés et de manière globale. Pour les cellules traitées par 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les expériences avec la sonde HyPer ont montré que l'expression de PrP limitait la légère augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due à la légère phototoxicité de l'acquisition. Il est possible que cet effet soit dû à l'oxydation plus importante du glutathion mise en évidence par ces expériences, qui pourrait être couplée à la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cet effet n'est retrouvé ni pour les cellules traitées par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ni pour les cellules traitées par 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour ces dernières, l'oxydation du glutathion en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est plus rapide en présence de PrP<sup>C</sup>, mais pas plus importante. Pour les cellules traitées par 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'oxydation du glutathion en réponse au traitement est plus rapide en présence de PrP<sup>C</sup>, mais également plus importante.

Globalement, pour les traitements par de faibles concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'expression de la PrP est associée à une augmentation plus lente de la concentration cytoplasmique en

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui peut être interprété comme un effet protecteur de la protéine vis-à-vis du stress oxydant. Cet effet est associé à une augmentation plus rapide ou plus forte de la proportion de glutathion oxydé dans le cytoplasme. On peut donc penser que la PrP<sup>C</sup> facilite le couplage entre oxydation du glutathion et réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : un rôle des glutathion péroxydases, qui catalysent cette réaction, est donc envisageable.

#### 3.5.3. Contrôle de l'absence d'effet rédox de l'expression des sondes

Comme les sondes peptidiques codées génétiquement sont des couples rédox, il n'est pas impossible que leur seule expression ait une influence sur le stress oxydant cellulaire, particulièrement pour la sonde Grx1-roGFP2 : en effet, la surexpression de la glutarédoxine est capable de protéger différents modèles cellulaires vis-à-vis du stress oxydant, y compris induit par Aβ (Akterin et al., 2006; Pham et al., 2015). Comme l'expression des sondes par nos modèles cellulaires est hétérogène d'une cellule à l'autre, ce qui se traduit par des niveaux de fluorescence variables, nous avons souhaité vérifier que cette variabilité de niveau d'expression de la sonde et, le cas échéant, de la surexpression de Grx1, n'était pas corrélée à la variabilité observée dans les réponses des cellules à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène. Dans ce but, nous nous sommes intéressés à la relation entre, d'une part, l'intensité de fluorescence des cellules avant tout traitement rédox, qui est associée à la concentration de la sonde (et donc, pour les cellules exprimant Grx1-roGFP2, au niveau de surexpression de Grx1), et, d'autre part, le score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle, qui peut être considéré comme représentatif du stress oxydant, puisqu'il est associé à la concentration globale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour les cellules exprimant HyPer et au niveau global d'oxydation du glutathion pour les cellules exprimant Grx1-roGFP2. La Figure 74 présente les résultats obtenus pour les 5 lignées cellulaires utilisées, avec les 4 concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testées. Globalement, il ne se dégage pas de relation entre intensité de fluorescence initiale de chaque cellule et score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle et les p-valeurs associées aux tests de corrélation de Spearman sont pour la plupart supérieurs à 5%, ce qui confirme qu'il n'y a pas de corrélation significative entre ces deux variables. Ainsi, dans nos expériences, les différences de stress oxydant observées entre les différentes lignées cellulaires ne peuvent pas être imputées à la seule différence d'expression des sondes.



Expérience 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 Expérience 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 Expérience 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 Figure 74 : Corrélation entre score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle et intensité de fluorescence

A : Relation entre l'intensité de fluorescence initiale sur l'acquisition à 469 nm et score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle pour les cellules exprimant HyPer dans le cytoplasme avec et sans coexpression avec A $\beta_{1-40}$  ou PrP.

B : Relation entre l'intensité de fluorescence initiale sur l'acquisition à 469 nm et le score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle pour les cellules exprimant Grx1-roGFP2 dans le cytoplasme, seule ou en coexpression avec PrP.

R est le coefficient de corrélation des rangs de Spearman et p est la p-valeur associée au test d'hypothèse nulle H0 = « R=0 ».

#### 3.5.4. Conclusion

Nos résultats indiquent ainsi que l'expression de la PrP protège les cellules vis-à-vis de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par les traitements exogènes par 0 et 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et est associée à une oxydation du glutathion plus rapide suite aux traitements exogènes par 40 et 75  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et, plus élevée en réponse à 0  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On peut donc penser que la PrP<sup>C</sup> favorise le couplage entre réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et oxydation du glutathion, ce qui pourrait indiquer un rôle des glutathion péroxydases.

L'expression par les cellules d'A $\beta_{1-40}$  atténue l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite à des traitements exogènes par 10 et 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le fait qu'A $\beta$ soit protecteur vis-à-vis de concentrations plus élevées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que PrP pourrait indiquer un mécanisme différent : en effet, la glutathion péroxydase est la principale enzyme catalysant la réduction d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jusqu'à 10  $\mu$ M. La réduction des plus grandes quantités d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est principalement catalysée par la catalase (Makino et al., 1994).

## 3.6. Effet de différents assemblages d'Aβ<sub>1-40</sub> et de PrP recombinants sur le stress oxydant

Dans les conditions physiologiques normales, nos travaux indiquent que la PrP<sup>C</sup> est protectrice vis-à-vis d'un oxydant exogène, ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui la décrivent comme neuroprotectrice et antioxydante. La littérature montre qu'elle joue par ailleurs un rôle de récepteur à différents assemblages de protéines. Dans les conditions physiologiques, elle pourrait avoir une fonction de récepteur au monomère d'A<sub>β1-40</sub> (voir partie 3.1, p. 123). Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, elle joue un rôle dans la médiation de la toxicité de certains assemblages, notamment oligomériques, d'Aß (Salazar and Strittmatter, 2017). Elle est essentielle pour la médiation de la toxicité de la PrP<sup>Sc</sup> dans le cadre des maladies à prions (Cronier et al., 2012; Evans and Millhauser, 2017) et, dans la pathogénèse de ces maladies, elle pourrait favoriser la cytotoxicité de certains assemblages subfibrillaires de PrP (Simoneau et al., 2007). Comme le stress oxydant est central dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives auxquelles ces assemblages sont associés, leur cytotoxicité pourrait passer par un stress oxydant, qui pourrait dépendre de l'expression de la PrP<sup>C</sup>. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la réponse rédox des cellules exprimant ou non la PrP<sup>C</sup> à différents assemblages de protéines se rapprochant d'assemblages pathologiques.

#### 3.6.1. Production et caractérisation des assemblages de protéines

De façon à utiliser des assemblages de PrP et d'A $\beta_{1-40}$  homogènes et bien caractérisés, nous avons utilisé du peptide A $\beta_{1-40}$  et de la PrP (allèle VRQ) recombinants produits au laboratoire. Nous nous sommes intéressés à l'effet sur le stress oxydant du peptide A $\beta_{1-40}$  sous forme de monomère, espèce majoritaire dans les conditions physiologiques, ou de fibres,

214

similaires à celles constituant les plaques séniles observées dans le cerveau de certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Nous nous sommes également intéressés à l'effet sur le stress oxydant de la protéine prion sous formes monomérique, oligomérique et fibrillaire.

La préparation du monomère d'A<sub>β1-40</sub> recombinant est décrite en détails dans la section Matériels et méthodes. Les fibres d'A<sub>β1-40</sub> sont formées *in vitro* à partir du même lot de peptide recombinant monomérique. Un premier lot de fibres est préparé en présence de thioflavine T (ThT). L'augmentation de la fluorescence de la ThT démontre que les assemblages obtenus sont des fibres amyloïdes, mais elle empêche leur utilisation directe pour les expériences de microscopie. En effet, en présence des fibres amyloïdes, la ThT est très fluorescente, avec un maximum d'excitation à 450 nm et un maximum d'émission à 482 nm (Naiki et al., 1989). Ce signal est donc visible sur le canal 2 de l'acquisition en time-lapse (Table X, p. 106), ce qui conduit à un très fort bruit de fond sur ce canal qui fausse la quantification de la fluorescence des sondes. Nous avons donc utilisé des fibres d'Aβ<sub>1-40</sub> produites sans ThT, dont la formation a été amorcée par une petite quantité de ce premier lot de fibres. Les fibres utilisées ont été observées par microscopie à force atomique (Figure 75A). On ne détecte ni oligomère ni agrégat amorphe, les assemblages d'Aß observés sont de longues fibres qui semblent pour la plupart formées d'au moins deux protofilaments torsadés (Figure 75A). Ce type de structure en torsade a été décrit dans la littérature (Figure 14, p. 50), par exemple pour des fibres d'A<sub>β1-42</sub> formées *in vitro*, que ce soit *de novo* (Gremer et al., 2017) ou à partir d'une amorce de fibres extraites d'un cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (Lu et al., 2013).

De même, les oligomères et les fibres de PrP sont préparés à partir du même lot de protéine VRQ monomérique recombinante, dont la préparation est décrite dans la section Matériels et méthodes. La simple incubation de la protéine prion recombinante à 55°C pendant 6 heures conduit à son agrégation en plusieurs populations d'oligomères, dont les plus gros sont purifiés par chromatographie d'exclusion de taille (Figure 32, 115). Ces oligomères sont polydisperses et ont des tailles comprises entre 20 et 50 protomères (Armiento et al., 2017). Ils sont cytotoxiques sur des neurones primocultivés : une mort
cellulaire significative est observée après 72 heures d'exposition à des concentrations de 2,78 à 5,56  $\mu$ M équivalent monomère (Simoneau et al., 2007). Des expériences menées au laboratoire ne montrent en revanche pas d'infectiosité de ces oligomères chez la souris. Les fibres de PrP sont formées *in vitro* comme décrit dans la section Matériels et méthodes, puis caractérisés par microscopie à force atomique. Les assemblages observés sont bien des fibres, plus courtes que celles d'A $\beta$ , et semblant s'assembler entre elles par coalescence (Figure 75B), probablement en raison de leur concentration élevée. Des travaux en cours dans l'équipe montrent que ces fibres sont infectieuses chez des souris transgéniques.



Figure 75 : Observation des fibres d'A $\beta_{1-40}$  et de PrP recombinant par microscopie à force atomique (H. Klute)

A : Observation des fibres d'A $\beta_{1-40}$  recombinant.

B : Observation des fibres de PrP recombinante.

Les fibres sont diluées à une concentration de 0,2 µM équivalent monomère en tampon citrate de sodium pH 3,4 puis déposées sur mica. L'échantillon adsorbé est lavé trois fois puis sa surface est couverte de tampon puis observée avec un AFM Bruker Nano GmbH (JPK) équipé d'un cantilever qPBioAC CB2 en mode *quantitative imaging* (QI).

### 3.6.2. Présentation des expériences et analyse globale des résultats

Nous avons suivi la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  dans les cellules pendant 3 heures juste après l'ajout des assemblages, puis pendant 35 min après 24 et 48 heures d'incubation avec les assemblages. Cette concentration en  $H_2O_2$  a été choisie car l'expression de la  $PrP^{C}$  exerce un effet protecteur vis-à-vis de ce traitement dans nos modèles cellulaires, il est donc intéressant de voir si cet effet protecteur est renforcé ou, au contraire, aboli, par la potentielle interaction de la  $PrP^{C}$  avec les assemblages. Les assemblages sont utilisés à une concentration de 10  $\mu$ M. C'est la gamme de concentrations à laquelle des effets cytotoxiques ou des effets sur l'homéostasie rédox ont pu être mis en évidence *in cellulo* pour différents assemblages d'A $\beta$  (Kontush, 2001) et de PrP (Simoneau et al., 2007). La Figure 76 présente de façon schématique les expériences réalisées. Chaque expérience est répliquée trois fois.



# Figure 76 : Expériences de suivi de la sonde HyPer en réponse à des assemblages exogènes d'A $\beta_{1-40}$ et de PrP

Deux boîtes sont ensemencées avec des cellules de la lignée à analyser : il peut s'agir de cellules exprimant HyPer dans le cytoplasme, ou coexprimant HyPer dans le cytoplasme avec PrP. L'expression de la sonde et éventuellement de PrP est induite par la doxycycline pendant 48 heures. Les assemblages d'A $\beta_{1-40}$  ou de PrP sont ajoutés simultanément sur les deux boîtes. Pour l'une des deux boîtes, cet ajout est effectué après 10 minutes d'acquisition en microscopie à fluorescence. La fluorescence des sondes suite à l'ajout des assemblages est suivie pendant 3 heures. Pour la deuxième boîte, la fluorescence des sondes est suivie pendant 3 heures. Pour la deuxième boîte, la fluorescence des sondes est suivie pendant 3 heures. Pour la deuxième boîte, la fluorescence des sondes est suivie pendant 3 heures 23,5 puis 47,5 heures d'exposition aux assemblages (sur deux champs différents). A l'issue de cette deuxième acquisition, une acquisition de 65 min est lancée sur le même champ, avec ajout de 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 5 min d'acquisition.

On obtient ainsi quatre jeux de courbes : un pour chaque temps d'exposition aux assemblages. Ces jeux de courbes doivent être analysés séparément. Comme précédemment, chaque courbe est décrite par une ou plusieurs variables quantitatives.



# Figure 77 : Scores sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle après différents temps d'exposition aux assemblages de protéines

A, B, C : Courbes obtenues 0 à 3 h après exposition aux assemblages (A), 23,5 à 24 h après exposition aux assemblages (B) et 47,5 à 48 h d'exposition aux assemblages, colorées en fonction de leur score sur le premier mode de variation.

D, E, F : Comparaisons du score sur le premier mode de variation entre les cellules exposées aux assemblages et les cellules exposées au tampon pour les différents temps d'exposition (de gauche à droite : 0 à 3 h, 23,5 à 24 h et 47,5 à 48 h).

G, H, I : Comparaison du score sur le premier mode de variation entre les cellules exprimant PrP et les cellules n'exprimant que la sonde suite à l'exposition aux differents assemblages pour les trois temps d'exposition (de gauche à droite : 0 à 3 h, 23,5 à 24 h et 47,5 à 48 h).

A $\beta$ m : monomère d'A $\beta_{1-40}$  ; tp A $\beta$ m : tampon de reprise du monomère d'A $\beta_{1-40}$  ; A $\beta$ f : fibres d'A $\beta_{1-40}$  ; tp A $\beta$ f : tampon de reprise des fibres d'A $\beta_{1-40}$  ; PrPm : monomère de PrP ; PrPf : fibres de PrP ; tp PrPm/f : tampon de reprise du monomère et des fibres de PrP ; PrPo : oligomères de PrP ; tp PrPo : tampon de reprise des oligomères de PrP.

Concernant les images acquises sans ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les courbes ont une allure presque linéaire et le calcul des paramètres cinétiques n'est pas possible, mais elles sont quasi-parfaitement décrites par leur premier mode de variation : chaque courbe est donc résumée par son score sur cette harmonique (Figure 77A, B, C). Ce score est ensuite comparé (i) entre les cellules exposées à chaque assemblage et au tampon correspondant, que les cellules expriment ou non PrP (Figure 77D, E, F), et (ii) entre les cellules exprimant ou non PrP, pour chacun des assemblages testés (Figure 77G, H, I).

Concernant les courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 48 heures d'exposition aux assemblages, les paramètres descriptifs sont calculés et analysés. Les valeurs de chaque paramètre sont comparées, d'une part entre cellules exposées à l'assemblage de protéines et cellules exposées au tampon correspondant (Figure 78), et d'autre part entre cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> et cellules n'exprimant que la sonde (Figure 78).



Figure 78 : Paramètres descriptifs des courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de l'exposition ou non à des assemblages de protéines

- A : Temps auquel le ratio maximal est atteint (min).
- B : Temps auquel le point d'inflexion maximal est atteint (min).
- C : Temps de latence (min).
- D : Pente du ratio au niveau du point d'inflexion (min<sup>-1</sup>).
- E : Ratio au niveau du point d'inflexion (sans dimension).
- F : Ratio initial médian au cours des 5 premières minutes d'acquisition (sans dimension).
- G : Ratio maximal (sans dimension).
- H : Ratio final médian au cours des 5 dernières minutes d'acquisition (sans dimension).
- I : Score sur le premier mode de variation (sans dimension).

Les p-valeurs en vert et en orange correspondent à des tests significatifs au seuil de 5% après correction de Holm-Bonferroni.

 $A\beta m$ : monomère d' $A\beta_{1-40}$ ; tp  $A\beta m$ : tampon de reprise du monomère d' $A\beta_{1-40}$ ;  $A\beta f$ : fibres d' $A\beta_{1-40}$ ; tp  $A\beta f$ : tampon de reprise des fibres d' $A\beta_{1-40}$ ; PrPm : monomère de PrP ; PrPf : fibres de PrP ; tp PrPm/f : tampon de reprise du monomère et des fibres de PrP ; PrPo : oligomères de PrP ; tp PrPo : tampon de reprise des oligomères de PrP



### Figure 79 : Paramètres descriptifs des courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de l'expression de PrP ou non

- A : Temps auquel le ratio maximal est atteint (min).
- B : Temps auquel le point d'inflexion maximal est atteint (min).
- C : Temps de latence (min).
- D : Pente du ratio au niveau du point d'inflexion (min<sup>-1</sup>).
- E : Ratio au niveau du point d'inflexion (sans dimension).
- F : Ratio initial médian au cours des 5 premières minutes d'acquisition (sans dimension).
- G : Ratio maximal (sans dimension).

H : Ratio final médian au cours des 5 dernières minutes d'acquisition (sans dimension). I : Score sur la première harmonique de l'AP fonctionnelle (sans dimension).

A $\beta$ m : monomère d'A $\beta_{1-40}$ ; tp A $\beta$ m : tampon de reprise du monomère d'A $\beta_{1-40}$ ; A $\beta$ f : fibres d'A $\beta_{1-40}$ ; tp A $\beta$ f : tampon de reprise des fibres d'A $\beta_{1-40}$ ; PrPm : monomère de PrP ; PrPf : fibres de PrP ; tp PrPm/f : tampon de reprise du monomère et des fibres de PrP ; PrPo : oligomères de PrP ; tp PrPo : tampon de reprise des oligomères de PrP

### 3.6.3. Présentation des résultats assemblage par assemblage

Pour visualiser plus facilement les résultats obtenus, un bilan est réalisé pour chaque assemblage de protéine à partir des trois figures précédentes. Les courbes sont visualisées de deux façons : colorées soit en fonction de l'exposition à l'assemblage de protéines ou au tampon (Figure 80A), soit en fonction de l'expression ou non de PrP (Figure 80B). Dans les deux cas, les p-valeurs associées au test de comparaison des scores sur le premier mode de variation sont affichées sur les courbes. Les résultats de comparaison des paramètres ciné-tiques calculés pour les courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont résumés par un tableau.



Figure 80 : Vue d'ensemble de l'analyse des données de réponse rédox à chaque assemblage exogène

A : Comparaison des courbes obtenues avec exposition à l'assemblage et au tampon des cellules exprimant ou non la PrP.

B : Comparaison des courbes obtenues avec et sans expression de PrP.

Les p-valeurs affichées sur les graphes correspondent au test de comparaison entre les scores sur la première harmonique. Les p-valeurs affichées en vert correspondent à une p-valeur plus faible avec exposition à l'assemblage par rapport au tampon après correction de Holm-Bonferroni (B) ou avec expression de PrP par rapport à l'expression de la sonde seul (C). Les p-valeurs en rouge correspondent à un score significativement plus élevé.

#### **3.6.3.1.** Monomère d'A<sub>β1-40</sub>

Le peptide A $\beta_{1-40}$  monomérique est le plus abondant dans les conditions physiologiques. *In vitro*, ce peptide est capable d'interagir avec la PrP<sup>C</sup> et d'initier son oligomérisation. *In vivo*, cela pourrait conduire à la clusterisation de la protéine et à l'initiation d'une cascade de signalisation (3.1, p. 123). La PrP<sup>C</sup> a un effet antioxydant rapporté dans la littérature (Onodera, 2017) et démontré dans nos modèles cellulaires (3.4). Le peptide A $\beta_{1-40}$  apparaît également protecteur vis-à-vis du stress oxydant dans nos modèles cellulaires sans expression de PrP (3.4). Il est intéressant d'analyser le potentiel rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la médiation de ce signal antioxydant induit par le monomère d'A $\beta_{1-40}$ .

La Figure 81 présente l'ensemble des courbes obtenues. Pour les trois premières heures d'exposition des cellules au monomère ou au tampon, l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due à l'acquisition est atténuée de manière significative pour les cellules exposées au monomère d'A $\beta_{1-40}$  monomérique par rapport aux cellules exposées au tampon, et ce, que les cellules expriment ou non la PrP<sup>C</sup> (Figure 81A, colonnes de gauche). Cela indique que, au cours des trois premières heures consécutives à l'ajout d'A $\beta_{1-40}$  dans le milieu cellulaire, ce peptide protège les cellules vis-à-vis du stress oxydant induit par la photoxicité, et ce, que les cellules expriment ou non la PrP.

Au bout de 24 heures, il n'y a plus de différence significative entre les cellules exposées au peptide ou au tampon, qu'il y ait ou non expression de PrP<sup>C</sup> (Figure 81A, deuxième colonne). Pour les cellules exposées au tampon, on ne détecte pas d'effet rédox de l'expression de la PrP<sup>C</sup> pour ce pas de temps (Figure 81B, deuxième colonne, graphe du haut), mais, parmi les cellules exposées au peptide A $\beta_{1-40}$ , celles qui expriment PrP ont un ratio sigificativement plus élevé. Cela pourrait correspondre à une atténuation de l'effet antioxydant d'A $\beta$ monomérique en présence de PrP. Entre 47,5 et 48 heures d'exposition, le peptide  $A\beta_{1-40}$  monomérique est à nouveau associé à une concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  significativement plus faible, avec et sans expression de  $PrP^C$  (Figure 81A, troisième colonne). Que les cellules soient exposées au peptide ou au tampon, on observe une concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  plus élevée pour les cellules exprimant la  $PrP^C$  (Figure 81B, troisième colonne), mais l'amplitude de cette différence apparaît plus grande en présence d'A $\beta$ .

Les expériences de suivi de la réponse cellulaire à 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui ont également été réalisées après 48 h d'exposition des cellules au peptide monomérique, permettent une analyse plus fine (Figure 81, guatrième colonne). L'ensemble des conclusions des comparaisons réalisées sur les paramètres cinétiques figure dans la Table XVIII. Concernant les cellules n'exprimant pas PrP, l'observation des courbes pourrait indiquer une légère tendance protectrice de l'exposition au monomère d'Aβ, avec des augmentations de ratio qui pourraient paraître globalement plus tardives, mais cet effet n'est pas ou peu significatif (Table XVIII, deuxième colonne : seul le ratio initial et le ratio au point d'inflexion sont significativement plus faibles pour les cellules exposées au monomère d'Aß). Concernant les cellules exprimant la PrP, le temps du ratio maximum, la pente au point d'inflexion, le ratio final et le score sur le premier mode de variation vont dans le sens d'une concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$ plus élevée pour les cellules exposées à Aß (Table XVIII, troisième colonne). Il est difficile de conclure à une différence significative au niveau de la cinétique de l'augmentation du ratio consécutive au traitement, puisque l'exposition au monomère conduit à un maximum atteint plus tardivement, mais à une pente plus élevée au niveau du point d'inflexion, et ne modifie significativement ni le temps auquel le point d'inflexion est atteint, ni le temps de latence. En revanche, le ratio final, le ratio maximal, et le score sur la première harmonique sont plus élevés pour les cellules exposées au monomère d'Aβ. La comparaison des cellules exprimant ou non PrP indique que, de façon cohérente avec les résultats décrits dans la partie 3.5.1, l'expression de PrP exerce un effet protecteur vis-à-vis du traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exposées au tampon pendant 48 heures, qui se traduit par une pente plus faible au point d'inflexion, et par des valeurs plus faibles au niveau du ratio maximal, du ratio au point d'inflexion, du ratio final et du score sur le premier mode de variation (Table XVIII, quatrième colonne). Cet effet protecteur est en revanche aboli pour les cellules exposées au monomère d'Aβ (Figure 81B, colonne de droite, graphe du bas, et dernière colonne de la Table XVIII).



**Figure 81 : Effet du monomère d'A** $\beta_{1-40}$  **sur la concentration cytoplasmique en H**<sub>2</sub>**O**<sub>2</sub> A, C, E : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exprimant HyPer seule (ligne du haut) ou en coexpression avec PrP (ligne du bas), exposées au monomère d'A $\beta_{1-40}$  (courbes en violet) ou non (courbes en bleu). Comparaison des scores sur le premier mode de variation (à droite).

B, D, F : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exposées au tampon (ligne du haut) ou au monomère d'A $\beta_{1-40}$  (ligne du bas), n'exprimant pas PrP (courbes en jaune) ou exprimant PrP (courbes en vert). Comparaison des scores sur le premier mode de variation (à droite).

# Table XVIII : Conclusions de l'analyse de la réponse à $H_2O_2$ avec et sans exposition au monomère d'A $\beta_{1-40}$ des cellules exprimant ou non PrP

Pour les colonnes 2 et 3, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants du monomère d'A $\beta$ . Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exposées au monomère d'A $\beta$ .

Pour les colonnes 4 et 5, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants de l'expression de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>.

	Effet du monomère d'Aβ par rap- port au tampon		Effet de l'expression de PrP <sup>C</sup>	
	Sans PrP <sup>C</sup>	Avec PrP <sup>C</sup>	Tampon	Aβ monomère
t <sub>max</sub>	*	+	-	*
t <sub>infl</sub>	*	*	*	*
t <sub>lat</sub>	*	*	*	*
Infl	*	+	-	*
r <sub>init</sub>	-	-	*	+
r <sub>fin</sub>	*	+	-	*
r <sub>infl</sub>	-	*	-	*
r <sub>max</sub>	*	+	-	*
Score fPCA	*	+	_	≈

Ainsi, le peptide A $\beta_{1-40}$  monomérique, à une concentration de 10 µM, exerce un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydant lié à la phototoxicité de l'acquisition entre 0 et 3 heures d'exposition au peptide, et cet effet n'est pas dépendant de l'expression de PrP. Au bout de 48 heures, l'exposition au peptide paraît associée à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible que l'exposition au tampon. La différence entre cellules exposées au peptide et au tampon paraît plus importante en absence de PrP, ce qui suggère que la PrP est capable d'atténuer l'effet antioxydant du monomère d'A $\beta$ . Ainsi, l'effet anti-oxydant observé, d'une part avec expression de PrP sans exposition à A $\beta$ , et d'autre part avec exposition à A $\beta$ sans expression de PrP, est atténué voire aboli pour les cellules exprimant PrP et exposées à A $\beta$ . En présence d'A $\beta_{1-40}$ , la PrP reste toutefois associée à une augmentation plus tardive du ratio : ce n'est donc probablement pas au niveau de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qu'A $\beta$  a un effet rédox, mais plutôt à des temps plus tardifs. Cet effet pourrait être dû à une interaction entre PrP<sup>C</sup> et A $\beta_{1-40}$ .

#### **3.6.3.2.** Fibres d'Aβ<sub>1-40</sub>

Les fibres amyloïdes d'A $\beta_{1-40}$  et d'A $\beta_{1-42}$  sont les principaux constituants des plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Bien que les espèces décrites comme les plus toxiques dans le cadre de la maladie d'Alzheimer soient plutôt oligomériques, une étude montre que *in vitro*, la PrP<sup>C</sup> est capable d'interagir avec des fibres amyloïdes d'A $\beta_{1-40}$  et d'A $\beta_{1-42}$ . Ces fibres exerceraient une toxicité dépendante de l'expression de la PrP<sup>C</sup> (Nieznanski et al., 2014). Il est donc intéressant de vérifier si, dans nos modèles cellulaires, les fibres d'A $\beta_{1-40}$  sont associées à des perturbations rédox avec et sans expression de PrP.

Pour les trois premières heures d'exposition, l'effet des fibres d'A $\beta_{1-40}$  sur la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas significatif malgré une tendance antioxydante, et l'expression de PrP n'a pas d'influence non plus sur la réponse cellulaire à la phototoxicité (Figure 82A et B, première colonne).

Entre 23 h 30 et 24 h d'exposition aux fibres, il n'y a toujours pas de différence significative entre les niveaux cytoplasmiques d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour les cellules exposées aux fibres et les cellules exposées au tampon, qu'il y ait expression de PrP<sup>C</sup> ou non (Figure 82A, deuxième colonne).

Au bout de 48 heures, la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  est plus importante avec exposition aux fibres pour les cellules exprimant la  $PrP^C$  (Figure 82A, troisième colonne, graphe du bas) tandis qu'on ne retrouve pas d'effet significatif de l'exposition aux fibres sur les cellules n'exprimant pas la  $PrP^C$  (Figure 82A, troisième colonne, graphe du haut). Cela indique un effet pro-oxydant tardif des fibres d'A $\beta$ , qui est dépendant de l'expression de la  $PrP^C$ . D'ailleurs, même si, comme à 23 h 30 d'exposition, l'expression de la  $PrP^C$  apparaît prooxydante pour les cellules exposées aux fibres comme pour les cellules exposées au tampon, l'amplitude de cet effet est plus importante pour les cellules exposées aux fibres (Figure 82B, troisième colonne).

Cette conclusion est corroborée par les expériences de suivi de la réponse cellulaire à l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 48 h d'exposition aux fibres. En effet, pour les cellules n'exprimant pas la PrP, il n'y a pas de différence significative de leur réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans exposition

aux fibres (Figure 82A, quatrième colonne, graphe du haut), comme confirmé par la comparaison des paramètres cinétiques (Table XIX, deuxième colonne). En revanche, pour les cellules exprimant PrP, l'exposition aux fibres d'Aβ<sub>1-40</sub> conduit à une exacerbation de l'augmentation du ratio de la sonde HyPer en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 82A, quatrième colonne, graphe du bas). Cet effet se traduit à la fois au niveau de la cinétique de l'augmentation du ratio consécutive au traitement, avec une pente au point d'inflexion plus élevée pour les cellules exposées aux fibres, et au niveau du ratio global : les cellules exposées aux fibres ont à la fois un ratio initial, un ratio au point d'inflexion, un ratio maximal, un ratio final, et un score sur le mode de variation principal plus élevés que les cellules exposées au tampon (Table XIX, troisième colonne). La comparaison entre les réponses des cellules qui expriment ou non PrP montre que, pour les cellules exposées au tampon, l'expression de PrP est protectrice vis-à-vis du traitement par 10 µM d'H2O2 (Figure 82B, quatrième colonne, graphe du haut), ce qui se traduit par une pente plus faible au niveau du point d'inflexion et par des valeurs plus faibles pour le ratio au point d'inflexion, le ratio final, le ratio maximal, et le score sur le premier mode de variations, même si aucun effet n'est observé au niveau des temps caractéristiques (Table XIX, quatrième colonne). Cet effet protecteur est aboli par l'exposition aux fibres d'Aβ<sub>1-40</sub> (Figure 82B, quatrième colonne, graphe du bas, et Table XIX, cinquième colonne). En revanche, pour les cellules exposées aux fibres, l'expression de la PrP<sup>C</sup> conduit à une apparition plus tardive du point d'inflexion maximal et à une augmentation du temps de latence (Table XIX, cinquième colonne).



Figure 82 : Effet de fibres d'A $\beta_{1-40}$  sur la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exprimant HyPer seule (ligne du haut) ou en coexpression avec PrP (ligne du bas), exposées au monomère d'A $\beta_{1-40}$  (courbes en violet) ou non (courbes en bleu).

B : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exposées au tampon (ligne du haut) ou au monomère d'A $\beta_{1-40}$  (ligne du bas), n'exprimant pas PrP (courbes en jaune) ou exprimant PrP (courbes en vert).

# Table XIX : Conclusions de l'analyse de la réponse à $H_2O_2$ avec et sans exposition aux fibres d'A $\beta_{1-40}$ des cellules exprimant ou non PrP

Pour les colonnes 2 et 3, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants des fibres d'A $\beta$ . Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exposées au monomère d'A $\beta$ .

Pour les colonnes 4 et 5, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants de l'expression de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>.

	Effet des fibres d'Aβ par rapport au tampon		Effet de l'expression de PrP <sup>C</sup>	
	Sans PrP <sup>C</sup>	Avec PrP <sup>C</sup>	Tampon	A $\beta$ fibres
t <sub>max</sub>	*	~	22	*
t <sub>infl</sub>	~	≈	~	+
t <sub>lat</sub>	~	~	~	+
Infl	~	+	-	*
r <sub>init</sub>	-	+	22	+
r <sub>fin</sub>	*	+	-	*
r <sub>infl</sub>	*	+	-	+
r <sub>max</sub>	*	+	-	*
Score fPCA	~	+	_	*

Les fibres d'A $\beta_{1-40}$  recombinant conduisent ainsi en 48 heures à une augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exprimant la PrP. Cet effet pro-oxydant se traduit également par un ratio de la sonde HyPer globalement plus élevé en réponse à un traitement exogène par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comme cet effet est dépendant de l'expression de la PrP, on peut penser que la PrP médie le signal pro-oxydant des fibres d'A $\beta_{1-40}$  recombinant : cet effet, décrit dans la littérature pour certains oligomères d'A $\beta$ , existerait donc aussi pour les fibres amyloïdes. Pour les cellules exposées aux fibres, l'expression de PrP reste associée à une augmentation plus tardive de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement exogène : l'effet pro-oxydant des fibres d'A $\beta$  sur les cellules exprimant la PrP n'affecte donc pas la capacité de la PrP à retarder l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytoplasme suite au traitement, mais se manifeste à des temps plus tardifs.

### 3.6.3.3. Monomère de PrP

L'analyse de l'effet rédox de la PrP recombinante monomérique a deux objectifs : (i) déterminer si l'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> vis-à-vis d'un oxydant exogène nécessite que la

PrP soit exprimée et maturée par la cellule, et (ii) évaluer si l'effet rédox du peptide  $A\beta_{1-40}$ monomérique exogène est spécifique d' $A\beta$  ou commun à différents polypeptides recombinants monomériques.

La Figure 83 présente l'ensemble des courbes obtenues. Entre 0 et 3 heures d'exposition, le monomère de PrP n'a pas d'effet significatif sur la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  des cellules, qu'elles expriment ou non la PrP de façon endogène (Figure 83A, colonne de gauche). Que les cellules soient exposées au tampon ou au monomère de PrP, l'expression endogène de la PrP<sup>C</sup> n'a pas non plus l'influence sur leur concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  au cours des trois premières heures après l'ajout (Figure 83B, colonne de gauche).

Entre 23,5 h et 24 h d'exposition, le monomère de PrP n'a toujours pas d'effet rédox significatif sur les cellules exprimant ou non PrP<sup>C</sup> (Figure 83A, deuxième colonne), et l'expression endogène de PrP n'a d'effet significatif ni sur la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exposées au tampon, ni sur celle des cellules exposées au monomère de PrP (Figure 83B, deuxième colonne).

En revanche, après 47,5 h d'exposition, le monomère de PrP paraît avoir un effet antioxydant qui dépend de l'expression de PrP (Figure 83A, troisième colonne). L'expression de PrP<sup>C</sup> apparaît de plus antioxydante pour les cellules exposées au monomère (Figure 83B, troisième colonne, ligne du bas), tandis que cet effet n'est pas retrouvé pour les cellules exposées au tampon, pour lesquelles l'expression de PrP<sup>C</sup> est même associée à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée (Figure 83B, troisième colonne, ligne du haut).

Malgré cet effet potentiellement antioxydant du monomère de PrP exogène pour les cellules exprimant PrP après 48 heures d'exposition, on observe que, pour ces cellules, le ratio de HyPer en réponse à un traitement par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est globalement plus élevé pour les cellules exposées au monomère que pour les cellules exposée au tampon, alors que, pour les cellules n'exprimant pas la PrP, il n'y a pas de différence significative entre cellules exposées au monomère de PrP et cellules exposées au tampon (Figure 83A, colonne de droite). Cela se confirme par le fait que, pour les cellules qui n'expriment pas la PrP<sup>C</sup>, tous les paramètres cinétiques sont les mêmes avec exposition à PrP ou au tampon (Table XX, deuxième colonne). Pour les cellules expriment la PrP<sup>C</sup>, même si le ratio maximal est atteint plus

tardivement pour les cellules exposées au monomère de PrP, l'effet du monomère de PrP est plutôt pro-oxydant, ce qui se manifeste par une pente au point d'inflexion plus élevée, et par des valeurs plus élevées au niveau du ratio final, du ratio maximal, du score sur le premier mode de variation (Table XX, colonne 3). Si l'on compare les cellules exprimant ou non la PrP, on peut noter que, comme pour le monomère d'Aβ, l'expression de la PrP est protectrice vis-à-vis du traitement par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exposées au tampon (Figure 83B, colonne de droite, graphe du haut, et Table XX, colonne 4), et cet effet protecteur de PrP est annulé pour les cellules exposées au monomère de PrP (Figure 83B, colonne de droite, graphe 5).



Figure 83 : Effet du monomère de PrP extracellulaire sur la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$ 

A : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exprimant HyPer seule (ligne du haut) ou en coexpression avec PrP (ligne du bas), exposées au monomère de PrP (courbes en violet) ou non (courbes en bleu).

B : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exposées au tampon (ligne du haut) ou au monomère de PrP (ligne du bas), n'exprimant pas PrP (courbes en jaune) ou exprimant PrP (courbes en vert).

# Table XX : Conclusions de l'analyse de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans exposition au monomère de PrP des cellules exprimant ou non PrP

Pour les colonnes 2 et 3, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants du monomère de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exposées au monomère d'A $\beta$ .

Pour les colonnes 4 et 5, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants de l'expression de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>.

	Effet du monomère de PrP par rap- port au tampon		Effet de l'expression de PrP <sup>C</sup>	
	Sans PrP <sup>C</sup>	Avec PrP <sup>C</sup>	Tampon	Monomère de PrP
t <sub>max</sub>	*	+	-	+
t <sub>infl</sub>	~	~	-	~
t <sub>lat</sub>	~	~	-	≈
Infl	*	+	-	-
r <sub>init</sub>	*	*	+	*
r <sub>fin</sub>	~	+	0,0077	*
r <sub>infl</sub>	*	*	*	-
r <sub>max</sub>	~	+	*	*
Score fPCA	~	+	0,024	~

Ainsi, l'exposition des cellules au monomère de PrP pendant 48 h conduit à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible en absence de traitement, mais plus forte en réponse à un traitement exogène par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nos données indiquent que cet effet est médié par l'expression endogène de PrP<sup>C</sup> par les cellules. L'effet pro-oxydant du monomère de PrP exogène sur les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> se traduit par une abolition de l'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> endogène. Comme pour le monomère et les fibres d'A $\beta$ , cet effet n'est pas visible au niveau de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais se manifeste aux temps plus tardifs.

#### 3.6.3.4. Oligomères de PrP

Des travaux menés en collaboration avec l'équipe ont démontré un effet cytotoxique des oligomères de PrP sur des neurones primocultivés après 72 heures d'exposition. Cet effet apparaît à des concentrations en oligomères plus faibles pour les cellules exprimant PrP que pour les cellules n'exprimant pas PrP (Simoneau et al., 2007) ; on peut donc supposer que, comme pour Aβ dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'expression endogène de la PrP<sup>C</sup> puisse partiellement médier la toxicité des oligomères exogènes, qui pourrait potentiellement se manifester par des perturbations de l'homéostasie rédox précédant la mort cellulaire.

La Figure 84 présente l'ensemble des courbes de ratio obtenues. Entre 0 et 3 heures d'exposition, les oligomères sont capables d'atténuer l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due à la phototoxicité associée à l'acquisition, et cet effet protecteur est conditionné par l'expression de PrP<sup>C</sup> (Figure 84A, première colonne). L'expression de PrP par les cellules n'a en revanche pas d'effet significatif sur l'augmentation du ratio de HyPer au cours de ces trois premières heures d'acquisition, que ce soit pour les cellules exposées au tampon ou pour les cellules exposées aux oligomères (Figure 84B, première colonne).

En revanche, entre 23,5 et 24 heures d'exposition, les oligomères de PrP sont associés à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativement supérieure pour les cellules exprimant la PrP (Figure 84A, deuxième colonne, graphe du bas), et cet effet n'est pas retrouvé pour les cellules n'exprimant que la sonde (Figure 84A, deuxième colonne, graphe du haut). Ce résultat indique que dans nos modèles cellulaires, au bout de 24 heures d'exposition, les oligomères ont un effet pro-oxydant médié par la PrP<sup>C</sup>. En effet, pour les cellules exposées à ces oligomères, l'expression de la PrP<sup>C</sup> par les cellules est associée à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativement plus élevée (Figure 84B, deuxième colonne, graphe du bas).

Entre 47,5 et 48 h d'exposition aux oligomères, il n'y a plus de différence significative au niveau de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre les cellules exposées aux oligomères et les cellules exposées au tampon, qu'il y ait ou non expression endogène de PrP<sup>C</sup> (Figure 84A, troisième colonne). L'expression de la PrP<sup>C</sup> n'a pas non plus d'influence significative sur la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exposées au tampon comme aux oligomères (Figure 84B, troisième colonne). Cela pourrait être interprété comme un retour à l'homéostasie rédox des cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> : le stress oxydant visible au bout de 24 h serait alors transitoire dans nos conditions.

Cependant, même si l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exprimant PrP au bout de 24 heures d'exposition aux oligomères a manifestement pu être résorbée par les systèmes antioxydants des cellules 24 heures plus tard, ces cellules pourraient être plus sensibles à un oxydant exogène. En effet, après 48 heures d'exposition, l'exposition aux oligomères conduit à une augmentation plus forte du ratio de la sonde Hy-Per suite à un traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> par rapport aux cellules qui n'expriment que la sonde (Figure 84A, quatrième colonne, graphe du bas). Pour les cellules exprimant la PrP, le point d'inflexion est atteint plus rapidement, le temps de latence est plus faible et la pente au point d'inflexion est plus élevée suite à l'exposition aux oligomères, ce qui traduit une augmentation plus rapide de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apparaît également plus élevée pour ces cellules, avec des valeurs de ratio maximal, de ratio final, et de score sur l'harmonique 1 supérieures (Table XXI, troisième colonne). Pour les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup>, les courbes suggèrent que la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est plus variable pour les cellules exposées aux oligomères (Figure 84A, quatrième colonne ligne du haut) : on observe en effet à la fois des courbes pour lesquelles le ratio augmente très rapidement en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et dont le ratio reste très élevé, voire augmente à nouveau dans un second temps au cours de l'acquisition, et des courbes qui demeurent quasiment constantes suite au traitement. L'effet des oligomères paraît donc variable sur les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup> : pro-oxydant pour certaines cellules et anti-oxydant pour d'autres. Sans doute à cause de cette variabilité, l'analyse de l'ensemble des courbes ne met en évidence aucun effet de l'exposition aux oligomères de PrP sur la cinétique de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table XXI, deuxième colonne). La comparaison des réponses à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans expression de PrP confirme l'effet pro-oxydant médié par PrP des oligomères de PrP. En effet, pour les cellules exposées au tampon, l'expression de PrP<sup>C</sup> par les cellules est protectrice vis-à-vis du traitement par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 84B, quatrième colonne, graphe du haut). Cet effet protecteur se traduit par une pente plus faible au niveau du point d'inflexion ainsi que par des valeurs plus faibles pour le ratio final, le ratio maximal, et le score sur le premier mode de variation (Table XXI). Cet effet protecteur de l'expression de la PrP<sup>C</sup> est annulé par l'exposition des cellules aux oligomères (Figure 84B, dernière colonne, courbes du bas), mis à part au niveau du ratio final, qui demeure plus faible avec expression de PrP (Table XIX, dernière colonne). Cet effet apparent de l'expression de PrP sur le ratio final pour les cellules exposées aux oligomères pourraît être dû aux quelques courbes issues des cellules exprimant la sonde seule dont le ratio continue à augmenter après le premier pic : les courbes associées aux cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> sont plus homogènes.



**Figure 84 : Effet des oligomères de PrP sur la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** A : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exprimant HyPer seule (ligne du haut) ou en coexpression avec PrP (ligne du bas), exposées aux oligomères (courbes en violet) ou non (courbes en bleu).

B : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exposées au tampon (ligne du haut) ou aux oligomères (ligne du bas), n'exprimant pas PrP (courbes en jaune) ou exprimant PrP (courbes en vert).

# Table XXI : Conclusions de l'analyse de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans exposition aux oligomères de PrP des cellules exprimant ou non PrP

Pour les colonnes 2 et 3, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants des oligomères de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exposées au monomère d'Aβ.

Pour les colonnes 4 et 5, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants de l'expression de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>.

	Effet des oligomères de PrP par rapport au tampon		Effet de l'expression de PrP <sup>C</sup>	
	Sans PrP <sup>C</sup>	Avec PrP <sup>C</sup>	Tampon	Oligomères PrP
t <sub>max</sub>	~	~	-	~
t <sub>infl</sub>	*	-	*	*
t <sub>lat</sub>	*	-	*	≈
Infl	*	+	-	*
r <sub>init</sub>	*	*	*	*
r <sub>fin</sub>	*	+	-	-
r <sub>infl</sub>	*	*	*	*
r <sub>max</sub>	~	+	-	~
Score fPCA	~	+	_	~

Ainsi, les oligomères de PrP semblent protecteurs vis-à-vis de la phototoxicité au cours des trois premières heures d'exposition, pour les cellules exprimant la PrP uniquement. Au bout de 24 heures d'exposition, les oligomères conduisent à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nettement plus élevée que pour les cellules exposées au tampon, uniquement pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>. Cela pourrait indiquer la mise en place d'un stress oxydant, avec médiation de la toxicité des oligomères par la PrP<sup>C</sup>. Cet effet n'est plus visible au bout de 48 heures, ce qui suggère que le stress oxydant induit par les oligomères est transitoire dans nos modèles cellulaires, mais les cellules concernées sont plus sensibles à un oxydant exogène.

#### 3.6.3.5. Fibres de PrP

Les fibres amyloïdes de PrP<sup>sc</sup> sont des assemblages caractéristiques des maladies à prions. Même si les fibres de PrP recombinante sont parfois décrites comme moins cytotoxiques que les oligomères (Simoneau et al., 2007), il a été démontré que les fibres amyloïdes de PrP recombinante pouvaient être aussi toxiques que les oligomères sur des modèles de cellules immortalisées et sur des neurones primaires. L'utilisation d'ARN micro-interférents dirigés contre la PrP<sup>C</sup> protège partiellement les cellules contre l'apoptose induite par les fibres (Novitskaya et al., 2006), ce qui suggère que cet effet cytotoxique des fibres de PrP recombinante pourrait être médié par la PrP<sup>C</sup> des cellules. Nous nous sommes donc intéressés à la réponse rédox des cellules à ces fibres de PrP recombinante, avec et sans expression de PrP<sup>C</sup>.

La Figure 85 montre l'ensemble des courbes de ratio obtenues. Entre 0 et 3 heures d'exposition, les fibres n'ont pas d'influence significative sur l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules (Figure 85A, colonne de gauche). L'expression de la PrP<sup>C</sup> ne modifie pas non plus la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de ces trois premières heures d'exposition, que ce soit pour les cellules exposées aux fibres ou au tampon (Figure 85B, colonne de gauche).

Entre 23 et 24 heures d'exposition, la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  est significativement plus faible après exposition aux fibres pour les cellules exprimant la  $PrP^C$ , et ce n'est pas le cas pour les cellules n'exprimant pas la  $PrP^C$  (Figure 85A, deuxième colonne). Cela pourrait indiquer un effet anti-oxydant des fibres dépendant de l'expression de la  $PrP^C$ .

Entre 47 h 30 et 48 h d'exposition aux fibres, pour les cellules exprimant PrP, la concentration plus faible en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytoplasme pour les cellules exposées aux fibres se confirme (Figure 85A, troisième colonne, graphe du bas). Cet effet semble toujours dépendant de l'expression endogène de PrP. En effet, pour les cellules n'exprimant pas PrP, la différence entre cellules exposées aux fibres et cellules exposées au tampon n'est plus significative après correction de Holm-Bonferroni (Figure 85A, troisième colonne, graphe du haut). Pour les cellules exposées au tampon, l'expression de la PrP<sup>C</sup> est associée à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée (Figure 85B, troisième colonne, graphe du haut), tandis que c'est le contraire pour les cellules exposées aux fibres. Cela confirme que l'exposition aux fibres de PrP<sup>C</sup> conduit à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible pour les cellules exprimant la PrP.

Toutefois, malgré cette concentration basale en H2O2 plus basse, l'analyse des courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exposées ou non aux fibres pendant 48 h montre que, pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>, l'exposition aux fibres est associée à une sensibilité accrue à un oxydant exogène par rapport à l'exposition au tampon. En effet, pour les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup>, l'exposition aux fibres de PrP ne modifie aucun paramètre cinétique à l'exception du ratio au point d'inflexion (Table XXII, deuxième colonne), tandis que, pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>, l'exposition aux fibres est associée à une grande variabilité dans la cinétique de l'augmentation du ratio, et une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui ne diminue pas au cours du temps (Figure 85A, colonne de droite, graphe du bas). Au niveau des paramètres cinétiques, l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est en moyenne plus tardive pour les cellules exposées aux fibres, avec un ratio maximum et un point d'inflexion atteints plus tardivement et un temps de latence plus long, mais également plus forte, avec une pente plus élevée au point d'inflexion et des valeurs plus élevées pour le ratio final, le ratio maximal et le score sur le premier mode de variation (Table XXII, troisième colonne). Malgré la plus faible concentration basale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui leur est associée, les fibres de PrP paraissent ainsi capables de sensibiliser les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> à un oxydant exogène, potentiellement par une annulation de l'effet protecteur de l'expression de la PrP<sup>C</sup>. En effet, pour les cellules exposées au tampon pendant 48 h, l'expression de la  $PrP^{C}$  est protectrice vis-à-vis du traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 85B, colonne de droite, graphe du haut, et Table XXII, quatrième colonne), et cet effet protecteur est perdu en présence des fibres (Figure 85B, colonne de droite, graphe du bas, et Table XXII, cinquième colonne).



### Figure 85 : Effet de fibres de PrP sur la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exprimant HyPer seule (ligne du haut) ou en coexpression avec PrP (ligne du bas), exposées aux fibre de PrP monomère d'A $\beta_{1-40}$  (courbes en violet) ou non (courbes en bleu).

B : Courbes de ratio obtenues pour les cellules exposées au tampon (ligne du haut) ou aux fibres de PrP (ligne du bas), n'exprimant pas PrP (courbes en jaune) ou exprimant PrP (courbes en vert).

# Table XXII : Conclusions de l'analyse de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec et sans exposition aux fibres de PrP des cellules exprimant ou non PrP

Pour les colonnes 2 et 3, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants du monomère d'A $\beta$ . Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exposées au monomère d'A $\beta$ .

Pour les colonnes 4 et 5, les cases en vert et en orange indiquent des effets respectivement anti- et pro- oxydants de l'expression de PrP. Les + et les - indiquent une médiane respectivement plus grande et plus petite pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>.

	Effet des fibres de PrP par rapport au tampon		Effet de l'expression de PrP <sup>C</sup>	
	Sans PrP <sup>C</sup>	Avec PrP <sup>C</sup>	Tampon	Fibres de PrP
t <sub>max</sub>	*	+	-	*
t <sub>infl</sub>	~	+	-	+
t <sub>lat</sub>	≈	+	-	+
Infl	-	+	-	*
r <sub>init</sub>	*	-	-	*
r <sub>fin</sub>	*	+	-	*
r <sub>infl</sub>	*	-	*	*
r <sub>max</sub>	~	+	~	~
Score fPCA	~	+	_	~

Les fibres de PrP recombinantes n'ont ainsi pas d'effet rédox signifiatif sur les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup>. Pour les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>, elles conduisent à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible après 24 et 48 heures d'exposition, ce qui pourrait orrespondre à un effet antioxydant des fibres de PrP médié par la PrP<sup>C</sup>. Malgré cet apparent effet antioxydant, les fibres sont capables de sensibiliser les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> à un traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et donc potentiellement de favoriser l'apparition d'un stress oxydant.

#### 3.6.4. Conclusion

Ces expériences indiquent que l'effet des assemblages de PrP et d'A $\beta_{1-40}$  recombinants exogènes sur la réponse à 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nécessite l'expression endogène de la PrP<sup>C</sup>. En particulier, tous les polypeptides sous formes agrégées, à savoir les fibres amyloïdes d'A $\beta_{1-40}$ , les oligomères de PrP, et les fibres amyloïdes de PrP, conduisent à l'annulation de l'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> vis-à-vis du traitement exogène par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 48 heures d'exposition. Les manifestations plus précoces de leurs effets rédox sont néanmoins différentes. En effet, pour les cellules exprimant la PrP, les fibres d'A $\beta_{1-40}$  conduisent à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée après 48 heures d'exposition. Les oligomères de PrP ont le même effet dès 24 heures d'exposition ; cet effet paraît résorbé après 48 heures d'exposition mais les cellules restent plus sensibles à un oxydant exogène. Pour les cellules exposées aux fibres de PrP, en revanche, la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apparaît significativement plus faible, mais, malgré cet effet antioxydant, ces fibres sont capables d'altérer la réponse cellulaire à un traitement par un oxydant exogène. Cela indique que, même si les différents assemblages de protéines ont des effets être différents, tous sont capables d'altérer la réponse cellulaire à 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peut-être *via* une interaction avec la PrP<sup>C</sup> qui inhiberait son effet protecteur.

### 3.7. Etude temporelle du stress oxydant au cours d'une infection à prions en modèle cellulaire

Les résultats présentés dans les parties 3.4 et 3.6 montrent que la protéine prion cellulaire a un effet protecteur vis-à-vis d'un oxydant exogène. Elle joue également un rôle dans la transduction du signal rédox de différents assemblages d'Aß et de PrP exogènes, dont certains se rapprochent des assemblages pathologiques caractéristiques des maladies neurodégénératives, en des temps relativement courts (48 h). La littérature montre que, dans le cadre des infection à prions, la toxicité de la PrP<sup>Sc</sup> est médiée par la PrP<sup>C</sup> (Brandner et al., 1996; Cronier et al., 2012; Mallucci et al., 2003). Nous avons donc souhaité étudier l'effet de l'expression de la PrP<sup>C</sup> sur le stress oxydant cellulaire en réponse à l'exposition à la PrP<sup>Sc</sup> de la souche 127S, capable de convertir la protéine prion VRQ exprimée par nos modèles cellulaires, au cours de la propagation de l'infection.

### 3.7.1. Caractérisation de l'infection des cellules

Pour étudier l'influence de l'infection par un prion sur le stress oxydant au cours du temps, nous avons souhaité infecter les cellules coexprimant PrP avec la sonde HyPer dans le cytoplasme d'une part, et Grx1-roGFP2 d'autre part. Une expérience préliminaire a été réalisée pour évaluer l'infectabilité de ces cellules par la souche ovine 127S. Cette souche a été obtenue par infection de souris transgéniques exprimant l'allèle VRQ de la PrP avec un

isolat de cerveau de mouton porteur de l'allèle VRQ de la PrP et atteint de tremblante classique (Vilotte et al., 2001). Comme décrit dans la partie matériels et méthodes, les cellules coexprimant PrP avec HyPer1 et Grx1-roGFP2 ont été exposées à de l'homogénat de cerveau de souris malades. Des cellules RK13 sauvages, n'exprimant pas la PrP, ont été traitées de la même manière pour contrôler la persistance de l'inoculum. Les cellules sont ensuite cultivées pendant six passages, et des cellules sont régulièrement prélevées et lysées. Les lysats sont traités par la protéinase K, qui digère l'ensemble des protéines à l'exception d'un fragment de la PrP<sup>Sc</sup> appelé PrP résistante (PrP<sup>rés</sup>), puis analysés dans un premier temps par western blot pour détecter la présence de PrP<sup>Sc</sup>. Cette approche n'a pas permis de mettre en évidence de PrP<sup>Sc</sup> (Figure 86A). La PMCA a donc été utilisée dans le but d'augmenter la sensibilité de l'analyse (Figure 86B). Les lysats cellulaires obtenus aux deuxième et sixième passages postinfection sont dilués entre 10<sup>1</sup> et 10<sup>6</sup> fois avant amplification par PMCA de l'éventuelle PrP<sup>Sc</sup>, puis digestion par la protéinase K des produits d'amplification et western blot (Figure 86). Que ce soit au deuxième passage (panel du haut) ou au sixième passage (panel du bas), la dilution maximale à laquelle la PrP<sup>Sc</sup> est amplifiée par PMCA est la même pour les cellules coexprimant PrP<sup>C</sup> avec Grx-roGFP que pour les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup>. Cette PrP<sup>Sc</sup> amplifiée correspond donc à l'inoculum infectieux résiduel, et la PrP<sup>C</sup> exprimée par les cellules n'a pas été convertie en PrP<sup>Sc</sup> : cela indique que ces cellules n'ont pas été infectées. En revanche, pour les cellules RK13 PrP utilisées comme contrôle positif (dont l'infectabilité a déjà été démontrée au laboratoire) comme pour les cellules coexprimant la PrP avec HyPer, la PrP<sup>Sc</sup> est toujours détectable après une dilution de 10<sup>-5</sup> ou 10<sup>-6</sup>, ce qui indique que, même si le niveau de PrP<sup>Sc</sup> dans les cellules coexprimant HyPer avec PrP est faible (non détectable en western blot sans amplification préalable), ces cellules sont bien infectées. D'autres tentatives d'infection des cellules coexprimant PrP avec Grx-roGFP ont été menées, qui se sont toutes avérées infructueuses. Il est possible que cette lignée, pour une raison inconnue, ne soit pas sensible à l'infection prion, comme c'est également le cas de nombreuses autres lignées de cellules (Vilette, 2008). Nous nous sommes donc concentrés sur l'effet de l'infection prion sur la concentration cellulaire en peroxyde d'hydrogène.



Figure 86 : Détection de la PrP<sup>Sc</sup> dans les cellules infectées à différents passages postinfection

A : Marquage de la PrP<sup>Sc</sup> dans les lysats cellulaires après digestion par la protéinase K au quatrième passage post-infection. La piste 1 correspond à un lysat de cellules RK13 PrP dont l'infectabilité a déjà été démontrée, infectées par la souche 127S. Les deux pistes suivantes correspondent aux cellules coexprimant la PrP avec HyPer, exposées à de l'homogénat de cerveau infectieux (+) ou à de l'homogénat de cerveau sain (-). Les deux dernières pistes correspondent aux cellules coexprimant la PrP avec Grx-roGFP, exposées à de l'homogénat de cerveau infectieux (+) ou à de l'homogénat de cerveau sain (-).

B : Marquage de la PrP<sup>Sc</sup> après amplification par PMCA dans les lysats cellulaires dilués 10<sup>1</sup> à 10<sup>6</sup> fois. Les lysats analysés proviennenent du deuxième et du sixième passage post-infection. Les produits de PMCA sont digérés par la protéinase K et analysés par western blot. Pour les cellules coexprimant la PrP<sup>C</sup> avec Grx1-roGFP, la dilution à partir de laquelle la PrP<sup>Sc</sup> n'est plus amplifiée est la même que pour les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup> et exposées à l'homogénat infectieux : ces cellules n'ont donc pas été infectées. En revanche, pour les cellules coexprimant la PrP<sup>C</sup> avec HyPer, la PrP<sup>Sc</sup> peut être détectée à des dilutions bien plus importantes : cela indique que la PrP<sup>C</sup> exprimée par ces cellules a été partiellement convertie en PrP<sup>Sc</sup> suite à l'infection.

Une deuxième expérience d'infection a été réalisée avec les cellules coexprimant PrP avec la sonde HyPer cytoplasmique. C'est au cours de cette expériene que la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été suivie à chaque passage. Dans le but d'augmenter la proportion de PrP<sup>C</sup> convertie en PrP<sup>Sc</sup>, cette infection a été réalisée avec un plus grand volume d'inoculum infectieux. Trois contrôles négatifs ont également été réalisés : l'exposition à l'homogénat infectieux des cellules exprimant la sonde HyPer seule, l'exposition des cellules coexprimant la sonde et la PrP<sup>C</sup> à de l'homogénat de cerveau sain de souris issue de la même lignée

que les souris infectées, et enfin la simple culture de cellules coexprimant la sonde et PrP avec induction en continu de l'expression de la PrP et de la sonde.

A chaque passage, des cellules sont prélevées et lysées. Dans le but de suivre l'évolution de l'infection au cours des passages, les lysats sont digérés par la protéinase K et la PrP<sup>rés</sup> est quantifiée par western blot. La Figure 87A présente l'évolution de la PrP<sup>rés</sup> détectée. Cette figure montre que, sur l'ensemble du tapis cellulaire, la quantité de PrP<sup>Sc</sup> diminue au cours des trois premiers passages, ce qui pourrait correspondre à la disparition progressive de l'inoculum résiduel, avant de se stabiliser.

Dans le but d'évaluer le pourcentage de cellules infectées, une immunofluorescence est réalisée au huitième passage. Les résultats sont présentés par la Figure 87B. La première ligne montre que la PrP<sup>Sc</sup> n'est observable que pour certaines des cellules exprimant la PrP et exposées à l'homogénat infectieux (colonne de droite) : il ne reste plus de PrP<sup>Sc</sup> détectable pour les cellules exposées à l'homogénat infectieux mais n'exprimant pas la PrP (première colonne), et il n'y a pas de conversion spontanée en PrP<sup>Sc</sup> de la PrP<sup>C</sup> exprimée par les cellules non traitées ou exposées à l'homogénat sain (deuxième et troisième colonne). La deuxième ligne met en évidence la bonne expression et localisation de la PrP<sup>C</sup> quel que soit le traitement des cellules. Après seuillage, les cellules infectées sont comptées à la main : le taux de cellules infectées est ainsi estimé à  $\frac{33}{204} \approx 16\%$ . Or, le taux de cellules de la lignée utilisée exprimant la PrP<sup>C</sup> est estimé à  $\frac{218}{285} \approx 76\%$ , et toutes les cellules infectées expriment la PrP<sup>C</sup>. Ainsi, parmi les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>, qui expriment aussi la sonde, seules 21% sont infectées. Il aurait été intéressant de réaliser cette analyse dès les premiers passages, pour pouvoir évaluer l'évolution au cours du temps de cette proportion de cellules infectées. Par manque de temps, cette expérience n'a pas pu être réalisée.



**Figure 87 : Caractérisation de l'infection des cellules coexprimant HyPer et PrP<sup>C</sup>** A : Evolution au cours des passages post infection de la PrP<sup>rés</sup> détectée dans les lysats cellulaires par western blot.

B : Immunofluorescence de la PrP<sup>Sc</sup> et de la PrP<sup>C</sup> au 8<sup>ème</sup> passage post-infection. Deux puits sont ensemencés pour chaque conditions. Pour le marquage spécifique de la PrP<sup>Sc</sup>, les cellules sont perméabilisées et la PrP<sup>C</sup> est dénaturée par de l'isothiocyanate de guanidine. L'anticorps primaire utilisé a une meilleure affinité pour la PrP<sup>Sc</sup> que pour la PrP<sup>C</sup>. Pour le marquage de la PrP<sup>C</sup>, les cellules ne sont pas perméabilisées, et on choisit un anticorps ayant une meilleure affinité pour la PrP<sup>Sc</sup>.

#### 3.7.2. Evolution de la réponse cellulaire à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'infection

Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'infection des cellules sur leur réponse à 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'infection. En effet, les courbes de réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent être analysées de manière détaillée grâce au calcul des paramètres cinétiques. Cette concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été choisie car nos travaux ont montré (i) un effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> et (ii) un effet perturbateur de certains assemblages de protéines vis-à-vis de ce traitement. Il est donc intéressant d'analyser l'effet de l'infection par un prion, et donc de la conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>, sur l'influence de la PrP vis-à-vis de ce traitement pro-oxydant. Toutefois, la faible proportion de cellules infectées devra être prise en compte lors de l'analyse. En effet, l'infection des cellules de cette lignée ne conduit à aucun phénotype particulier. En moyenne, environ 80% des cellules analysées ne seront donc pas infectées, et conduiront à une atténuation des différences entre les cellules potentiellement infectées (cellules exprimant PrP et exposées à l'homogénat infectieux) et les cellules contrôles.

Deux jours après leur passage, la réponse à 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules est suivie pendant 45 min pour chacune des conditions, avec trois réplicats par expérience. La Figure 88 présente l'ensemble des courbes obtenues dans les quatre conditions expérimentales (en ligne) en fonction du passage (en colonne). Cette figure montre que les cellules répondent globalement toutes à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais il est difficile de tirer des conclusions de la simple observation de ces données brutes.



Figure 88 : Variation de la concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  après ajout exogène d' $H_2O_2$  avec et sans infection

Variation du ratio de HyPer en réponse 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit sans expression de PrP<sup>C</sup> et avec exposition à de l'homogénat infectieux (ligne du haut), soit avec expression de PrP<sup>C</sup> et sans exposition à de l'homogénat de cerveau (deuxième ligne), soit avec expression de PrP et exposition à de l'homogénat de cerveau non infectieux (troisième ligne), soit avec expression de PrP et exposition à de l'homogénat de cerveau non infectieux (troisième ligne), soit avec expression de PrP et exposition à de l'homogénat de cerveau non infectieux (troisième ligne), soit avec expression de PrP<sup>C</sup> et traitement par l'homogénat infectieux (quatrième ligne). Les colonnes correspondent au numéro du passage post infection. Les courbes sont colorées en fonction du réplicat de chaque expérience. Les barres verticales indiquent le temps de l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pour analyser l'ensemble de ces courbes, nous avons utilisé les mêmes paramètres descriptifs que pour les autres expériences de suivi de la réponse des sondes à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les paramètres sont représentés en fonction du nombre de passages post-infection sous forme

de dotplots. Pour visualiser plus facilement de potentielles différences, les courbes médianes sont tracées, ainsi que les intervalles de confiance à 95% (Figure 89).

Les cellules n'exprimant que la sonde (courbes violettes) ont une concentration en  $H_2O_2$  qui augmente plus rapidement que les cellules exprimant PrP (courbes jaunes, vertes et orange) suite au traitement, avec un point d'inflexion atteint plus rapidement (Figure 89), un temps de latence plus court (Figure 89D) et une pente au point d'inflexion plus élevée (Figure 89E). L'absence de PrP<sup>C</sup> est également associée à une concentration cytoplasmique en  $H_2O_2$  plus élevée, que ce soit au niveau du point d'inflexion (Figure 89F), au niveau du maximum (Figure 89G), à la fin de l'acquisition (Figure 89H), et de manière globale (Figure 89I). Cela confirme l'effet protecteur de l'expression de la PrP en réponse à 10  $\mu$ M d' $H_2O_2$  décrit par la partie 3.4. Cet effet pourrait ici être exacerbé par la durée plus importante de l'expression de PrP par rapport aux expériences de la partie 3.5.1, pendant lesquelles la synthèse de la protéine n'était induite que pendant 48 heures.

En revanche, aucun paramètre ne permet de mettre en évidence une différence significative entre les cellules exprimant PrP exposées ou non à de l'homogénat de cerveau sain ou infectieux (courbes jaunes, vertes et orange), à l'exception du temps de latence, qui semble globalement plus élevé pour les cellules infectées (courbes orange) (Figure 89). Ces expériences ne permettent donc pas de mettre en évidence d'effet rédox de l'infection prion.



Figure 89 : Evolution en fonction du passage post infection des paramètres descriptifs des courbes de réponse de HyPer à 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A : Ratio initial médian calculé sur les cinq premières minutes de chaque acquisition (avant l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

B : Temps auquel le ratio maximum est atteint.

- C : Temps auquel le point d'inflexion maximum est atteint.
- D : Temps de latence.
- E : Pente au niveau du point d'inflexion.
- F : Ratio au niveau du point d'inflexion maximal.

G : Ratio maximal atteint au cours de l'acquisition.

H : Ratio final médian calculé sur les cinq dernières minutes de chaque acquisition (40 à 45 min après l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

I : Score sur la première harmonique de l'ACP fonctionelle, qui explique ici 97,2% de la variabilité.

Chaque point correspond à une courbe de ratio. Les bandes correspondent aux intervalles de confiance à 95% calculés par la fonction geom\_smooth.

sd : sans dimension.

Une ACP classique est réalisée sur l'ensemble des variables quantitatives de façon à pouvoir visualiser rapidement l'ensemble du jeu de données et à vérifier la cohérence entre eux des différents paramètres analysés.

La Figure 90A présente le cercle des corrélations. Le plan formé par les deux premiers axes explique 80,7% de la variabilité, ce qui est très satisfaisant. Sur le cercle, deux groupes de variables se distinguent : les variables entourées en bleu, qui correspondent à une cinétique lente de l'augmentation du ratio de HyPer consécutive au traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et les variables entourées en orange, qui indiquent un ratio globalement élevé au cours de l'acquisition. Les corrélations entre variables sont cohérentes.

La Figure 90B présente la projection des individus dans le même plan. Elle confirme que les cellules n'exprimant pas la  $PrP^{C}$  se situent davantage dans la partie inférieure droite du graphe, ce qui correspond à une augmentation cytoplasmique du ratio de HyPer plus rapide, et à un ratio de la sonde plus important : cela indique une sensibilité à  $H_2O_2$  plus importante que pour les cellules exprimante PrP. En revanche, les nuages de points jaunes, verts et orange se situent dans la même zone du graphe : les cellules exprimant la  $PrP^{C}$  ont donc des réponses similaires à  $H_2O_2$ , qu'elles soient exposées ou non à de l'homogénat de cerveau sain ou infectieux.



Figure 90 : ACP sur les variables quantitatives descriptives des courbes

249

A : Cercle des corrélations. Les variables en vert sont bien représentées dans le plan formé par les deux premiers axes. Deux groupes de variables corrélées entre elles peuvent être distingués, qui sont ortogonaux entre eux. Le premier groupe visualisé en orange, rassemble le ratio au point d'inflexion, le ratio final, le ratio maximal, mais aussi le score sur la première harmonique de l'ACP fonctionnelle. Un sore élevé sur ces variables correspond à des cellules pour lesquelles l'augmentation du ratio de la sonde en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est rapide et précoce. Le deuxième groupe, visualisé en bleu, comporte le temps de latence, le temps au niveau du point d'inflexion, et potentiellement le temps auquel le maximum est atteint – même si cette variable est mal représentée –. Un score élevé sur ces variables correspond à des cellules pour lesquelles l'augmentation du ratio de HyPer en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est faible. B : Projection de l'ensemble des individus du jeu de données dans le plan formé par les deux premiers axes.

Ainsi, ces expériences confirment l'effet protecteur de l'expression de la  $PrP^{C}$  vis-à-vis d'un traitement par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais ne permettent de mettre en évidence aucun effet de l'infection prion sur la réponse cellulaire au même traitement. Il est envisageable que l'infection ait un effet rédox masqué par la forte proportion de cellules non infectées parmi les cellules exprimant la PrP et exposées à l'homogénat infectieux. En effet, au huitième passage post-infection, environ 80% des cellules exposées au monomère infectieux ne sont pas infectées. Il aurait été intéressant de réaliser des immunofluorescences à chaque passage pour évaluer l'évolution de cette proportion en fonction du temps : cela sera nécessaire lorsque cette expérience sera répétée.

#### 3.7.3. Conclusion

Aucun effet de l'infection prion sur la réponse cellulaire à un traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est détectable dans notre modèle. Il se peut que la forte proportion de cellules non infectées parmi les cellules exprimant la PrP et exposées à l'homogénat infectieux en soit la cause : au huitième passage, la proportion de cellules infectées est proche de 20% parmi les cellules exprimant la PrP. En moyene, 80% des cellules de la lignée concernée suivies en microscopie pourraient donc ne pas être infectées. En revanche, ces expériences confirment l'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> vis-à-vis de 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 4. Discussion générale

#### 4.1. Mise en place d'outils innovants pour l'étude fine du stress oxydant

Le premier volet de ce travail de thèse a été l'implémentation au laboratoire des outils nécessaires à la poursuite de l'objectif du projet, à savoir l'analyse des perturbations rédox induites par des assemblages protéiques impliqués dans la pathogénèse des maladies à prions et de la maladie d'Alzheimer, et du rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la transduction du signal responsable de ces perturbations. Ces outils sont (i) des modèles cellulaires qui coexpriment, d'une part des polypeptides clés dans les maladies d'Alzheimer ou à prions (peptide A $\beta_{1-40}$  ou protéine PrP), et d'autre part des sondes fluorescentes permettant un suivi précis et dynamique des perturbations de l'homéostasie rédox, (ii) un protocole d'analyse d'images pour quantifier les données obtenues, et (iii) les méthodes statistiques nécessaires à l'analyse de ces données quantitatives.

#### 4.1.1. Modèles cellulaires pour le suivi du stress oxydant en temps réel

Pour établir nos modèles cellulaires, nous avons travaillé avec la lignée RK13. Cette lignée de cellules épithéliales de rein de lapin fait partie des rares lignées immortalisées sensibles à l'infection par un prion (Arellano-Anaya et al., 2017). Elle présente l'avantage de ne pas exprimer de  $PrP^{C}$  endogène détectable, ce qui permet de s'affranchir de potentielles interférences entre  $PrP^{C}$  endogène et  $PrP^{C}$  hétérologue (Sakudo et al., 2007). Après transfection avec un vecteur d'expression de l'allèle VRQ de la protéine prion ovine, cette lignée est infectable par la souche 127S de tremblante du mouton (Vilette et al., 2001). De plus, nos expériences de microscopie confocale suggèrent que, dans une lignée de cellules RK13 exprimant la  $PrP^{C}$ , une clusterisation de la PrP à la membrane des cellules se produit suite à l'exposition à de l'A $\beta$  monomérique exogène, ce qui pourrait indiquer un rôle de la  $PrP^{C}$  comme récepteur à A $\beta$  dans les conditions physiologiques. Cette lignée est ainsi à la fois robuste et facile à cultiver, donc adaptée aux nombreuses mises au point qui ont été nécessaires au début de ce projet, notamment concernant l'utilisation des sondes, et très intéressante pour modéliser l'évolution des maladies neurodégénératives en première analyse.
Pour suivre en temps réel les marqueurs du stress oxydant cellulaire que sont la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le niveau d'oxydation du glutathion, nous avons utilisé deux sondes peptidiques codées génétiquement : la sonde HyPer, qui est oxydée spécifiquement et de façon réversible par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et la sonde Grx1-roGFP2, dont le niveau d'oxydation reflète celui du glutathion. Ces deux sondes sont fluorescentes et ratiométriques en excitation : elles présentent deux pis d'excitation correspondant à leurs formes réduite et oxydée. La fluorescence émise après excitation à chacun de ces deux pics peut être suivie par microscopie à fluorescence sur cellules vivantes, ce qui permet de quantifier le niveau d'oxydation des sondes en temps réel. Ces sondes sont très sensibles et très dynamiques par rapport aux autres méthodes de suivi du stress oxydant telles que les sondes chimiques, comme le montrent des expériences préliminaires que nous avons menées avec la sonde chimique PY1, présentées en annexe (p. 352).

Pour pouvoir étudier le rôle de l'expression de PrP ou Aβ dans l'homéostasie rédox, il a été nécessaire de construire, pour chacune des deux sondes, une lignée coexprimant la sonde avec PrP, une lignée coexprimant la sonde avec Aβ, et une lignée exprimant la sonde seule. Nous avons conçu et construit les vecteurs permettant cette coexpression. Ce sont des plasmides portant à la fois la séquence codant la sonde et la séquence codant PrP ou Aβ, séparées par la séquence P2A. Cette séquence virale conduit à un patinage du ribosome sur l'ARNm lors de la traduction, aboutissant à la synthèse de deux protéines séparées. Après transfection des cellules avec ces vecteurs, nous avons obtenu des lignées cellulaires dans lesquelles la proportion de cellules coexprimant la sonde et le polypeptide d'intérêt demeure stable au cours des passages. La coupure entre sonde et polypeptide d'intérêt ainsi que le niveau d'expression et la localisation des protéines ont été contrôlés par immunofluorescence et western blot. L'expression de la PrP<sup>C</sup> par nos cellules est environ 14 à 24 fois plus élevée que dans des neurones sains, ce qui devrait permettre de favoriser leur infection par des assemblages infectieux de PrP<sup>Sc</sup> (Nishida et al., 2000). Les cellules exprimant Aβ produisent des assemblages oligomériques extracellulaires du peptide, dont la taille est principalement comprise entre 30 et 70 kDa. Dans le milieu de culture, la concentration du peptide est environ cinq fois supérieure à la concentration en A $\beta_{1-40}$  soluble dans le cerveau sain et douze fois inférieure à celle qui est détectée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette lignée paraît donc pertinente pour l'étude de l'effet d'Aβ dans la pathogénèse de la maladie d'Azheimer, qui est généralement associée à une accumulation progressive du peptide Aβ (Sasaguri et al., 2017)

### 4.1.2. Amélioration et automatisation d'un protocole d'analyse d'images

La première approche utilisée pour quantifier le niveau d'oxydation des sondes, le western blot rédox, s'est avérée manquer de sensibilité et n'a pas permis de mettre en évidence d'effet rédox de l'expression endogène de PrP et d'A<sub>β1-40</sub> vis-à-vis de la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, cette méthode, qui est basée sur la séparation par SDS-PAGE des formes réduite et oxydée des sondes dans des lysats cellulaires, ne permet qu'un suivi discret avec un pas de temps élevé, alors que l'entrée d'H2O2 dans les cellules est très rapide : un suivi en continu est donc plus adapté. Nous avons donc donc choisi de suivre le niveau rédox des sondes par microscopie à fluorescence. Pour cela, la première étape a été la mise au point et l'optimisation d'un protocole d'acquisition en time-lapse permettant de conduire à des résultats homogènes. Nos expériences ont montré que la reproductibilité des expériences de suivi rédox des sondes était optimale avec une très faible densité cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que cette meilleure reproductibilité puisse être liée au fait que toutes les cellules sont alors en phase de multiplication, tandis que, quand la densité cellulaire est élevée, des cellules quiescentes coexistent avec des cellules en division (Puliafito et al., 2012). Ensuite, pour analyser les images obtenues, nous nous sommes basés sur une méthode publiée par l'équipe des créateurs de la sonde HyPer (Mishina et al., 2013a). Brièvement, après une étape de débruitage des images, chaque cellule est segmentée à chaque pas de temps, ce qui permet de suivre les cellules même dans les cas où elles bougent ou se déforment au cours de l'acquisition. Les intensités de fluorescence mesurées sur les deux canaux ainsi que sur le ratio sont ensuite quantifiée à l'intérieur des cellules. Nous avons rendu ce processus semi-automatique par l'écriture d'une macro codée sous FIJI, qui fait l'objet de la première partie d'un article méthodologique publié dans le journal MethodsX (Lévy et al., 2020). Cette approche est très complémentaire avec les outils précédemment publiés, à savoir le logiciel d'imagerie rédox quantitative implémenté sous MATLAB de Fricker (Fricker, 2016) et la macro FluoQ (Stein et al., 2013). Ces outils permettent de traiter une très grande quantité d'images, mais ils ne sont adaptés que pour des cellules peu mobiles et dont la morphologie évolue peu au cours du temps. Notre approche est moins rapide, puisque l'utilisateur doit valider la segmentation de chaque cellule, mais elle permet de segmenter des cellules en mouvement, et elle offre à l'utilisateur la possibilité de vérifier les résultats obtenus à chaque étape de l'analyse.

### 4.1.3. Implémentation d'outils pour l'analyse statistique des résultats

Les données quantifiées à partir des images de microscopie, qui reflètent le niveau d'oxydation des sondes, sont des courbes de ratio en fonction du temps : ce sont donc des données fonctionnelles. Pour pouvoir comparer entre elles les courbes obtenues dans les différentes conditions, nous avons fait le choix de décrire chaque courbe par un nombre restreint de paramètres descriptifs. Pour décrire la cinétique d'augmentation du niveau d'oxydation des sondes suite à un traitement exogène par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons choisi le temps de latence, la pente au point d'inflexion, le temps auquel il est atteint, et le temps auquel le maximum est atteint. Nous nous sommes également intéressés au ratio en certains points clés : au début et à la fin de l'acquisition, au point d'inflexion, et au maximum. Enfin, nous avons calculé pour chaque courbe son score sur le premier mode de variation, qui est un score global représentatif du ratio sur l'ensemble de l'acquisition. Ces paramètres sont des variables quantitatives, sur lesquelles des tests statistiques peuvent être effectués, pour analyser les effets des assemblages protéiques testés. La validation de ces paramètres ainsi que la méthode pour les calculer et réaliser les tests statistiques fait l'objet de la deuxième partie de l'article méthodologique reproduit en annexe (Lévy et al., 2020).

Les outils mis au point dans le cadre de ce projet de thèse peuvent être utiles pour toute étude nécessitant le suivi du stress oxydant en modèle cellulaire. Dans le champ de la santé humaine et animale, le stress oxydant joue un rôle dans de nombreuses situations pathologiques. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer et des maladies à prions, mais aussi d'autres maladies neurodégénératives (Kim et al., 2015; Mezzaroba et al., 2019), dont la maladie de Parkinson, caractérisée par l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine (Deas et al., 2016), dont la PrP<sup>C</sup> pourrait médier la toxicité (Cecco and Legname, 2018; Surguchev et al., 2019; Urrea et al., 2017). De façon similaire, le stress oxydant pourrait être à l'origine de la neurotoxicité de certains pesticides (Abdollahi et al., 2004; Fu et al., 2019). Dans le champ de la cancérologie, une étude réalisée au laboratoire montre que l'acide ascorbique à fortes concentrations conduit à un stress oxydant puis à une cytotoxicité sur des cellules de cancer du sein exprimant la sonde HyPer (El Banna et al., 2019). L'utilisation des méthodes d'analyse d'image et d'analyse statistique implémentées dans le cadre de ce projet de thèse pourrait permettre d'affiner l'étude cinétique de cet effet.

### 4.2. Effet sur le stress oxydant de différents assemblages de PrP et d'Aβ<sub>1-40</sub>

La Table XXIII récapitule l'ensemble des effets rédox des différents assemblages des polypeptides d'intérêt, endogènes ou exogènes, qui ont pu être mis en évidence grâce à ces nouveaux outils. L'objet de ce chapitre est une mise en perspective de ces résultats à partir des données de la littérature.

			Conclusion				
Polypeptide endogène	PrP <sup>C</sup>		Effet protecteur vis-à-vis des faibles concentrations d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , potentiellement médié par la glutarédoxine				
	Aβ <sub>1-40</sub> (oligomères)		Effet protecteur vis-à-vis des faibles concentrations $d'H_2O_2$				
Assem- blages de protéines exogènes	PrP	Monomère	Effet antioxydant dépendant de la $PrP^{C}$ après 48 heur d'exposition Sensibilisation à $H_2O_2$ dépendante de la $PrP^{C}$				
		Oligomères	Effet antioxydant dépendant de la PrP <sup>C</sup> aux temps p coces Effet prooxydant dépendant de la PrP <sup>C</sup> , avec sensibil tion à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aux temps plus tardifs				
		Fibres	Effet globalement antioxydant dépendant de la $PrP^{C}$ Sensibilisation à $H_2O_2$ dépendante de la $PrP^{C}$				
		PrP <sup>Sc</sup>	Pas d'effet significatif sur la réponse des cellules à H <sub>2</sub> (peut-être à cause du faible taux d'infection)				
	Αβ1-40	Monomère	Effet globalement antioxydant, surtout sans expression de PrP Sensibilisation à $H_2O_2$ dépendante de la PrP <sup>C</sup>				
		Fibres	Effet prooxydant après 24 et 48 heures d'exposition, avec sensibilisation à $H_2O_2$ , dépendant de l'expression de PrP				

### 4.2.1. Effet de PrP<sup>C</sup> et d'Aβ<sub>1-40</sub> endogènes

### 4.2.1.1. Un effet protecteur vis-à-vis d'un traitement par $H_2O_2$

Le premier volet de nos expériences concerne l'influence sur l'homéostasie rédox des polypeptides se rapprochant le plus de la physiologie, à savoir  $PrP^{C}$  et  $A\beta_{1-40}$  exprimés par les cellules. Nos travaux montrent que l'expression par les cellules de la  $PrP^{C}$  ou du peptide  $A\beta_{1-40}$  est capable de modifier la réponse cellulaire à un traitement exogène par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Suit au traitement, l'expression de la  $PrP^{C}$  et d' $A\beta_{1-40}$  sont associées à une augmentation cytoplasmique de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus tardive et plus lente, ce qui peut être interprété comme un effet protecteur de leur expression vis-à-vis d'un oxydant exogène. L'expression de la  $PrP^{C}$  est également associée à une augmentation plus faible de la concentration cyto-

plasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement. Cet effet protecteur se manifeste à des concentrations de 0 à 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour PrP<sup>C</sup>, et de 10 à 40  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour A $\beta$ . Dans les deux cas, la réponse à 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas modifiée par l'expression du polypeptide, ce qui indique que cet effet protecteur vis-à-vis d'H2O2 est efficace pour des concentrations faibles ou modérées : bien que très élevées devant les concentrations physiologique rapportées dans la littérature, comprises entre 1 et 10 nM (Lyublinskaya and Antunes, 2019; Sies, 2017), ces concentrations sont très faibles devant 500 µM, rapportée comme la concentration conduisant à une mortalité cellulaire de 50% en 1h (Gülden et al., 2010). Ainsi, le maintien de l'homéostasie rédox pourrait être une fonction physiologique de la PrP<sup>C</sup>, ce qui est largement décrit dans la littérature (Castle and Gill, 2017; Gavín et al., 2020; Wong et al., 2001), mais aussi d'Aβ<sub>1-40</sub>, ce qui est plus sujet à controverse. En effet, les études concernant l'effet rédox d'Aβ sont contradictoires, et l'effet d'Aβ est beaucoup moins étudié dans les conditions physiologiques que dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, le monomère d'Aß1-40 est décrit comme antioxydant en culture cellulaire (Zou et al., 2002). La protection vis-à-vis du stress oxydant pourrait ainsi être l'une des fonctions physiologiques du peptide Aß (Brothers et al., 2018). Dans nos modèles, la concentration extracellulaire en Aβ est de l'ordre du nanomolaire, ce qui est plus proche des concentrations physiologiques que des concentrations mesurées dans des cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, mais l'Aß s'accumule dans le milieu principalement sous forme d'oligomères dont les tailles sont comprises entre 32 et 72 kDa, soit 8 à 18 protomères. Or, les oligomères solubles d'A $\beta_{1-40}$  et d'A<sub>β1-42</sub> recombinant sont souvent décrits comme neurotoxiques : ils seraient notamment capables d'initier un stress oxydant (Benilova et al., 2012; Castillo et al., 2019). Cependant, des oligomères solubles d'A<sub>β1-40</sub> existent dans les conditions physiologiques normales (Fukumoto et al., 1996; Kuo et al., 1996), et des oligomères de 10 à 12 protomères d'Aβ1-42 produits dans du milieu de culture cellulaire se sont récemment avérés antioxydants in cel*lulo* (Mitra et al., 2018). Le fait que l'A $\beta_{1-40}$  produit par nos cellules forme des oligomères et soit protecteur vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait indiquer que, dans les conditions physiologiques normales, le peptide Aβ joue un rôle d'antioxydant, y compris sous forme oligomérique. En effet, une multitude d'oligomères d'Aβ différents sont décrits dans la littérature, avec des niveaux et mécanismes de toxicité très variables (Cline et al., 2018). Dans ce cadre, une caractérisation de la structure des oligomères d'A $\beta_{1-40}$  produits par nos cellules serait nécessaire pour pouvoir la comparer à la structure des oligomères rapportés dans la littérature, et ainsi aboutir à une meilleure compréhension des caractéristiques structurales associées à la toxicité rédox d'A $\beta$ .

### 4.2.1.2. Mécanismes de cet effet protecteur

Nos travaux sur la cinétique de l'oxydation du glutathion en réponse à des traitements exogènes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indiquent que l'expression de la PrP<sup>C</sup> est associée à une augmentation plus rapide de la proportion de glutathion oxydé ainsi qu'à une augmentation moindre et retardée de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytoplasme suite au traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> pourrait donc être médié par le couplage de l'oxydation du glutathion avec la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette réaction est catalysée par les glutathion péroxydases (Gpx). Jusqu'à 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les Gpx sont responsables de 80 à 90% de la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un modèle de fibroblastes (Makino et al., 1994). Pour les concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevées, les catalases sont activées, et la proportion de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réduit par les catalases est d'autant plus élevée que la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est élevée (Makino et al., 1994). Ainsi, le fait que l'effet protecteur de la PrP ne soit plus visible vis-à-vis des concentrations de 40 et 75 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> malgré l'oxydation plus rapide du glutathion suite à ces traitements pourrait être due au fait que, pour ces concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les Gpx n'expliquent qu'une faible proportion d l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réduit ; l'activité des catalases est prédominante.

Une étude basée sur des cellules RK13 exprimant de façon inductible une PrP murine indique que l'expression de la PrP<sup>C</sup> ne modifie pas l'activité glutathion péroxydase dans les cellules (Rachidi et al., 2003). Cependant, une étude menée sur la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y montre que l'expression de la PrP<sup>C</sup> sauvage est associée à une plus grande activité de la glutathion péroxydase en réponse à un traitement par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que l'expression de PrP<sup>C</sup> présentant des mutations associées à des maladies (Watt et al., 2005). La même étude indique que la coupure  $\beta$  de la PrP<sup>C</sup> est nécessaire à cet effet, puisque des PrP mutantes ne subissant pas cette coupure sont incapables de protéger les cellules vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De nombreux autres mécanismes protecteurs vis-à-vis du stress oxydant sont décrits dans la littérature pour la PrP<sup>C</sup> : l'augmentation de la concentration en glutathion dans les cellules (Rachidi et al., 2003; Zhang et al., 2020), de l'activité des glutathion réductases (Puig et al., 2020; Rachidi et al., 2003; Weise et al., 2004) et de différentes superoxyde dismutases (Brown et al., 1997b; Collins et al., 2018; Rachidi et al., 2003; Stańczak and Kozlowski, 2007), ainsi que le maintien de l'homéostasie du cuivre (Rachidi et al., 2003; Vassallo and Herms, 2003) et du fer (Singh et al., 2013). Il serait intéressant d'étudier ces mécanismes dans nos modèles cellulaires : l'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup> pourrait s'expliquer par un ou plusieurs d'entre eux. De plus, la plupart de ces méanismes ont été démontrés dans un modèle très proche du nôtre, à savoir des cellules RK13 exprimant de façon inductible par la doxycycline une PrP<sup>C</sup> de souris (Rachidi et al., 2003). La Figure 91A présente le mécanisme par lesquels la PrP<sup>C</sup> pourrait favoriser la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grâce au glutathion.

Malheureusement, nous n'avons pas pu analyser l'effet de l'expression endogène d'A $\beta_{1-40}$  par les cellules sur l'oxydation du glutathion en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en raison d'une très faible intensité de fluorescence de la lignée correspondante conduisant à des résultats extrêmement bruités. Une oxydation directe par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du peptide extracellulaire, couplée à la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau, pourrait intervenir (Figure 91B). Une étude publiée en 2002 indique également que le monomère d'A $\beta_{1-40}$  est capable de chélater les ions Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup>, ce qui protège les cellules contre le stress oxydant induit par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Haber and Weiss, 1932; Zou et al., 2002) (Figure 91B). Même si cette étude indique que le peptide Aβ perd son effet protecteur dès lors qu'il n'est plus monomérique, la capacité d'Aβ<sub>1-40</sub> à chélater ces ions métalliques a également été démontrée *in vitro* pour des concentrations nanomolaires à micromolaires du peptide sous forme d'agrégats amyloïdes (Baruch-Suchodolsky and Fischer, 2009). Il est possible que la structure des agrégats d'Aß soit différente entre les deux études, ce qui expliquerait que leurs effets rédox observés soient différents. En effet, une étude plus récente indique que des oligomères d'Aβ1-42 produits dans du milieu de culture cellulaire protègent les cellules contre le stress oxydant induit par un excès de cuivre, tandis que des oligomères du même peptide produits dans du PBS sont pro-oxydants (Mitra et al., 2018). Cependant, aucune de ces études ne rapporte d'effet

protecteur d'Aβ vis-à-vis d'H2O2. La protection vis-à-vis d'H2O2 met probablement en jeu d'autres mécanismes que la protection vis-à-vis des ions métalliques : en effet, le monomère d'Aβ<sub>1-40</sub>, bien que protecteur vis-à-vis du cuivre et du fer, serait sans effet vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zou et al., 2002). On peut donc supposer que, dans nos modèles cellulaires, l'effet protecteur des oligomères d'Aβ pourrait impliquer les péroxydases ou les catalases, qui sont les prinipales enzymes impliquées dans la réduction de l'H2O2 : les péroxydases principalement pour des concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jusqu'à 10 µM, et les catalases pour les concentrations plus élevées (Makino et al., 1994). Même si une ancienne étude rapporte que certains agrégats d'Aβ se lient à la catalase et l'inhibent *in vitro* (Milton, 1999), une étude ultérieure montre que, *in cellulo*, les cellules survivant à une exposition à Aβ présentent des niveaux plus élevés de catalase (Milton, 2001). Cet effet apparaît très dépendant du type d'agrégats d'Aß (Milton and Harris, 2009) : il est donc envisageable que l'effet protecteur des oligomères d'Aβ produits par nos cellules soit médié par la catalase (Figure 91B). Cela expliquerait que l'expression d'Aβ<sub>1-40</sub> soit protectrice vis-à-vis de concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevées que l'expression de PrP<sup>C</sup>. L'effet antioxydant du peptide Aβ produit par nos modèles cellulaires, à une concentration supérieure aux conditions physiologiques normales mais inférieure aux concentrations mesurées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, pourrait ainsi indiquer que la surproduction d'Aβ au cours de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer permet dans un premier temps de lutter contre le stress oxydant, qui précèderait alors l'accumulation d'Aβ dans l'étiologie de la maladie (Kontush, 2001).



### Figure 91 : Mécanismes putatifs de protection vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'expression endogène de PrP<sup>C</sup> (à gauche) ou d'A $\beta_{1-40}$ (à droite)

A : Mécanismes putatifs de protection de vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la PrP<sup>C</sup> exprimée par les cellules. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté au milieu de culture entre dans les cellules *via* des aquaporines (Wang et al., 2020a) ou est généré à l'intérieur des cellules en réponse à la phototoxicité (Marek et al., 2018) (1). La réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau est catalysée par plusieurs enzymes, dont les glutathion péroxydases, qui couplent réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et oxydation du glutathion (cadre violet) (Flohé and Brand, 1969).

B : Mécanismes putatifs de protection vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'A $\beta$  produit par les cellules. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté au milieu de culture entre dans les cellules *via* des aquaporines (Wang et al., 2020a) (1). L'oxydation directe de l'A $\beta$  extracellulaire par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait contribuer à diminuer la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le milieu (2). A l'intérieur des cellules, l'A $\beta$  pourrait jouer un rôle protecteur contre les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss grâce à sa capacité à séquestrer les ions fer et cuivre (Baruch-Suchodolsky and Fischer, 2009; Mitra et al., 2018; Zou et al., 2002) (3). Nos données suggèrent par ailleurs un effet d'A $\beta$  sur la réduction précoce de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peut-être *via* l'activation d'une enzyme antioxydante comme la catalase (4).

# 4.2.2. Rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la transduction du signal rédox en réponse à différents assemblages de PrP et d'Aβ

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la médiation des perturbations rédox causées par différents assemblages de protéines dans le cadre de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer et des maladies à prions. Nous avons travaillé avec des assemblages d'Aβ<sub>1-40</sub> recombinant (monomère et fibres amyloïdes), des assemblages de PrP recombinante (monomères, oligomères, et fibres), et des homogénats de cerveau de souris, infectieux ou non.

#### **4.2.2.1.** Effet d'A<sub>β1-40</sub> monomérique et fibrillaire

Nos expériences montrent que l'A $\beta_{1-40}$  monomérique exogène sensibilise les cellules à un traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 48 h d'exposition. Ce résultat est surprenant, dans la mesure où (i) l'expression endogène du même peptide pendant 48 heures est protectrice vis-à-vis du stress oxydant pour nos cellules, et (ii) le monomère d'A $\beta_{1-40}$  exogène apparaît protecteur vis-à-vis de la phototoxicité au cours des trois premières heures d'exposition et entre 47,5 et 48h d'exposition, que les cellules expriment ou non la PrP. Cet effet d'A $\beta$  sur la réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> se traduit par une abolition de l'effet protecteur de la PrP<sup>C</sup>. Une interaction entre A $\beta_{1-40}$  monomérique exogène et PrP<sup>C</sup> pourrait en être la cause. Nos expériences suggèrent que cette interaction existe dans le modèle RK13 (Grznarova et al., en révision).

Il est également envisageable que le peptide A $\beta$  se soit agrégé au cours de l'expérience : *in vitro*, le chauffage à 37°C d'une solution de peptide A $\beta_{1-40}$  recombinant en solution aqueuse conduit en 12 heures à la formation de feuillets  $\beta$ , qui favorisent l'agrégation, pour des concentrations comprises entre 3,5 et 69  $\mu$ M (Gursky and Aleshkov, 2000). Or, nos expériences montrent que les fibres d'A $\beta_{1-40}$  exercent un effet pro-oxydant médié par l'expression de PrP après 48 heures d'exposition. Cela suggère que le rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la médiation de la toxicité d'A $\beta$ , principalement documenté dans la littérature pour des assemblages oligomériques (Salazar and Strittmatter, 2017; Um et al., 2012), existe également pour des fibres amyloïdes. Cet effet se traduit (i) par une concentration cytoplasmique basale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée suite à une exposition à A $\beta$  et (ii) par une augmentation plus importante de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite à un traitement exogène. L'augmentation du ratio reste en revanche plus lente que sans expression de la PrP<sup>C</sup>. Donc, les fibres d'A $\beta_{1-40}$ n'affectent pas la capacité de la PrP<sup>C</sup> à retarder l'augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite au traitement, leur effet pro-oxydant est plus tardif.

La transduction de cet effet pro-oxydant *via* la PrP<sup>C</sup> pourrait être médiée par une activation des NADPH oxydases (NOX). En effet, ces enzymes sont activées suite à la liaison de la PrP<sup>C</sup> à un anticorps mimant un ligand, y compris dans des cellules non neuronales (Schneider et al., 2003), et il existe *in vitro* une interaction entre PrP<sup>C</sup> et fibres d'Aß (Nieznanski et al., 2014). Les NOX sont des complexes enzymatiques transmembranaires ubiquitaires, très conservés parmi les eucaryotes (Scott, 2015). Elles catalysent l'oxydation du NADPH en NADP<sup>+</sup>, associée à la libération d'anion superoxyde O<sub>2</sub>.<sup>-</sup>. Cet anion radicalaire a un rôle de second messager impliqué dans différentes voies de signalisation (Case, 2017), y compris dans l'activation de protéases (Jang et al., 2020), mais il s'agit également d'une ERO, toxique en trop grande guantité. Les superoxides dismutases cellulaires le convertissent rapidement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, moins réactif (Fridovich, 1975; Wang et al., 2018), et la PrP<sup>C</sup> est rapportée comme activatrice de différentes superoxyde dismutases in vivo, même si les mécanismes de cette activation sont mal compris (Brown et al., 1997b; Collins et al., 2018; Stańczak and Kozlowski, 2007). Donc, une activation trop importante des NOX aboutirait (i) à une augmentation de la concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et (ii) à une perte du pouvoir réducteur du NADH, qui est nécessaire pour restaurer le pouvoir réducteur du glutathion via les glutathion réductases (Fernandez-Marcos and Nóbrega-Pereira, 2016), et donc à une moins bonne élimination de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les glutathion péroxydases. Ce mécanisme est présenté par la Figure 92. Cela est cohérent avec les études publiées qui indiquent qu'une activité anormalement élevée des NOX participe à l'évolution de la maladie d'Alzheimer (Ansari and Scheff, 2011; Zekry et al., 2003) et est dépendante de l'expression de la PrP<sup>C</sup> (Walsh et al., 2014). De plus, dans les neurones, la toxicité d'Aß est médiée par l'activation via la PrP<sup>C</sup> de la Fyn kinase (Larson et al., 2012), qui est capable d'activer les NOX (Schneider et al., 2003).



### Figure 92 : Proposition de mécanisme pour l'effet pro-oxydant des fibres d'A $\beta_{1-40}$ sur les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup>

Les fibres d'A $\beta_{1-40}$  n'altèrent pas l'effet retard associé à l'expression de PrP sur l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire suite à un traitement exogène par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : on peut donc penser que le potentiel effet activateur de la PrP<sup>C</sup> sur les glutathion péroxydases reste inchangé (1). En revanche, les fibres conduisent à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supérieure en l'absence de traitement, et inhibent la diminution de la concentration intracellulaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite à un traitement par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il se peut que leur interaction avec la PrP<sup>C</sup> active les NADPH oxydases (Schneider et al., 2003) (2), conduisant (i) à l'oxydation en NAD<sup>+</sup> du NADH, H<sup>+</sup>, qui est nécessaire pour restaurer le pouvoir réducteur du glutathion (Fernandez-Marcos and Nóbrega-Pereira, 2016), et (ii) à la formation d'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>--</sup>, rapidement réduit en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les superoxyde dismutases cellulaires (Wang et al., 2018), qui peuvent être activées par la PrP<sup>C</sup> (Brown et al., 1997b; Collins et al., 2018; Rachidi et al., 2003; Stańczak and Kozlowski, 2007).

### 4.2.2.2. Effet de PrP monomérique, oligomérique et fibrillaire

Nos expériences montrent que le monomère de PrP recombinante est pro-oxydant vis-à-vis d'un traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 48 heures d'exposition, et que cet effet dépend de l'expression de PrP<sup>C</sup> par les cellules. Son agrégation spontanée est peu probable dans nos conditions de culture cellulaire (Rezaei et al., 2005). On pourrait envisager que la PrP monomérique présente dans le milieu de culture interagisse avec la PrP<sup>C</sup> des cellules,

mimant la dimérisation induite par les ligands physiologiques de la PrP<sup>C</sup> (Roucou, 2014), ce qui pourrait activer des voies de signalisation en aval, dont, comme pour A $\beta$ , les NOX, aboutissant à la libération de l'anion superoxyde et à la perte de pouvoir réducteur du NADPH (Schneider et al., 2003). Toutefois, ce mécanisme seul conduirait à une augmentation de la concentration cytoplasmique basale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui n'est pas le cas ici : l'effet pro-oxydant du monomère de PrP n'est visible que vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cela pourrait suggérer l'existence de mécanismes de compensation en absence de traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

De façon similaire, les fibres de PrP sensibilisent les cellules exprimant la PrP<sup>C</sup> à un traitement par 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais elles sont associées à une concentration cytoplasmique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible en absence de traitement : si les NOX sont activées par les fibres de PrP, cet effet est probablement compensé par un autre mécanisme jusqu'à l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les oligomères de PrP ont quant à eux un effet pro-oxydant, visible à la fois au niveau de la concentration cytoplasmique basale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la réponse des cellules à 10  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : il est donc possible que cet effet pro-oxydant soit dû à une activation *via* la PrP<sup>C</sup> des NOX, selon le mécanisme présenté par la Figure 92.

Ce mécanisme pourrait donc être commun à l'initiation du stress oxydant au cours de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer et des maladies à prions. Il est intéressant de noter que la NADPH oxydase NOX2, qui est exprimée à la fois dans le cerveau (Cooney et al., 2013) et dans les cellules épithéliales (Regmi et al., 2014), est surexprimée dans la microglie de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et de souris infectées, et que cette surexpression participe à la pathogénèse de la maladie, puisque l'inhibition de NOX2 conduit à une prolongation de la survie des souris infectées (Sorce et al., 2014).

### 4.2.2.3. Comparaison de l'effet rédox des différents assemblages de protéines

La comparaison de l'effet des différents assemblages deux à deux semble indiquer que, dans nos modèles cellulaires, les oligomères de PrP sont plus perturbateurs de l'homéostasie rédox que les fibres de PrP, et les fibres d'Aß sont plus perturbatrices que les fibres de PrP (Table XXIV).

## Table XXIV : Comparaison des scores sur le premier mode de variation en fonction de l'exposition aux différents assemblages de protéines exogène

Chaque ligne correspond à la comparaison entre deux tampons ou deux assemblages de protéines. Les + et les – indiquent respectivement un score médian plus ou moins élevé pour les cellules exposées à l'assemblage ou au tampon souligné par rapport aux cellules exposées à l'autre assemblage ou tampon.

	0 → 3h		23,5 <del>→</del> 24h		47,5 <del>→</del> 48h		Ajout d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Endogène	Ø	PrP	Ø	PrP	Ø	PrP	Ø	PrP
<u>Tp fibres A<math>\beta</math></u> /	2	~	_	~	~	_	~	~
tp fibres PrP	~			~	~~			
tp oligos PrP/	~	~	~	æ	æ	æ	~	~
tp fibres PrP								
<u>Oligos PrP</u> /	*	*	ĸ	+	æ	+	+	+
fibres PrP								
<u>fibres Aβ</u> /	~	~	~		~		~	~
fibres PrP	~	22	~	Ť	2	Ŧ	~	~

Cela est cohérent avec la plupart des études, qui indiquent que les assemblages oligomériques sont plus toxiques que les fibres, que ce soit pour Aβ (Cheng et al., 2007; Lesné et al., 2006; Sengupta et al., 2016) ou pour PrP (Bardelli et al., 2018; Simoneau et al., 2007). Il faut toutefois noter que les fibres de PrP et d'Aβ induisent des perturbations rédox significatives dans nos modèles, même si les perturbations générées par les fibres de PrP sont plus faibles que celles dues aux oligomères. Deux hypothèses peuvent être proposées. A concentration équivalent monomère égale, il y a un plus grand nombre d'oligomères que de fibres dans le même volume de milieu, donc un plus grand nombre de ligands potentiels de la PrP<sup>C</sup>. Les oligomères peuvent de plus avoir une toxicité directe, notamment liée à leur capacité à perméabiliser les bicouches lipidiques (Huin et al., 2020; Kayed et al., 2004) ; toutefois, comme nos expériences ne montrent pas de perturbation rédox induite par les assemblages pour les cellules n'exprimant pas la PrP<sup>C</sup>, la première hypothèse est à privilégier.

### 4.2.2.4. Effet rédox de l'infection prion

Nos travaux ont mis en évidence un effet pro-oxydant médié par l'expression de la PrP<sup>C</sup> de différents assemblages de protéines recombinants proches de ceux qui sont observés dans le cadre des maladies neurodégénératives. Pour nous rapprocher des conditions

de la pathogénèse des maladies à prions, nous avons souhaité infecter par une souche de tremblante du mouton nos modèles cellulaires coexprimant la PrP<sup>C</sup> avec les sondes rédox.

Malgré plusieurs expériences indépendantes, les cellules coexprimant la PrP<sup>C</sup> avec la sonde Grx-roGFP, spécifique du glutathion, paraissent insensibles à l'infection prion. Une hypothèse pourrait être que, dans ces cellules, la surexpression de la glutarédoxine en fusion avec la sonde inhibe l'oxydation de certains résidus de la PrP<sup>C</sup>, qui semble nécessaire à sa conversion en PrP<sup>Sc</sup> (Wolschner et al., 2009). Toutefois, nous avons montré une indépendance entre niveau d'expression de la sonde et réponse des cellules à un traitement par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène, qui suggère que la surexpression de la Grx dans nos modèles cellulaires n'a pas d'effet majeur sur l'homéostasie rédox cellulaire.

Pour les cellules exprimant HyPer, on détecte de la PrP<sup>sc</sup> en immunofluorescence et en western blot, mais seules 20% des cellules sont infectées après huit passages, et la proportion de cellules infectées aux passages plus précoces est inconnue. Nos expériences de suivi de la réponse rédox des cellules à un traitement exogène par 10 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours des passages ne permettent pas de mettre en évidence d'effet de l'infection prion des cellules sur leur sensibilité à un oxydant exogène, ce qui pourrait être dû à la faible proportion de cellules infectées.

#### 4.3. Perspectives

A court terme, les modèles cellulaires mis en place au cours de ce projet pourront être utilisés pour étudier l'effet d'oligomères d'A $\beta_{1-40}$  recombinant sur le stress oxydant afin de le comparer à l'effet des fibres. L'étude de l'effet d'assemblages d'A $\beta_{1-42}$  sur l'homéostasie rédox serait également très informatrice, car ce peptide est souvent décrit comme plus toxique qu'A $\beta_{1-40}$ . Identifier les assemblages d'A $\beta$  les plus perturbateurs de l'homéostasie rédox serait une étape essentielle dans la compréhension de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer.

La principale perspective à court et moyen terme de ce projet de recherche est l'étude des mécanismes conduisant à l'initiation du stress oxydant par les différents assemblages de

protéines impliqués dans les maladies neurodégénératives. Dans un premier temps, les hypothèses que nous proposons concernant les mécanismes en jeu pourraient être testées par des western blots anti-glutathion péroxydase, anti-catalase et anti-NADPH oxydase suite à l'exposition des cellules aux différents assemblages avec et sans expression de PrP<sup>C</sup>. Une approche de western blot classique requerrait une important quantité d'assemblages de protéines, car, pour rester dans les conditions de la microscopie, la densité cellulaire devrait être extrêmement faible. L'implémentation au laboratoire de la technique de western blot sur cellule unique (Hughes et al., 2014) permettrait de pallier ces limites du western blot conventionnel. En première approche, les ARN messagers pourraient être analysés par PCR quantitative. L'étude de l'évolution de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la proportion de glutathion oxydé dans le noyau et les mitochondries en réponse aux différents assemblages grâce à l'adressage des sondes à ces compartiments pourrait également être informatrice sur les organites les plus touchées par le stress oxydant, et donc donner des indices sur les voies potentiellement impliquées. Une approche plus intégrative pourrait enfin être envisagée pour identifier les voies impliquées dans l'effet pro-oxydant des assemblages exogènes. Le biotin-switch redoxome, qui consiste à identifier par spectrométrie de masse les protéines dont une ou plusieurs cystéines sont oxydées de façon réversible suite à un traitement prooxydant, a déjà été utilisée au laboratoire, mais présente l'inconvénient de nécessiter de grandes quantités d'assemblages de protéines recombinantes (El Banna et al., 2019).

A plus long terme, la stratégie expérimentale développée au cours de ce projet de thèse pourrait être transposée dans des modèles plus physiologiques des maladies neurodégénératives, comme des cultures de neurones, primocultivés ou différenciés *in vitro* à partir de cellules souches induites par reprogrammation. Une approche microfluidique pourrait par la suite permettre de reconstruire des réseaux avec ces neurones, afin d'étudier la potentielle propagation spatiale du stress oxydant de neurone à neurone en réponse à une exposition localisée aux assemblages pathologiques (Bett et al., 2017; Deleglise et al., 2014; Lassus et al., 2016).

### 4.4. Conclusion générale

Nos travaux ont conduit (i) à la mise en place de nouveaux outils, dont l'utilisation pourra être étendue à d'autres projets du laboratoire, (ii) à la mise en évidence d'un effet protecteur de l'expression de PrP<sup>C</sup> et d'A $\beta_{1-40}$  dans des conditions proches des conditions physiologiques, et (iii) à l'identification d'un rôle clé de la PrP<sup>C</sup> dans la médiation des perturbations rédox induites par différents assemblages de protéines proches des assemblages pathologiques des maladies neurodégénératives. Nous avons de plus montré que les oligomères de PrP étaient plus perturbateurs que les fibres de PrP, et que les fibres d'Aß étaient plus perturbatrices que les fibres de PrP. La Figure 93 présente des mécanismes putatifs pour l'effet rédox de la PrP<sup>C</sup> dans les conditions physiologiques et la maladie. Nos données suggèrent que, en temps normal, la PrP<sup>C</sup> est associée à une activité glutathion péroxydase plus forte en réponse à  $H_2O_2$ , permettant une élimination plus rapide de cet oxydant. L'A $\beta_{1-40}$ monomérique produit par les cellules pourrait limiter la toxicité associée à H2O2 d'une part en chélatant les ions cuivre et fer nécessaires à la réation de Fenton, et d'autre part en activant les catalases. En présence d'assemblages pathologiques, l'une des voies de signalisation normales de la PrP<sup>C</sup>, qui aboutit à la libération par la NADPH oxydase de petites quantités d'anion superoxyde ayant un rôle de second messager, pourrait être suractivée, ce qui aboutirait à la mise en place d'un stress oxydant cellulaire chronique.



## Figure 93 : Proposition de mécanismes pour l'effet de la PrP<sup>C</sup> dans la régulation ou la perturbation de l'homéostasie rédox

Nos données expérimentales suggèrent que, suite à une augmentation de la concentration cytoplamique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due par exemple à un stress environnemental, la PrP est capable d'activer la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, couplée à l'oxydation du glutathion par des glutathion péroxydases. La PrP<sup>C</sup> a également un rôle physiologique dans la signalisation cellulaire, qui passe par l'activation transitoire de la NADPH oxydase conduisant à la libération de l'anion radicalaire superoxyde, qui a un rôle de second messager (Schneider et al., 2003). Nous proposons que les assemblages pathologiques puissent conduire à une suractivation de cette voie, conduisant à un excès d'anion superoxyde, converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les superoxyde dismutases (Wang et al., 2018). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'accumule alors en quantités trop importantes pour les systèmes antioxydants cellulaires, et peut être converti en radical hydroxyle cytotoxique *via* les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, qui nécessitent des cofacteurs métalliques. Dans les conditions physiologiques normales, certains assemblages non pathologiques d'Aβ pourraient jouer un rôle protecteur contre la réaction de Fenton grâce à leur capacité à séquestrer les ions fer et cuivre (Mitra et al., 2018; Zou et al., 2002). Nous proposons un deuxième méanisme protecteur, qui passerait par l'activation de catalases.

### 5. Références

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., and Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. Med. Sci. Monit. *10*, RA141-147.

Aguzzi, A. (2001). Recent developments in the pathogenesis, diagnosis, and therapy of prion diseases. Dialogues Clin Neurosci *3*, 25–36.

Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. Annual Review of Pathology *3*, 11–40.

Akterin, S., Cowburn, R.F., Miranda-Vizuete, A., Jiménez, A., Bogdanovic, N., Winblad, B., and Cedazo-Minguez, A. (2006). Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in  $\beta$ -amyloid toxicity and Alzheimer's disease. Cell Death and Differentiation *13*, 1454–1465.

Albrecht, S.C., Sobotta, M.C., Bausewein, D., Aller, I., Hell, R., Dick, T.P., and Meyer, A.J. (2014). Redesign of Genetically Encoded Biosensors for Monitoring Mitochondrial Redox Status in a Broad Range of Model Eukaryotes. J Biomol Screen *19*, 379–386.

Albuali, W.H. (2014). Evaluation of oxidant-antioxidant status in overweight and morbidly obese Saudi children. World J Clin Pediatr *3*, 6–13.

Alleaume-Butaux, A., Nicot, S., Pietri, M., Baudry, A., Dakowski, C., Tixador, P., Ardila-Osorio, H., Haeberlé, A.-M., Bailly, Y., Peyrin, J.-M., et al. (2015). Double-Edge Sword of Sustained ROCK Activation in Prion Diseases through Neuritogenesis Defects and Prion Accumulation. PLoS Pathog *11*, e1005073.

Almberg, E.S., Cross, P.C., Johnson, C.J., Heisey, D.M., and Richards, B.J. (2011). Modeling Routes of Chronic Wasting Disease Transmission: Environmental Prion Persistence Promotes Deer Population Decline and Extinction. PLOS ONE *6*, e19896.

Alper, T., Haig, D.A., and Clarke, M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. Biochemical and Biophysical Research Communications *22*, 278–284.

Aluise, C.D., Robinson, R.A.S., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Cai, J., Pierce, W.M., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. (2010). Preclinical Alzheimer disease: Brain oxidative stress, Aβ peptide and proteomics. Neurobiology of Disease *39*, 221–228.

Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Z. f. d. g. Neur. u. Psych. *4*, 356.

Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K.L., Barde, Y.-A., Duff, K., and Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. J. Neurochem. *86*, 582–590.

Andréoletti, O., Litaise, C., Simmons, H., Corbière, F., Lugan, S., Costes, P., Schelcher, F., Vilette, D., Grassi, J., and Lacroux, C. (2012). Highly Efficient Prion Transmission by Blood Transfusion. PLoS Pathog *8*.

Ansari, M.A., and Scheff, S.W. (2011). NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression. Free Radical Biology and Medicine *51*, 171–178.

Aoyagi, A., Condello, C., Stöhr, J., Yue, W., Rivera, B.M., Lee, J.C., Woerman, A.L., Halliday, G., Duinen, S. van, Ingelsson, M., et al. (2019). A $\beta$  and tau prion-like activities decline with longevity in the Alzheimer's disease human brain. Science Translational Medicine *11*.

Arellano-Anaya, Z.E., Huor, A., Leblanc, P., Andréoletti, O., and Vilette, D. (2017). Expression of Heterologous PrP and Prion Propagation in RK13 Cells. Methods Mol. Biol. *1658*, 95–104.

Armiento, A., Moireau, P., Martin, D., Lepejova, N., Doumic, M., and Rezaei, H. (2017). The mechanism of monomer transfer between two structurally distinct PrP oligomers. PLoS ONE *12*, e0180538.

Aronoff-Spencer, E., Burns, C.S., Avdievich, N.I., Gerfen, G.J., Peisach, J., Antholine, W.E., Ball, H.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., and Millhauser, G.L. (2000). Identification of the Cu2+ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. Biochemistry *39*, 13760–13771.

Assistance publique hôpitaux de Paris (2019). Prise en charge médicale.

Atabay, C., Cagnoli, C. m., Kharlamov, E., Ikonomovic, M. d., and Manev, H. (1996). Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: Protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. Journal of Neuroscience Research *43*, 465–475.

Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., and Martins, R.N. (2003). Amyloid-β: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-b. Brain Research Reviews 16.

Auboyer, L., Monzo, C., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Gabelle, A., Gazagne, I., Cacheux, V., Lehmann, S., and Crozet, C. (2019a). Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) IRMBi002-A from an Alzheimer's disease patient carrying a D694N mutation in the APP gene. Stem Cell Research *37*, 101438.

Auboyer, L., Monzo, C., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Gabelle, A., Gazagne, I., Cacheux, V., Lehmann, S., and Crozet, C. (2019b). Generation of induced pluripotent stem cells (IRMBi001-A) from an Alzheimer's disease patient carrying a G217D mutation in the PSEN1 gene. Stem Cell Research *34*, 101381.

Babelhadj, B., Di Bari, M.A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S.B.S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., and Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. Emerg Infect Dis *24*, 1029–1036.

Bahr, B.A., Kessler, M., Rivera, S., Vanderklish, P.W., Hall, R.A., Mutneja, M.S., Gall, C., and Hoffman, K.B. (1995). Stable maintenance of glutamate receptors and other synaptic components in long-term hippocampal slices. Hippocampus *5*, 425–439.

Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 11241–11246.

Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Sclip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., et al. (2010). Synthetic amyloid-β oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. PNAS *107*, 2295–2300.

Banach-latapy, A., He, T., Dardalhon, M., Vernis, L., Chanet, R., and Huang, M. (2013). Redoxsensitive YFP sensors for monitoring dynamic compartment-specific glutathione redox state. Free Radical Biology and Medicine *65*, 436–445.

Bardelli, M., Frontzek, K., Simonelli, L., Hornemann, S., Pedotti, M., Mazzola, F., Carta, M., Eckhardt, V., D'Antuono, R., Virgilio, T., et al. (2018). A bispecific immunotweezer prevents soluble PrP oligomers and abolishes prion toxicity. PLOS Pathogens *14*, e1007335.

Barrairon, E. (1989). La découverte par Cuillé et Chelle des « Maladies virales lentes » à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse dans les années 30 : un témoignage à l'ombre des « inventeurs » ! Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 15.

Baruch-Suchodolsky, R., and Fischer, B. (2009). Aβ40, either Soluble or Aggregated, Is a Remarkably Potent Antioxidant in Cell-Free Oxidative Systems. Biochemistry *48*, 4354–4370.

Bate, C., and Williams, A. (2011). Amyloid-β-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. Journal of Biological Chemistry *286*, 37955–37963.

Beck, J.A., Campbell, T.A., Adamson, G., Poulter, M., Uphill, J.B., Molou, E., Collinge, J., and Mead, S. (2008). Association of a null allele of SPRN with variant Creutzfeldt–Jakob disease. J Med Genet *45*, 813–817.

Behl, C. (1997). Amyloid  $\beta$ -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. Cell Tissue Res *290*, 471–480.

Belousov, V.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Staroverov, D.B., and Shakhbazov, K.S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular oxygen peroxide. Nature Methods *5*, 515–530.

Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascsak, R.J., Cashman, N.R., and Bolton, D.C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. Neurology *42*, 149–149.

Benestad, S.L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., and Vikøren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. Vet. Res. *47*, 88.

Benilova, I., Karran, E., and Strooper, B.D. (2012). The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. Nat Neurosci *15*, 349–357.

Beringue, V. (2017). Les prions, agents d'encéphalopathies transmissibles chez les mammifères. Bul. de l'Ac. Vét. de France 162.

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. Journal of Virology *74*, 5432–5440.

Béringue, V., Vilotte, J.-L., and Laude, H. (2008a). Prion agent diversity and species barrier. Vet. Res. *39*, 47.

Béringue, V., Herzog, L., Reine, F., Le Dur, A., Casalone, C., Vilotte, J.-L., and Laude, H. (2008b). Transmission of Atypical Bovine Prions to Mice Transgenic for Human Prion Protein. Emerg Infect Dis *14*, 1898–1901.

Berr, C., Helbecque, N., Sazdovitch, V., Mohr, M., Amant, C., Amouyel, P., Alpérovitch, A., and Hauw, J.-J. (2003). Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing. Acta Neuropathol *106*, 71–74.

Bett, C., Lawrence, J., Kurt, T.D., Orru, C., Aguilar-Calvo, P., Kincaid, A.E., Surewicz, W.K., Caughey, B., Wu, C., and Sigurdson, C.J. (2017). Enhanced neuroinvasion by smaller, soluble prions. Acta Neuropathologica Communications *5*, 32.

Bian, J., Napier, D., Khaychuck, V., Angers, R., Graham, C., and Telling, G. (2010). Cell-Based Quantification of Chronic Wasting Disease Prions. J Virol *84*, 8322–8326.

Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., and Freedman, L.S. (1978). Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. Cancer Res *38*, 3751–3757.

Bilan, D.S., Pase, L., Joosen, L., Gorokhovatsky, A.Yu., Ermakova, Y.G., Gadella, T.W.J., Grabher, C., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2013). HyPer-3: A Genetically Encoded H2O2 Probe with Improved Performance for Ratiometric and Fluorescence Lifetime Imaging. ACS Chem. Biol. *8*, 535–542.

Bishop, M., Hart, P., Aitchison, L., Baybutt, H., Plinston, C., Thomson, V., Tuzi, N., Head, M., Ironside, J., Will, R., et al. (2006). Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. The Lancet Neurology *5*, 393–398.

Bisht, K., Sharma, K., and Tremblay, M.-È. (2018). Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. Neurobiol Stress 9, 9–21.

Björnberg, O., Østergaard, H., and Winther, J.R. (2006). Mechanistic Insight Provided by Glutaredoxin within a Fusion to Redox-Sensitive Yellow Fluorescent Protein. Biochemistry *45*, 2362– 2371.

Bloom, G.S. (2014). Amyloid-β and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. JAMA Neurol *71*, 505–508.

Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. Science *218*, 1309–1311.

Bonda, D.J., Bajić, V.P., Spremo-Potparevic, B., Casadesus, G., Zhu, X., Smith, M.A., and Lee, H.G. (2010). Review: Cell cycle aberrations and neurodegeneration. Neuropathology and Applied Neurobiology *36*, 157–163.

Bonini, M.G., Rota, C., Tomasi, A., and Mason, R.P. (2006). The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescin to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? Free Radical Biology and Medicine *40*, 968–975.

Bosque, P.J., and Prusiner, S.B. (2000). Cultured Cell Sublines Highly Susceptible to Prion Infection. J. Virol. *74*, 4377–4386.

Bourgognon, J.-M., Spiers, J.G., Scheiblich, H., Antonov, A., Bradley, S.J., Tobin, A.B., and Steinert, J.R. (2018). Alterations in neuronal metabolism contribute to the pathogenesis of prion disease. Cell Death Differ.

Bove-Fenderson, E., Urano, R., Straub, J.E., and Harris, D.A. (2017). Cellular prion protein targets amyloid-β fibril ends via its C-terminal domain to prevent elongation. J. Biol. Chem. *292*, 16858–16871.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol *82*, 239–259.

Braak, H., and Del Tredici, K. (2011). Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? Acta Neuropathol *121*, 589–595.

Brandner, S., and Jaunmuktane, Z. (2017). Prion disease: experimental models and reality. Acta Neuropathol *133*, 197–222.

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 neuro-toxicity. Nature *379*, 339–343.

Breydo, L., Makarava, N., and Baskakov, I.V. (2008). Methods for conversion of prion protein into amyloid fibrils. Methods Mol. Biol. *459*, 105–115.

Brion, J.P., Passareiro, H., Nunez, J., and Durand, J.F. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer.

Brion, J.-P., Tremp, G., and Octave, J.-N. (1999). Transgenic Expression of the Shortest Human Tau Affects Its Compartmentalization and Its Phosphorylation as in the Pretangle Stage of Alzheimer's Disease. The American Journal of Pathology *154*, 255–270.

Brothers, H.M., Gosztyla, M.L., and Robinson, S.R. (2018). The Physiological Roles of Amyloid-β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. Front. Aging Neurosci. *10*, 118.

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., et al. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature *390*, 684–687.

Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., and Kretzschmar, H.A. (1997b). Prion proteindeficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. Exp. Neurol. *146*, 104–112.

Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nat Rev Mol Cell Biol *11*, 301–307.

Büeler, 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.

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.

Butterfield, D.A., Di Domenico, F., and Barone, E. (2014). Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease *1842*, 1693–1706.

Caesar, I., Jonson, M., Nilsson, K.P.R., Thor, S., and Hammarström, P. (2012). Curcumin Promotes A-beta Fibrillation and Reduces Neurotoxicity in Transgenic Drosophila. PLOS ONE *7*, e31424.

Caetano, F.A., Beraldo, F.H., Hajj, G.N.M., Guimaraes, A.L., Jürgensen, S., Wasilewska-Sampaio, A.P., Hirata, P.H.F., Souza, I., Machado, C.F., Wong, D.Y.-L., et al. (2011). Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. Journal of Neurochemistry *117*, 538–553.

Camera, E., and Picardo, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. Journal of Chromatography B *781*, 181–206.

Carija, A., Navarro, S., de Groot, N.S., and Ventura, S. (2017). Protein aggregation into insoluble deposits protects from oxidative stress. Redox Biology *12*, 699–711.

Caruso, G., Spampinato, S.F., Cardaci, V., Caraci, F., Sortino, M.A., and Merlo, S. (2019). β-amyloid and oxidative stress: perspectives in drug development. Curr. Pharm. Des.

Case, A.J. (2017). On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. Antioxidants *6*, 82.

Cassard, H., Torres, J.-M., Lacroux, C., Douet, J.-Y., Benestad, S.L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., et al. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. Nature Communications *5*, 5821.

Castillo, C., Fernández-Mendívil, C., Buendia, I., Saavedra, P., Meza, C., Parra, N.C., Lopez, M.G., Toledo, J.R., and Fuentealba, J. (2019). Neuroprotective effects of EpoL against oxidative stress induced by soluble oligomers of Aβ peptide. Redox Biology *24*, 101187.

Castle, A.R., and Gill, A.C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. Front. Mol. Biosci. *4*.

Castro, J.P., Ott, C., Jung, T., Grune, T., and Almeida, H. (2012). Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. Free Radical Biology and Medicine *53*, 916–925.

Cathcart, R., Schwiers, E., and Ames, B.N. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. Analytical Biochemistry *134*, 111–116.

Caughey, B., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J., and Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. Journal of Virology *63*, 175–181.

Cecco, E.D., and Legname, G. (2018). The role of the prion protein in the internalization of  $\alpha$ -synuclein amyloids. Prion *12*, 23–27.

Cehlar, O., Skrabana, R., Revajova, V., and Novak, M. (2018). Structural aspects of Alzheimer's disease immunotherapy targeted against amyloid-beta peptide. Bratisl Lek Listy *119*, 201–204.

Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. Lancet *1*, 1378–1379.

Chang, J.H.T., and Prasad, K.N. (1976). Differentiation of mouse neuroblastoma cells in vitro and in vivo induced by cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Journal of Pediatric Surgery *11*, 847–858.

Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. Nat. Neurosci. *2*, 271–276.

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., and Collin, F. (2017). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. Redox Biol *14*, 450–464.

Chen, G., Xu, T., Yan, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, H.E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacologica Sinica *38*, 1205–1235.

Chen, L., Lin, Z., Zhu, Y., Lin, N., Zhang, J., Pan, X., and Chen, X. (2012). Ginsenoside Rg1 attenuates  $\beta$ -amyloid generation via suppressing PPAR $\gamma$ -regulated BACE1 activity in N2a-APP695 cells. European Journal of Pharmacology 675, 15–21.

Chen, S., Yadav, S.P., and Surewicz, W.K. (2010). Interaction between human prion protein and amyloid-beta (Abeta) oligomers: role of N-terminal residues. J. Biol. Chem. *285*, 26377–26383.

Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated Forms of the Human Prion Protein in Normal Brain and in Prion Diseases. J. Biol. Chem. *270*, 19173–19180.

Cheng, I.H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puoliväli, J., Lesné, S., Ashe, K.H., Muchowski, P.J., et al. (2007). Accelerating Amyloid-β Fibrillization Reduces Oligomer Levels and Functional Deficits in Alzheimer Disease Mouse Models. J. Biol. Chem. *282*, 23818–23828.

Chida, J., Hara, H., Yano, M., Uchiyama, K., Das, N.R., Takahashi, E., Miyata, H., Tomioka, Y., Ito, T., Kido, H., et al. (2018). Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. PLOS Pathogens *14*, e1007049.

Chimon, S., Shaibat, M.A., Jones, C.R., Calero, D.C., Aizezi, B., and Ishii, Y. (2007). Evidence of fibril-like  $\beta$ -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 1157–1164.

Christofinis, G.J., and Beale, A.J. (1968). Some biological characters of cell lines derived from normal rabbit kidney. The Journal of Pathology and Bacteriology *95*, 377–381.

Chung, E., Ji, Y., Sun, Y., Kascsak, R.J., Kascsak, R.B., Mehta, P.D., Strittmatter, S.M., and Wisniewski, T. (2010). Anti-PrPC monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an alzheimer's disease model mouse. BMC Neurosci *11*, 130.

Ciric, D., Richard, C.-A., Moudjou, M., Chapuis, J., Sibille, P., Daude, N., Westaway, D., Adrover, M., Béringue, V., Martin, D., et al. (2015). Interaction between Shadoo and PrP Affects the PrP-Folding Pathway. Journal of Virology *89*, 6287–6293.

Clarke, M.C., and Haig, D.A. (1970). Evidence for the Multiplication of Scrapie Agent in Cell Culture. Nature *225*, 100–101.

Clarke, M.C., and Millson, G.C. (1976). Infection of a cell line of mouse L fibroblasts with scrapie agent. Nature *261*, 144–145.

Clavaguera, F., Hench, J., Lavenir, I., Schweighauser, G., Frank, S., Goedert, M., and Tolnay, M. (2014). Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. Acta Neuropathol *127*, 299–301.

Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid- $\beta$  protein specifically disrupt cognitive function. Nat Neurosci *8*, 79–84.

Cline, E.N., Bicca, M.A., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2018). The Amyloid-β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. Journal of Alzheimer's Disease 1–43.

Cobb, N.J., Sönnichsen, F.D., McHaourab, H., and Surewicz, W.K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 18946–18951.

Coles, M., Bicknell, W., Watson, A.A., Fairlie, D.P., and Craik, D.J. (1998). Solution Structure of Amyloid  $\beta$ -Peptide(1–40) in a Water–Micelle Environment. Is the Membrane-Spanning Domain Where We Think It Is? Biochemistry *37*, 11064–11077.

Collinge, J., and Clarke, A.R. (2007). A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity. Science *318*, 930–936.

Collins, S.J., Tumpach, C., Groveman, B.R., Drew, S.C., and Haigh, C.L. (2018). Prion protein cleavage fragments regulate adult neural stem cell quiescence through redox modulation of mito-chondrial fission and SOD2 expression. Cell. Mol. Life Sci. *75*, 3231–3249.

Comoy, E.E., Mikol, J., Luccantoni-Freire, S., Correia, E., Lescoutra-Etchegaray, N., Durand, V., Dehen, C., Andreoletti, O., Casalone, C., Richt, J.A., et al. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. Sci Rep *5*.

Condello, C., and Stöehr, J. (2018). Aβ propagation and strains: Implications for the phenotypic diversity in Alzheimer's disease. Neurobiology of Disease *109*, 191–200.

Cooney, S.J., Bermudez-Sabogal, S.L., and Byrnes, K.R. (2013). Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isotypes after brain injury. J Neuroinflammation *10*, 917.

Corona, C., Vallino Costassa, E., Iulini, B., Caramelli, M., Bozzetta, E., Mazza, M., Desiato, R., Ru, G., and Casalone, C. (2017). Chapter Eleven - Phenotypical Variability in Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Classical and Atypical Forms. In Progress in Molecular Biology and Translational Science, G. Legname, and S. Vanni, eds. (Academic Press), pp. 241–265.

Courageot, M.-P., Daude, N., Nonno, R., Paquet, S., Di Bari, M.A., Le Dur, A., Chapuis, J., Hill, A.F., Agrimi, U., Laude, H., et al. (2008). A cell line infectible by prion strains from different species. J. Gen. Virol. *89*, 341–347.

Courte, J., Renault, R., Jan, A., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., and Villard, C. (2018). Reconstruction of directed neuronal networks in a microfluidic device with asymmetric microchannels. Methods Cell Biol *148*, 71–95.

Courte, J., Bousset, L., Boxberg, Y.V., Villard, C., Melki, R., and Peyrin, J.-M. (2020). The expression level of alpha-synuclein in different neuronal populations is the primary determinant of its prion-like seeding. Scientific Reports *10*, 4895.

Coyle, C.H., Martinez, L.J., Coleman, M.C., Spitz, D.R., Weintraub, N.L., and Kader, K.N. (2006). Mechanisms of H2O2-induced oxidative stress in endothelial cells. Free Radical Biology and Medicine *40*, 2206–2213.

Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A.M., Temussi, P.A., and Picone, D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) in an apolar microenvironment: Similarity with a virus fusion domain. European Journal of Biochemistry *269*, 5642–5648.

Cronier, S., Laude, H., and Peyrin, J.-M. (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. PNAS *101*, 12271–12276.

Cronier, S., Beringue, V., Bellon, A., Peyrin, J.-M., and Laude, H. (2007). Prion Strain- and Species-Dependent Effects of Antiprion Molecules in Primary Neuronal Cultures. Journal of Virology *81*, 13794–13800.

Cronier, S., Carimalo, J., Schaeffer, B., Jaumain, E., Béringue, V., Miquel, M.-C., Laude, H., and Peyrin, J.-M. (2012). Endogenous prion protein conversion is required for prion-induced neuritic alterations and neuronal death. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *26*, 3854–3861.

Crowther, R.A. (1991). Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 2288–2292.

Crowther, D.C., Kinghorn, K.J., Page, R., and Lomas, D.A. (2004). Therapeutic targets from a Drosophila model of Alzheimer's disease. Curr Opin Pharmacol *4*, 513–516.

Cui, Y., Wang, Y., Zhao, D., Feng, X., Zhang, L., and Liu, C. (2018). Loganin prevents BV-2 microglia cells from A $\beta$ 1-42 -induced inflammation via regulating TLR4/TRAF6/NF- $\kappa$ B axis. Cell Biol. Int. *42*, 1632–1642.

Daff, S. (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. Nitric Oxide 23, 1–11.

Dassanayake, R.P., Zhuang, D., Truscott, T.C., Madsen-Bouterse, S.A., O'Rourke, K.I., and Schneider, D.A. (2016). A transfectant RK13 cell line permissive to classical caprine scrapie prion propagation. Prion *10*, 153–164.

De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C., and De Strooper, B. (2001). Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. Hum. Mol. Genet. *10*, 1665–1671.

Deas, E., Cremades, N., Angelova, P.R., Ludtmann, M.H.R., Yao, Z., Chen, S., Horrocks, M.H., Banushi, B., Little, D., Devine, M.J., et al. (2016). Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. Antioxidants & Redox Signaling *24*, 376–391.

de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D.H., Kopeikina, K.J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K.H., Carlson, G.A., et al. (2012). Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. Neuron *73*, 685–697.

Delaère, P., He, Y., Fayet, G., Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. (1993). Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. Neurobiol. Aging *14*, 191–194.

Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., et al. (2014). β-amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. Acta Neuropathol Commun *2*.

DeMarco, M.L., and Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 2293–2298.

Deng, M., Xu, S., and Chen, F. (2014). Enhanced chemiluminescence of the luminol-hydrogen peroxide system by BSA-stabilized Au nanoclusters as a peroxidase mimic and its application. Anal. Methods 6, 3117–3123.

Desquilbet, L. (2016). Introduction aux tests statistiques multiples (Maison-Alfort: Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort).

Di Bari, M.A., Chianini, F., Vaccari, G., Esposito, E., Conte, M., Eaton, S.L., Hamilton, S., Finlayson, J., Steele, P.J., Dagleish, M.P., et al. (2008). The bank vole (Myodes glareolus) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. Journal of General Virology, *89*, 2975–2985.

Di Bari, M.A., Nonno, R., Castilla, J., D'Agostino, C., Pirisinu, L., Riccardi, G., Conte, M., Richt, J., Kunkle, R., Langeveld, J., et al. (2013). Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases. PLoS Pathog. *9*, e1003219.

Diaz-Espinoza, R., and Soto, C. (2012). High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. Nat Struct Mol Biol *19*, 370–377.

Dickinson, B.C., and Chang, C.J. (2008). A Targetable Fluorescent Probe for Imaging Hydrogen Peroxide in the Mitochondria of Living Cells. Journal of the American Chemical Society *130*, 9638–9639.

Dickinson, B.C., Huynh, C., and Chang, C.J. (2010). A Palette of Fluorescent Probes with Varying Emission Colors for Imaging Hydrogen Peroxide Signaling in Living Cells. Journal of the American Chemical Society *132*, 5906–5915.

Dickinson, B.C., Lin, V.S., and Chang, C.J. (2013). Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells. Nature Protocols *8*, 1249–1259.

Dickson, D.W., Crystal, H.A., Mattiace, L.A., Masur, D.M., Blau, A.D., Davies, P., Yen, S.H., and Aronson, M.K. (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. Neurobiol. Aging *13*, 179–189.

de Dios, C., Bartolessis, I., Roca-Agujetas, V., Barbero-Camps, E., Mari, M., Morales, A., and Colell, A. (2019). Oxidative inactivation of amyloid beta-degrading proteases by cholesterol-enhanced mitochondrial stress. Redox Biol *26*, 101283.

Dooley, C.T., Dore, T.M., Hanson, G.T., Jackson, W.C., Remington, S.J., and Tsien, R.Y. (2004). Imaging Dynamic Redox Changes in Mammalian Cells with Green Fluorescent Protein Indicators. Journal of Biological Chemistry *279*, 22284–22293.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. Progress in Neurobiology *62*, 649–671.

Duby, C., and Robin, S. (2006). Analyse en Composantes Principales (Paris - Grignon: AgroParisTech).

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., et al. (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. Nature *383*, 710–713.

Duff, K., Noble, W., Gaynor, K., and Matsuoka, Y. (2002). Organotypic slice cultures from transgenic mice as disease model systems. J Mol Neurosci *19*, 317–320.

Dufrêne, Y.F. (2002). Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. JB *184*, 5205–5213.

Duthie, S.J., and Collins, A.R. (1997). The Influence of Cell Growth, Detoxifying Enzymes and DNA Repair on Hydrogen Peroxide-Mediated DNA Damage (Measured Using the Comet Assay) in Human Cells. Free Radical Biology and Medicine *22*, 717–724.

Duyckaerts, C., Potier, M.-C., and Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. Acta Neuropathol *115*, 5–38.

van Dyck, C.H. (2018). Anti-Amyloid-β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. Biological Psychiatry *83*, 311–319.

Dysken, M.W., Sano, M., Asthana, S., Vertrees, J.E., Pallaki, M., Llorente, M., Love, S., Schellenberg, G.D., McCarten, J.R., Malphurs, J., et al. (2014). Effect of Vitamin E and Memantine on Functional Decline in Alzheimer Disease: The TEAM-AD VA Cooperative Randomized Trial. JAMA *311*, 33.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. Nat. Cell Biol. *5*, 486–488.

Edelstein-keshet, L., and Spiros, A. (2002). Exploring the Formation of Alzheimer's Disease Senile Plaques in Silico. Journal of Theoretical Biology *216*, 301–326.

Eghiaian, F., Daubenfeld, T., Quenet, Y., Audenhaege, M. van, Bouin, A.-P., Rest, G. van der, Grosclaude, J., and Rezaei, H. (2007). Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage. PNAS *104*, 7414–7419.

Eisele, Y.S., and Duyckaerts, C. (2016). Propagation of Aß pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. Acta Neuropathol *131*, 5–25.

Eisele, Y.S., Fritschi, S.K., Hamaguchi, T., Obermüller, U., Füger, P., Skodras, A., Schäfer, C., Odenthal, J., Heikenwalder, M., Staufenbiel, M., et al. (2014). Multiple Factors Contribute to the Peripheral Induction of Cerebral β-Amyloidosis. J. Neurosci. *34*, 10264–10273.

El Banna, N., Hatem, E., Heneman-Masurel, A., Léger, T., Baïlle, D., Vernis, L., Garcia, C., Martineau, S., Dupuy, C., Vagner, S., et al. (2019). Redox modifications of cysteine-containing proteins, cell cycle arrest and translation inhibition: Involvement in vitamin C-induced breast cancer cell death. Redox Biology *26*, 101290. El-Agnaf, O.M.A., Mahil, D.S., Patel, B.P., and Austen, B.M. (2000). Oligomerization and Toxicity of β-Amyloid-42 Implicated in Alzheimer's Disease. Biochemical and Biophysical Research Communications *273*, 1003–1007.

Elezgarai, S.R., and Biasini, E. (2016). Common therapeutic strategies for prion and Alzheimer's diseases. Biological Chemistry *397*, 1115–1124.

Elezgarai, S.R., Fernández-Borges, N., Eraña, H., Sevillano, A.M., Charco, J.M., Harrathi, C., Saá, P., Gil, D., Kong, Q., Requena, J.R., et al. (2017). Generation of a new infectious recombinant prion: a model to understand Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome. Scientific Reports *7*, 9584.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics *82*, 70–77.

Eraña, H., Charco, J.M., Bari, M.A.D., Díaz-Domínguez, C.M., López-Moreno, R., Vidal, E., González-Miranda, E., Pérez-Castro, M.A., García-Martínez, S., Bravo, S., et al. (2019). Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies. PLOS Pathogens *15*, e1008117.

Esposito, L., Raber, J., Kekonius, L., Yan, F., Yu, G.-Q., Bien-Ly, N., Puoliväli, J., Scearce-Levie, K., Masliah, E., and Mucke, L. (2006). Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. J. Neurosci. *26*, 5167–5179.

Etablissement français du sang (2020). Les contre-indications au don de sang - EFS | Etablissement francais du sang.

Evans, E.G.B., and Millhauser, G.L. (2017). Copper- and Zinc-Promoted Interdomain Structure in the Prion Protein: A Mechanism for Autoinhibition of the Neurotoxic N-Terminus. Prog Mol Biol Transl Sci *150*, 35–56.

Falker, C., Hartmann, A., Guett, I., Dohler, F., Altmeppen, H., Betzel, C., Schubert, R., Thurm, D., Wegwitz, F., Joshi, P., et al. (2016). Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity. Journal of Neurochemistry *137*, 88–100.

Falsig, J., and Aguzzi, A. (2008). The prion organotypic slice culture assay—POSCA. Nat Protoc *3*, 555–562.

Falsig, J., Julius, C., Margalith, I., Schwarz, P., Heppner, F.L., and Aguzzi, A. (2008). A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. Nat Neurosci *11*, 109–117.

Falsig, J., Sonati, T., Herrmann, U.S., Saban, D., Li, B., Arroyo, K., Ballmer, B., Liberski, P.P., and Aguzzi, A. (2012). Prion Pathogenesis Is Faithfully Reproduced in Cerebellar Organotypic Slice Cultures. PLoS Pathog *8*.

Fändrich, M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. Cell. Mol. Life Sci. *64*, 2066–2078.

Fernandez-Marcos, P.J., and Nóbrega-Pereira, S. (2016). NADPH: new oxygen for the ROS theory of aging. Oncotarget *7*, 50814–50815.

Ferrer, I. (2002). Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. The Cerebellum *1*, 213–222.

Fischer, S. (2017). Minibrain Storm : Cerebral Organoids Aren't Real Brains?But They Provide a Powerful Platform for Modeling Brain Diseases Like Zika Infection, Alzheimer's, and Even Autism. IEEE Pulse *8*, 31–34.

Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., and Scheres, S.H.W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. Nature *547*, 185–190.

Flohé, L., and Brand, I. (1969). Kinetics of glutathione peroxidase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology *191*, 541–549.

Fluharty, B.R., Biasini, E., Stravalaci, M., Sclip, A., Diomede, L., Balducci, C., La Vitola, P., Messa, M., Colombo, L., Forloni, G., et al. (2013). An N-terminal Fragment of the Prion Protein Binds to Amyloid-β Oligomers and Inhibits Their Neurotoxicity in Vivo. J Biol Chem *288*, 7857–7866.

Folkesson, R., Malkiewicz, K., Kloskowska, E., Nilsson, T., Popova, E., Bogdanovic, N., Ganten, U., Ganten, D., Bader, M., Winblad, B., et al. (2007). A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *358*, 777–782.

Fracassetti, D., Lawrence, N., Tredoux, A.G.J., Tirelli, A., Nieuwoudt, H.H., and Du Toit, W.J. (2011). Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. Food Chemistry *128*, 1136–1142.

France Alzheimer (2020). La maladie d'Alzheimer en chiffres.

Freeman, O.J., and Mallucci, G.R. (2016). The UPR and synaptic dysfunction in neurodegeneration. Brain Research *1648*, 530–537.

Freir, D.B., Nicoll, A.J., Klyubin, I., Panico, S., Mc Donald, J.M., Risse, E., Asante, E.A., Farrow, M.A., Sessions, R.B., Saibil, H.R., et al. (2011). Interaction between prion protein and toxic amyloid  $\beta$  assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. Nature Communications *2*, 336.

Fricker, M.D. (2016). Quantitative Redox Imaging Software. Antioxidants & Redox Signaling *24*, 752–762.

Fridovich, I. (1975). Superoxide Dismutases. Annual Review of Biochemistry 15.

Frontiñán-Rubio, J., Sancho-Bielsa, F.J., Peinado, J.R., LaFerla, F.M., Giménez-Llort, L., Durán-Prado, M., and Alcain, F.J. (2018). Sex-dependent co-occurrence of hypoxia and  $\beta$ -amyloid plaques in hippocampus and entorhinal cortex is reversed by long-term treatment with ubiquinol and ascorbic acid in the 3 × Tg-AD mouse model of Alzheimer's disease. Molecular and Cellular Neuroscience 92, 67–81.

Fu, D.-J., Li, P., Song, J., Zhang, S.-Y., and Xie, H.-Z. (2019). Mechanisms of synergistic neurotoxicity induced by two high risk pesticide residues – Chlorpyrifos and Carbofuran via oxidative stress. Toxicology in Vitro *54*, 338–344.

Fuccillo, D.A., Kurent, J.E., and Sever, J.L. (1974). Slow Virus Diseases. Annu. Rev. Microbiol. *28*, 231–264.

Fukumoto, H., Asami-Odaka, A., Suzuki, N., Shimada, H., Ihara, Y., and Iwatsubo, T. (1996). Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's

disease. Predominance of A beta 42(43) and association of A beta 40 with cored plaques. Am J Pathol *148*, 259–265.

Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1957). Degenerative Disease of the Central Nervous System in New Guinea. New England Journal of Medicine *257*, 974–978.

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., Asher, D.M., and David, E. (1968). Transmission of Experimental Kuru to the Spider Monkey (Ateles geoffreyi). Science *162*, 693–694.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., and Abedinzadeh, Z. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. L'actualité chimique 91–96.

Gary, C., Lam, S., Hérard, A.-S., Koch, J.E., Petit, F., Gipchtein, P., Sawiak, S.J., Caillierez, R., Eddarkaoui, S., Colin, M., et al. (2019). Encephalopathy induced by Alzheimer brain inoculation in a non-human primate. Acta Neuropathologica Communications *7*, 126.

Gavara, N. (2017). A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. Microsc. Res. Tech. *80*, 75–84.

Gavin, B.A., Dolph, M.J., Deleault, N.R., Geoghegan, J.C., Khurana, V., Feany, M.B., Dolph, P.J., and Supattapone, S. (2006). Accelerated Accumulation of Misfolded Prion Protein and Spongiform Degeneration in a Drosophila Model of Gerstmann–Sträussler–Scheinker Syndrome. J. Neurosci. *26*, 12408–12414.

Gavín, R., Lidón, L., Ferrer, I., and del Río, J.A. (2020). The Quest for Cellular Prion Protein Functions in the Aged and Neurodegenerating Brain. Cells 9, 591.

Geschwind, M.D., Kuo, A.L., Wong, K.S., Haman, A., Devereux, G., Raudabaugh, B.J., Johnson, D.Y., Torres-Chae, C.C., Finley, R., Garcia, P., et al. (2013). Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology *81*, 2015–2023.

Giannakopoulos, P., Silhol, S., Jallageas, V., Mallet, J., Bons, N., Bouras, C., and Delaère, P. (1997). Quantitative analysis of tau protein-immunoreactive accumulations and  $\beta$  amyloid protein deposits in the cerebral cortex of the mouse lemur, Microcebus murinus. Acta Neuropathol *94*, 131–139.

Gibbons, G.S., Lee, V.M.Y., and Trojanowski, J.Q. (2019). Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau. JAMA Neurol *76*, 101–108.

Gill, O.N., Spencer, Y., Richard-Loendt, A., Kelly, C., Dabaghian, R., Boyes, L., Linehan, J., Simmons, M., Webb, P., Bellerby, P., et al. (2013). Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. BMJ *347*.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. Biochemical and Biophysical Research Communications *122*, 1131–1135.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell *23*, 175–182.

Godyń, J., Jończyk, J., Panek, D., and Malawska, B. (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. Pharmacol Rep *68*, 127–138.

Golanska, E., Hulas-Bigoszewska, K., Rutkiewicz, E., Styczynska, M., Peplonska, B., Barcikowska, M., Bratosiewicz-Wasik, J., and Liberski, P.P. (2004). Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. Neurology *62*, 313–315.

Gomez, W., Morales, R., Maracaja-Coutinho, V., Parra, V., and Nassif, M. (2020). Down syndrome and Alzheimer's disease: common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. Aging.

Götz, J., Deters, N., Doldissen, A., Bokhari, L., Ke, Y., Wiesner, A., Schonrock, N., and Ittner, L.M. (2007). A decade of tau transgenic animal models and beyond. Brain Pathol. *17*, 91–103.

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., et al. (2000). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. Brain Res. Mol. Brain Res. *76*, 85–92.

Gregori, L., Gray, B.N., Rose, E., Spinner, D.S., Kascsak, R.J., and Rohwer, R.G. (2008). A sensitive and quantitative assay for normal PrP in plasma. Journal of Virological Methods *149*, 251–259.

Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., Ravelli, R.B.G., Tusche, M., Lopez-Iglesias, C., Hoyer, W., Heise, H., et al. (2017). Fibril structure of amyloid- $\beta$ (1–42) by cryo–electron microscopy. Science *358*, 116–119.

Grewal, S.S., York, R.D., and Stork, P.J. (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. Curr. Opin. Neurobiol. *9*, 544–553.

Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., Peyrin, J.-M., and Perrier, A.L. (2019). Propagation of α-Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. Stem Cell Reports *12*, 230–244.

Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. Nature 215, 1043–1044.

Grimm, A., Biliouris, E.E., Lang, U.E., Götz, J., Mensah-Nyagan, A.G., and Eckert, A. (2016). Sex hormone-related neurosteroids differentially rescue bioenergetic deficits induced by amyloid- $\beta$  or hyperphosphorylated tau protein. Cellular and Molecular Life Sciences *73*, 201–215.

Groveman, B.R., Walters, R., and Haigh, C.L. (2019). Using our mini-brains: cerebral organoids as an improved cellular model for human prion disease. Neural Regen Res *15*, 1019–1020.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. PNAS *83*, 4913–4917.

Grznarova, K., Levy, E., Igel-Egalon, A., Vernis, L., Torrent, J., Jas, C., Munoz-Montesino, C., Beringue, V., Deslys, J.P., Martin, D., et al. (en révision). Aß1-40 binding to Prion protein promotes PrP oligomerisation and induces structural changes of PrP globular domain.

Guillot-Sestier, M.-V., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S., and Checler, F. (2009). The  $\alpha$ -Secretase-derived N-terminal Product of Cellular Prion, N1, Displays Neuroprotective Function in Vitro and in Vivo. J Biol Chem 284, 35973–35986.

Guillot-Sestier, M.-V., Sunyach, C., Ferreira, S.T., Marzolo, M.-P., Bauer, C., Thevenet, A., and Checler, F. (2012).  $\alpha$ -secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid  $\beta(A\beta)$ -associated cell death. Journal of Biological Chemistry 287, 5021–5032.

Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., and Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of H2O2 in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. Free Radical Biology and Medicine *49*, 1298–1305.

Gursky, O., and Aleshkov, S. (2000). Temperature-dependent  $\beta$ -sheet formation in  $\beta$ -amyloid A $\beta$ 1–40 peptide in water: uncoupling  $\beta$ -structure folding from aggregation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology *1476*, 93–102.

Gutscher, M., Pauleau, A.-L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G.H., Samstag, Y., Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. Nat Methods *5*, 553–559.

Gutscher, M., Sobotta, M.C., Wabnitz, G.H., Ballikaya, S., Meyer, A.J., Samstag, Y., and Dick, T.P. (2009). Proximity-based Protein Thiol Oxidation by H2O2-scavenging Peroxidases. J. Biol. Chem. *284*, 31532–31540.

Haas, L.T., Salazar, S.V., Kostylev, M.A., Um, J.W., Kaufman, A.C., and Strittmatter, S.M. (2016). Metabotropic glutamate receptor 5 couples cellular prion protein to intracellular signalling in Alzheimer's disease. Brain *139*, 526–546.

Haber, F., and Weiss, J. (1932). Über die Katalyse des Hydroperoxydes. Naturwissenschaften *20*, 948–950.

Haga, S., Akai, K., and Ishii, T. (1989). Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. Acta Neuropathol *77*, 569–575.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., and Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. Revue Médicale de Liège 62.

Halliez, S., Passet, B., Martin-Lannerée, S., Hernandez-Rapp, J., Laude, H., Mouillet-Richard, S., Vilotte, J.-L., and Béringue, V. (2014). To develop with or without the prion protein. Front. Cell Dev. Biol. *2*.

Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br. J. Pharmacol. *142*, 231–255.

Hannaoui, S., Gougerot, A., Privat, N., Levavasseur, E., Bizat, N., Hauw, J.-J., Brandel, J.-P., and Haïk, S. (2014). Cycline Efficacy on the Propagation of Human Prions in Primary Cultured Neurons is Strain-Specific. J Infect Dis *209*, 1144–1148.

Hanson, G.T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (2004). Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. Journal of Biological Chemistry *279*, 13044–13053.

Harbi, D., and Harrison, P.M. (2014). -Classifying prion and prion-like phenomena. Prion *8*, 161–165.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. 3–5.

Harris, D.A., Falls, D.L., Johnson, F.A., and Fischbach, G.D. (1991). A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. PNAS *88*, 7664–7668.

Haute autorité de santé (2018). Guide parcours de soins des patients présentant un trouble neurocognitif associé à la maladie d'Alzheimer ou à une maladie apparentée (Haute autorité de santé).

He, F.Q., Qiu, B.Y., Li, T.K., Xie, Q., Cui, D.J., Huang, X.L., and Gan, H.T. (2011). Tetrandrine suppresses amyloid-β-induced inflammatory cytokines by inhibiting NF-κB pathway in murine BV2 microglial cells. Int. Immunopharmacol. *11*, 1220–1225.

He, H.J., Wang, X.S., Pan, R., Wang, D.L., Liu, M.N., and He, R.Q. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. BMC Cell Biology *10*, 81.

He, T., Hatem, E., Vernis, L., Lei, M., and Huang, M.-E. (2015). PRX1 knockdown potentiates vitamin K3 toxicity in cancer cells: a potential new therapeutic perspective for an old drug. J Exp Clin Cancer Res *34*.

Helal, M., Hingant, E., Pujo-Menjouet, L., and Webb, G.F. (2014). Alzheimer's disease: analysis of a mathematical model incorporating the role of prions. J. Math. Biol. *69*, 1207–1235.

Herculano-Houzel, S., Mota, B., and Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. PNAS *103*, 12138–12143.

Herzig, M.C., Van Nostrand, W.E., and Jucker, M. (2006). Mechanism of cerebral beta-amyloid angiopathy: murine and cellular models. Brain Pathol. *16*, 40–54.

Heuer, E., F. Rosen, R., Cintron, A., and C. Walker, L. (2012). Nonhuman Primate Models of Alzheimer-Like Cerebral Proteopathy. CPD *18*, 1159–1169.

Hewitt, P., and Will, R. (2019). vCJD Case Studies. In Blood Safety : A Guide to Monitoring and Responding to Potential New Threats, H. Shan, and R.Y. Dodd, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 143–155.

Hilt, S., Altman, R., Kálai, T., Maezawa, I., Gong, Q., Wachsmann-Hogiu, S., Jin, L.-W., and Voss, J. (2018). A Bifunctional Anti-Amyloid Blocks Oxidative Stress and the Accumulation of Intraneuronal Amyloid-Beta. Molecules *23*, 2010.

Hipp, M.S., Park, S.H., and Hartl, F.U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and - aggregation diseases. Trends Cell Biol *24*, 506–514.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nat. Med. *4*, 97–100.

Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. Scandinavian Journal of Statistics *6*, 65–70.

Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., Plasterk, R., et al. (2007). APL-1, a Caenorhabditis elegans protein related to the human  $\beta$ -amyloid precursor protein, is essential for viability. PNAS *104*, 1971–1976.
Hosokawa-Muto, J., Kamatari, Y.O., Nakamura, H.K., and Kuwata, K. (2009). Variety of Antiprion Compounds Discovered through an In Silico Screen Based on Cellular-Form Prion Protein Structure: Correlation between Antiprion Activity and Binding Affinity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *53*, 765–771.

Howard, R., and Liu, K.Y. (2020). Questions EMERGE as Biogen claims aducanumab turnaround. Nature Reviews Neurology *16*, 63–64.

Hu, N.-W., Corbett, G.T., Moore, S., Klyubin, I., O'Malley, T.T., Walsh, D.M., Livesey, F.J., and Rowan, M.J. (2018). Extracellular Forms of A $\beta$  and Tau from iPSC Models of Alzheimer's Disease Disrupt Synaptic Plasticity. Cell Reports *23*, 1932–1938.

Huang, B., He, D., Chen, G., Ran, X., Guo, W., Kan, X., Wang, W., Liu, D., Fu, S., and Liu, J. (2018).  $\alpha$ -Cyperone inhibits LPS-induced inflammation in BV-2 cells through activation of Akt/Nrf2/HO-1 and suppression of the NF- $\kappa$ B pathway. Food Funct *9*, 2735–2743.

Huang, X., Moir, R.D., Tanzi, R.E., Bush, A.I., and Rogers, J.T. (2004). Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. Annals of the New York Academy of Sciences *1012*, 153–163.

Huckaba, C.E., and Keyes, F.G. (1948). The Accuracy of Estimation of Hydrogen Peroxide by Potassium Permanganate Titration. J. Am. Chem. Soc. *70*, 1640–1644.

Hughes, A.J., Spelke, D.P., Xu, Z., Kang, C.-C., Schaffer, D.V., and Herr, A.E. (2014). Single-cell western blotting. Nature Methods *11*, 749–755.

Hui, L., Chen, X., and Geiger, J.D. (2012). Endolysosome involvement in LDL cholesterol-induced Alzheimer's disease-like pathology in primary cultured neurons. Life Sciences *91*, 1159–1168.

Huin, C., Cronier, S., Guégan, P., Béringue, V., Rezaei, H., and Noinville, S. (2020). Conformation-dependent membrane permeabilization by neurotoxic PrP oligomers: The role of the H2H3 oligomerization domain. Archives of Biochemistry and Biophysics *692*, 108517.

Hundt, C., Peyrin, J.-M., Haïk, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.-P., Dormont, D., Lasmézas, C.I., et al. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. The EMBO Journal *20*, 5876–5886.

Hunter, C.L., Bimonte-Nelson, H.A., Nelson, M., Eckman, C.B., and Granholm, A.-C. (2004). Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. Neurobiol. Aging *25*, 873–884.

Hunter, N., Foster, J.D., Goldmann, W., Stear, M.J., Hope, J., and Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. Archives of Virology *141*, 809–824.

Hurdis, E.C., and Romeyn, Hendrik. (1954). Accuracy of Determination of Hydrogen Peroxide by Cerate Oxidimetry. Anal. Chem. *26*, 320–325.

Igel Egalon, A. (2013). Mécanismes d'inactivation des protéines amyloïdes. PhD Thesis. Paris VII.

Igel-Egalon, A., Moudjou, M., Martin, D., Busley, A., Knäpple, T., Herzog, L., Reine, F., Lepejova, N., Richard, C.-A., Béringue, V., et al. (2017). Reversible unfolding of infectious prion assemblies reveals the existence of an oligomeric elementary brick. PLoS Pathog *13*, e1006557.

Igel-Egalon, A., Bohl, J., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Rezaei, H., and Béringue, V. (2019). Heterogeneity and Architecture of Pathological Prion Protein Assemblies: Time to Revisit the Molecular Basis of the Prion Replication Process? Viruses *11*, 429.

Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. CAR *7*, 656–664.

Irizarry, M.C., McNamara, M., Fedorchak, K., Hsiao, K., and Hyman, B.T. (1997). APPsw Transgenic Mice Develop Age-related A $\beta$  Deposits and Neuropil Abnormalities, but no Neuronal Loss in CA1. J Neuropathol Exp Neurol 56, 965–973.

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (1999). Age-Dependent Emergence and Progression of a Tauopathy in Transgenic Mice Overexpressing the Shortest Human Tau Isoform. Neuron *24*, 751–762.

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., et al. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. PNAS *94*, 10086–10091.

Jang, Y.C., Rodriguez, K., Lustgarten, M.S., Muller, F.L., Bhattacharya, A., Pierce, A., Choi, J.J., Lee, N.H., Chaudhuri, A., Richardson, A.G., et al. (2020). Superoxide-mediated oxidative stress accelerates skeletal muscle atrophy by synchronous activation of proteolytic systems. GeroScience.

Jankowsky, J.L., Younkin, L.H., Gonzales, V., Fadale, D.J., Slunt, H.H., Lester, H.A., Younkin, S.G., and Borchelt, D.R. (2007). Rodent A $\beta$  Modulates the Solubility and Distribution of Amyloid Deposits in Transgenic Mice. J. Biol. Chem. *282*, 22707–22720.

Jaumain, E., Quadrio, I., Herzog, L., Reine, F., Rezaei, H., Andréoletti, O., Laude, H., Perret-Liaudet, A., Haïk, S., and Béringue, V. (2016). Absence of Evidence for a Causal Link between Bovine Spongiform Encephalopathy Strain Variant L-BSE and Known Forms of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in Human PrP Transgenic Mice. J. Virol. *90*, 10867–10874.

Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J.D.F., Nicoll, A.J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A.S., et al. (2015). Evidence for human transmission of amyloid-β pathology and cerebral amyloid angiopathy. Nature *525*, 247–250.

Jaunmuktane, Z., Quaegebeur, A., Taipa, R., Viana-Baptista, M., Barbosa, R., Koriath, C., Sciot, R., Mead, S., and Brandner, S. (2018). Evidence of amyloid-β cerebral amyloid angiopathy transmission through neurosurgery. Acta Neuropathol *135*, 671–679.

J. Millet, L., E. Stewart, M., V. Sweedler, J., G. Nuzzo, R., and U. Gillette, M. (2007). Microfluidic devices for culturing primary mammalian neurons at low densities. Lab on a Chip *7*, 987–994.

Johnson, R.D., Schauerte, J.A., Wisser, K.C., Gafni, A., and Steel, D.G. (2011). Direct observation of single amyloid- $\beta$ (1-40) oligomers on live cells: binding and growth at physiological concentrations. PloS One *6*, e23970.

Johnson-Wood, K., Lee, M., Motter, R., Hu, K., Gordon, G., Barbour, R., Khan, K., Gordon, M., Tan, H., Games, D., et al. (1997). Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 1550–1555.

Jones, D.P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Meth. Enzymol. *348*, 93–112.

Jorda, A., Aldasoro, M., Aldasoro, C., Guerra-Ojeda, S., Iradi, A., Vila, J.M., Campos-Campos, J., and Valles, S.L. (2020). Action of low doses of Aspirin in Inflammation and Oxidative Stress induced by a $\beta_{1-42}$  on Astrocytes in primary culture. Int. J. Med. Sci. *17*, 834–843.

Kamat, P.K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C., and Tyagi, N. (2016). Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. Mol Neurobiol *53*, 648–661.

Kamceva, G., Arsova-Sarafinovska, Z., Ruskovska, T., Zdravkovska, M., Kamceva-Panova, L., and Stikova, E. (2016). Cigarette Smoking and Oxidative Stress in Patients with Coronary Artery Disease. Open Access Maced J Med Sci *4*, 636–640.

Kanaani, J., Prusiner, S.B., Diacovo, J., Baekkeskov, S., and Legname, G. (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. J. Neurochem. *95*, 1373–1386.

Kaski, D., Mead, S., Hyare, H., Cooper, S., Jampana, R., Overell, J., Knight, R., Collinge, J., and Rudge, P. (2009). Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. The Lancet *374*, 2128.

Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T.M., Milton, S.C., Hall, J.E., and Glabe, C.G. (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. J. Biol. Chem. *279*, 46363–46366.

Kazemi, S.Y., and Abedirad, S.M. (2012). Effect of Human and Bovine Serum Albumin on kinetic Chemiluminescence of Mn (III)-Tetrakis (4-Sulfonatophenyl) Porphyrin-Luminol-Hydrogen Peroxide System. The Scientific World Journal *2012*, 1–8.

Kazlauskaite, J., Young, A., Gardner, C.E., Macpherson, J.V., Vénien-Bryan, C., and Pinheiro, T.J.T. (2005). An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *328*, 292–305.

Keller, G., Binyamin, O., Frid, K., Saada, A., and Gabizon, R. (2019). Mitochondrial dysfunction in preclinical genetic prion disease: A target for preventive treatment? Neurobiology of Disease *124*, 57–66.

Kevenaar, J.T., and Hoogenraad, C.C. (2015). The axonal cytoskeleton: from organization to function. Front. Mol. Neurosci. *8*.

Khalifé, M., Young, R., Passet, B., Halliez, S., Vilotte, M., Jaffrezic, F., Marthey, S., Béringue, V., Vaiman, D., Provost, F.L., et al. (2011). Transcriptomic Analysis Brings New Insight into the Biological Role of the Prion Protein during Mouse Embryogenesis. PLOS ONE *6*, e23253.

Khan, A., Dobson, J.P., and Exley, C. (2006). Redox cycling of iron by Aβ42. Free Radical Biology and Medicine *40*, 557–569.

Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1992). Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. J. Neurochem. *59*, 750–753.

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. Nature *197*, 192–193.

Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., and Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurode-generative Diseases. Experimental Neurobiology *24*, 325.

Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, M.K., Shin, B.A., and Choi, S.Y. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. PLoS ONE *6*, 1–8.

Kim, Y., Lee, J., and Lee, C. (2008). In silico comparative analysis of DNA and amino acid sequences for prion protein gene. Transbound Emerg Dis *55*, 105–114.

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.

Kontush, A. (2001). Amyloid-β: an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. Free Radical Biology and Medicine *31*, 1120–1131.

Korovila, I., Hugo, M., Castro, J.P., Weber, D., Hohn, A., Grune, T., and Jung, T. (2017). Proteostasis, oxidative stress and aging. Redox Biol *13*, 550–567.

Kouadri, A., El Kathib, M., Cormenier, J., Chauvet, S., Zeinyeh, W., El Khoury, M., Macari, L., Richaud, P.R., Coraux, C., Michaud-Soret, I., et al. (2018). Involvement of the Prion Protein in the Protection of the Human Bronchial Epithelial Barrier against Oxidative Stress. Antioxidants & Redox Signaling.

Krailadsiri, P., Seghatchian, J., Macgregor, I., Drummond, O., Perrin, R., Spring, F., Prescott, R., Williamson, L., Prowse, C., Anstee, D., et al. (2006). The effects of leukodepletion on the generation and removal of microvesicles and prion protein in blood components. Transfusion *46*, 407–417.

Krejciova, Z., Alibhai, J., Zhao, C., Krencik, R., Rzechorzek, N.M., Ullian, E.M., Manson, J., Ironside, J.W., Head, M.W., and Chandran, S. (2017). Human stem cell–derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype–dependent manner. J Exp Med *214*, 3481–3495.

Kruskal, W.H., and Wallis, W.A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. Journal of the American Statistical Association *47*, 583–621.

Kumar, D.K.V., Choi, S.H., Washicosky, K.J., Eimer, W.A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L.E., Tanzi, R.E., et al. (2016). Amyloid-β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. Science Translational Medicine *8*, 340ra72-340ra72.

Kumar-Singh, S., Theuns, J., Broeck, B.V., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R., and Broeckhoven, C.V. (2006). Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Aβ42 and decreased Aβ40. Human Mutation *27*, 686–695.

Kuo, Y.-M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., and Roher, A.E. (1996). Water-soluble A(N-40, N-42) Oligomers in Normal and Alzheimer Disease Brains. J. Biol. Chem. *271*, 4077–4081.

La Vitola, P., Beeg, M., Balducci, C., Santamaria, G., Restelli, E., Colombo, L., Caldinelli, L., Pollegioni, L., Gobbi, M., Chiesa, R., et al. (2019). Cellular prion protein neither binds to alpha-synuclein oligomers nor mediates their detrimental effects. Brain *142*, 249–254. Ladogana, A., Liu, Q., Xi, Y.G., and Pocchiari, M. (1995). Proteinase-resistant protein in human neuroblastoma cells infected with brain material from Creutzfeldt-Jakob patient. Lancet *345*, 594–595.

LaFerla, F.M., and Green, K.N. (2012). Animal Models of Alzheimer Disease. Cold Spring Harb Perspect Med *2*, a006320.

LaFerla, F.M., Tinkle, B.T., Bieberich, C.J., Haudenschild, C.C., and Jay, G. (1995). The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. Nat. Genet. *9*, 21–30.

LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-β in Alzheimer's disease. Nature Reviews Neuroscience *8*, 499–509.

Laferrière, F., Tixador, P., Moudjou, M., Chapuis, J., Sibille, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Laude, H., Rezaei, H., et al. (2013). Quaternary structure of pathological prion protein as a determining factor of strain-specific prion replication dynamics. PLoS Pathog. *9*, e1003702.

Lal, R., Lin, H., and Quist, A.P. (2007). Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1768*, 1966–1975.

Lang, C.J.G., Heckmann, J.G., and Neundörfer, B. (1998). Creutzfeldt–Jakob disease via dural and corneal transplants. Journal of the Neurological Sciences *160*, 128–139.

Lanoiselée, H.-M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A.-C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., et al. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. PLoS Med *14*.

Larson, M., Sherman, M.A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Aguzzi, A., and Lesne, S.E. (2012). The Complex PrPc-Fyn Couples Human Oligomeric A with Pathological Tau Changes in Alzheimer's Disease. Journal of Neuroscience *32*, 16857–16871.

Lasmézas, C.I., Deslys, J.-P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J.-J. (1996). BSE transmission to macaques. Nature *381*, 743–744.

L'Assurance maladie (2019). La prise en charge de la maladie d'Alzheimer.

Lassus, B., Magnifico, S., Pignon, S., Belenguer, P., Miquel, M.-C., and Peyrin, J.-M. (2016). Alterations of mitochondrial dynamics allow retrograde propagation of locally initiated axonal insults. Scientific Reports *6*, 32777.

Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-β oligomers. Nature *457*, 1128–1132.

Lawson, V.A., Vella, L.J., Stewart, J.D., Sharples, R.A., Klemm, H., Machalek, D.M., Masters, C.L., Cappai, R., Collins, S.J., and Hill, A.F. (2008). Mouse-adapted sporadic human Creutzfeldt–Jakob disease prions propagate in cell culture. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *40*, 2793–2801.

Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: A Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software *25*, 1–18.

Le Corre, D., Ghazi, A., Balogoun, R., Pilati, C., Aparicio, T., Martin-Lannerée, S., Marisa, L., Djouadi, F., Poindessous, V., Crozet, C., et al. (2019). The cellular prion protein controls the mesenchymal-like molecular subtype and predicts disease outcome in colorectal cancer. EBioMedicine *46*, 94–104.

Lehmann, R., Lee, C.M., Shugart, E.C., Benedetti, M., Charo, R.A., Gartner, Z., Hogan, B., Knoblich, J., Nelson, C.M., and Wilson, K.M. (2019). Human organoids: a new dimension in cell biology. MBoC *30*, 1129–1137.

Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature *440*, 352–357.

Lévy, E., El Banna, N., Baïlle, D., Heneman-Masurel, A., Truchet, S., Rezaei, H., Huang, M.-E., Béringue, V., Martin, D., and Vernis, L. (2019). Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review. International Journal of Molecular Sciences *20*, 3896.

Lévy, E., Jaffrézic, F., Laloë, D., Rezaei, H., Huang, M.-E., Béringue, V., Martin, D., and Vernis, L. (2020). PiQSARS: A pipeline for quantitative and statistical analyses of ratiometric fluorescent biosensors. MethodsX *7*, 101034.

Li, A., and Harris, D.A. (2005). Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. J. Biol. Chem. *280*, 17430–17434.

Li, P., Dong, C., Lei, Y., Shan, B., Xiao, X., Jiang, H., Wang, X., Gao, C., Shi, Q., Xu, K., et al. (2009). Doppel-induced cytotoxicity in human neuronal SH-SY5Y cells is antagonized by the prion protein. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) *41*, 42–53.

Liberski, P.P., Sikorska, B., Lindenbaum, S., Goldfarb, L.G., McLean, C., Hainfellner, J.A., and Brown, P. (2012). Kuru: Genes, Cannibals and Neuropathology. J Neuropathol Exp Neurol *71*, 92–103.

Lim, Y.A., Rhein, V., Baysang, G., Meier, F., Poljak, A., Raftery, M.J., Guilhaus, M., Ittner, L.M., Eckert, A., and Gotz, J. (2010). Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. Proteomics *10*, 1621–1633.

Lippert, A.R., Van de Bittner, G.C., and Chang, C.J. (2011). Boronate Oxidation as a Bioorthogonal Reaction Approach for Studying the Chemistry of Hydrogen Peroxide in Living Systems. Accounts of Chemical Research *44*, 793–804.

Lloret, A., Fuchsberger, T., Giraldo, E., and Viña, J. (2015). Molecular mechanisms linking amyloid  $\beta$  toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. Free Radical Biology and Medicine *83*, 186–191.

Locht, C., Chesebro, B., Race, R., and Keith, J.M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. Proceedings of the National Academy of Sciences *83*, 6372–6376.

Lodovici, M., and Bigagli, E. (2011). Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. J Toxicol 2011.

Long, H., Zhong, G., Wang, C., Zhang, J., Zhang, Y., Luo, J., and Shi, S. (2019). TREM2 Attenuates Aβ1-42-Mediated Neuroinflammation in BV-2 Cells by Downregulating TLR Signaling. Neurochem. Res. *44*, 1830–1839.

Lopes, M.H., and Santos, T.G. (2012). Prion potency in stem cells biology. Prion 6, 142–146.

Lu, B., Zhao, L., and Qin, K. (2018). Copper induces structural changes in N-terminus of human prion protein. Biochemical and Biophysical Research Communications *499*, 470–474.

Lu, J.-X., Qiang, W., Yau, W.-M., Schwieters, C.D., Meredith, S.C., and Tycko, R. (2013). Molecular Structure of β-Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue. Cell *154*, 1257–1268.

Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A., and Hutchins, G.M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine *133*, 1463–1467.

Lue, L., Kuo, Y.-M., Roher, A., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, T., Rydel, R.E., and Rogers, J.T. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. Am J Pathol *155*, 853–862.

Lukyanov, K.A., and Belousov, V.V. (2014). Genetically encoded fluorescent redox sensors. Biochimica et Biophysica Acta *1840*, 745–756.

Lyublinskaya, O., and Antunes, F. (2019). Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H2O2 biosensor HyPer. Redox Biol *24*.

Ma, Y., and Ma, J. (2020). Immunotherapy against Prion Disease. Pathogens 9.

MacLea, K.S. (2017). Chapter Six - What Makes a Prion: Infectious Proteins From Animals to Yeast. In International Review of Cell and Molecular Biology, M. Sandal, ed. (Academic Press), pp. 227–276.

Maddox, R.A., Person, M.K., Blevins, J.E., Abrams, J.Y., Appleby, B.S., Schonberger, L.B., and Belay, E.D. (2020). Prion disease incidence in the United States: 2003–2015. Neurology *94*, e153–e157.

Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., and Kakizuka, A. (2004). Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. Cell Death Differ *11*, 737–746.

Maeda, H., Matsuno, H., Ushida, M., Katayama, K., Saeki, K., and Itoh, N. (2005). 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl Fluoresceins as Fluorescent Alternatives to Ellman's Reagent in Thiol-Quantification Enzyme Assays. Angewandte Chemie International Edition *44*, 2922–2925.

Majumdar, D., Gao, Y., Li, D., and Webb, D.J. (2011). Co-culture of neurons and glia in a novel microfluidic platform. Journal of Neuroscience Methods *196*, 38–44.

Makino, N., Mochizuki, Y., Bannai, S., and Sugita, Y. (1994). Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. J. Biol. Chem. *269*, 1020–1025.

Málaga-Trillo, E., Salta, E., Figueras, A., Panagiotidis, C., and Sklaviadis, T. (2011). Fish models in prion biology: underwater issues. Biochimica Et Biophysica Acta *1812*, 402–414.

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.

Manelli, A.M., Stine, W.B., Van Eldik, L.J., and LaDu, M.J. (2004). ApoE and Abeta1-42 interactions: effects of isoform and conformation on structure and function. Journal of Molecular Neuroscience : MN *23*, 235–246.

Maqsood, M.I., Matin, M.M., Bahrami, A.R., and Ghasroldasht, M.M. (2013). Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. Cell Biology International *37*, 1038–1045.

Marek, V., Mélik-Parsadaniantz, S., Villette, T., Montoya, F., Baudouin, C., Brignole-Baudouin, F., and Denoyer, A. (2018). Blue light phototoxicity toward human corneal and conjunctival epithelial cells in basal and hyperosmolar conditions. Free Radical Biology and Medicine *126*, 27–40.

Marella, M., and Chabry, J. (2004). Neurons and Astrocytes Respond to Prion Infection by Inducing Microglia Recruitment. J. Neurosci. *24*, 620–627.

Markesbery, W.R. (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. Free Radical Biology and Medicine *23*, 134–147.

Markvicheva, K.N., Bilan, D.S., Mishina, N.M., Gorokhovatsky, A.Yu., Vinokurov, L.M., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2011). A genetically encoded sensor for H2O2 with expanded dynamic range. Bioorganic & Medicinal Chemistry *19*, 1079–1084.

Martin, L.J., Sisodia, S.S., Koo, E.H., Cork, L.C., Dellovade, T.L., Weidemann, A., Beyreuther, K., Masters, C., and Price, D.L. (1991). Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. PNAS *88*, 1461–1465.

Martin-Lannerée, S., Hirsch, T.Z., Hernandez-Rapp, J., Halliez, S., Vilotte, J.-L., Launay, J.-M., and Mouillet-Richard, S. (2014). PrPC from stem cells to cancer. Front. Cell Dev. Biol. *2*.

Martin-Lannerée, S., Halliez, S., Hirsch, T.Z., Hernandez-Rapp, J., Passet, B., Tomkiewicz, C., Villa-Diaz, A., Torres, J.-M., Launay, J.-M., Béringue, V., et al. (2017). The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. STEM CELLS *35*, 754–765.

Mason, R.P., and Ganini, D. (2019). Immuno-spin trapping of macromolecules free radicals in vitro and in vivo – One stop shopping for free radical detection. Free Radical Biology and Medicine *131*, 318–331.

Mathews, J., Glasse, R., and Lindenbaum, S. (1968). KURU AND CANNIBALISM. The Lancet 292, 449–452.

Mattson, M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibril-logenic derivatives. Physiological Reviews *77*, 1081–1132.

Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. Neuron *10*, 243–254.

Mazzetti, A.P., Fiorile, M.C., Primavera, A., and Lo Bello, M. (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. Neurochemistry International *82*, 10–18.

McCarthy, R.C., Lu, D.-Y., Alkhateeb, A., Gardeck, A.M., Lee, C.-H., and Wessling-Resnick, M. (2016). Characterization of a novel adult murine immortalized microglial cell line and its activation by amyloid-beta. Journal of Neuroinflammation *13*, 21.

McDonald, A.J., and Millhauser, G.L. (2014). PrP overdrive. Prion 8, 183–191.

McDonald, A.J., Dibble, J.P., Evans, E.G.B., and Millhauser, G.L. (2014). A New Paradigm for Enzymatic Control of  $\alpha$ -Cleavage and  $\beta$ -Cleavage of the Prion Protein. J. Biol. Chem. *289*, 803–813.

McShane, R., Westby, M.J., Roberts, E., Minakaran, N., Schneider, L., Farrimond, L.E., Maayan, N., Ware, J., and Debarros, J. (2019). Memantine for dementia. Cochrane Database of Systematic Reviews.

Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L., and Weiner, R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. Neuron *5*, 1–10.

Metrick, M.A., Ferreira, N. do C., Saijo, E., Kraus, A., Newell, K., Zanusso, G., Vendruscolo, M., Ghetti, B., and Caughey, B. (2020). A single ultrasensitive assay for detection and discrimination of tau aggregates of Alzheimer and Pick diseases. Acta Neuropathol Commun *8*, 22.

Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2010). Fluorescent Protein-Based Redox Probes. Antioxidants & Redox Signaling *13*, 621–650.

Mezzaroba, L., Alfieri, D.F., Colado Simão, A.N., and Vissoci Reiche, E.M. (2019). The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. Neurotoxicology *74*, 230–241.

Michalski, R., Michalowski, B., Sikora, A., Zielonka, J., and Kalyanaraman, B. (2014). On the use of fluorescence lifetime imaging and dihydroethidium to detect superoxide in intact animals and ex vivo tissues: A reassessment. Free Radical Biology and Medicine *67*, 278–284.

Miller, E.W., Dickinson, B.C., and Chang, C.J. (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 15681–15686.

Milton, N.G.N. (1999). Amyloid-β binds catalase with high affinity and inhibits hydrogen peroxide breakdown. 4.

Milton, N.G.N. (2001). Inhibition of Catalase Activity with 3-Amino-Triazole Enhances the Cytotoxicity of the Alzheimer's Amyloid-b Peptide. 8.

Milton, N.G.N., and Harris, J.R. (2009). Polymorphism of amyloid- $\beta$  fibrils and its effects on human erythrocyte catalase binding. Micron *40*, 800–810.

Minikel Vallabh, S. (2019). Antisense oligonucleotides for the prevention of genetic prion disease. Thèse de doctorat. Harvard University.

Mishina, N.M., Markvicheva, K.N., Bilan, D.S., Matlashov, M.E., Shirmanova, M.V., Liebl, D., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2013a). Visualization of Intracellular Hydrogen Peroxide with HyPer, a Genetically Encoded Fluorescent Probe. In Methods in Enzymology, (Elsevier), pp. 45–59.

Mishina, N.M., Markvicheva, K.N., Fradkov, A.F., Zagaynova, E.V., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2013b). Imaging H2O2 Microdomains in Receptor Tyrosine Kinases Signaling. In Methods in Enzymology, (Elsevier), pp. 175–187.

Mitra, S., Prasad, P., and Chakraborty, S. (2018). A Unified View of Assessing the Pro-oxidant versus Antioxidant Nature of Amyloid Beta Conformers. ChemBioChem *19*, 2360–2371.

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., et al. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel11Edited by P. E. Wright. Journal of Molecular Biology *292*, 797–817.

Morales, R., Duran-Aniotz, C., Castilla, J., Estrada, L.D., and Soto, C. (2012). De novo induction of amyloid-β deposition in vivo. Molecular Psychiatry *17*, 1347–1353.

Moreno, J.A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J.M., Ortori, C.A., Willis, A.E., Fischer, P.M., Barrett, D.A., et al. (2013). Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. Science Translational Medicine 5, 206ra138-206ra138.

Morgan, B., Laer, K.V., Owusu, T.N.E., Ezeriņa, D., Pastor-Flores, D., Amponsah, P.S., Tursch, A., and Dick, T.P. (2016). Real-time monitoring of basal H2O2 levels with peroxiredoxin-based probes. Nat Chem Biol *12*, 437–443.

Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. Neuron *70*, 410–426.

Moser, V.A., and Pike, C.J. (2016). Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. Neuroscience and Biobehavioral Reviews *67*, 102–118.

Moudjou, M., and Ermonval, M. (2010). Le phénomène prion, différents aspects d'un nouveau concept en biologie. Virologie *14*, 255–268.

Moudjou, M., Sibille, P., Fichet, G., Reine, F., Chapuis, J., Herzog, L., Jaumain, E., Laferrière, F., Richard, C.-A., Laude, H., et al. (2013). Highly Infectious Prions Generated by a Single Round of Microplate-Based Protein Misfolding Cyclic Amplification. MBio 5.

Moudjou, M., Chapuis, J., Mekrouti, M., Reine, F., Herzog, L., Sibille, P., Laude, H., Vilette, D., Andréoletti, O., Rezaei, H., et al. (2016). Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification. Sci Rep *6*, 1–12.

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.

Munoz-Montesino, C., Sizun, C., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Chapuis, J., Ciric, D., Igel-Egalon, A., Laude, H., Béringue, V., et al. (2016). Generating Bona Fide Mammalian Prions with Internal Deletions. Journal of Virology *90*, 6963–6975.

Mutterer, J., and Zinck, E. (2013). Quick-and-clean article figures with FigureJ. Journal of Microscopy *252*, 89–91.

Mysterud, A., and Edmunds, D.R. (2019). A review of chronic wasting disease in North America with implications for Europe. Eur J Wildl Res *65*, 26.

Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. Anal. Biochem. *177*, 244–249.

Nassor, F., Jarray, R., Biard, D.S.F., Maïza, A., Papy-Garcia, D., Pavoni, S., Deslys, J.-P., and Yates, F. (2020). Long Term Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a Neurodegenerative Disease. Front. Cell. Neurosci. *14*.

Nicoll, A.J., Panico, S., Freir, D.B., Wright, D., Terry, C., Risse, E., Herron, C.E., O'Malley, T., Wadsworth, J.D.F., Farrow, M.A., et al. (2013). Amyloid- $\beta$  nanotubes are associated with prion protein-dependent synaptotoxicity. Nature Communications *4*.

Nicoll, J.A.R., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-β peptide: a case report. Nat Med *9*, 448–452.

Nieznanski, K., Surewicz, K., Chen, S., Nieznanska, H., and Surewicz, W.K. (2014). Interaction between prion protein and Aβ amyloid fibrils revisited. ACS Chemical Neuroscience *5*, 340–345.

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. Journal of Virology *74*, 320–325.

Nonno, R., Bari, M.A.D., Cardone, F., Vaccari, G., Fazzi, P., Dell'Omo, G., Cartoni, C., Ingrosso, L., Boyle, A., Galeno, R., et al. (2006). Efficient Transmission and Characterization of Creutzfeldt–Jakob Disease Strains in Bank Voles. PLOS Pathogens *2*, e12.

Noraberg, J., Poulsen, F., Blaabjerg, M., Kristensen, B., Bonde, C., Montero, M., Meyer, M., Gramsbergen, J., and Zimmer, J. (2005). Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage, Neuroprotection and Neurorepair. CDTCNSND *4*, 435–452.

Novitskaya, V., Bocharova, O.V., Bronstein, I., and Baskakov, I.V. (2006). Amyloid Fibrils of Mammalian Prion Protein Are Highly Toxic to Cultured Cells and Primary Neurons. J. Biol. Chem. *281*, 13828–13836.

O'Carroll, A., Coyle, J., and Gambin, Y. (2020). Prions and Prion-like assemblies in neurodegeneration and immunity: The emergence of universal mechanisms across health and disease. Seminars in Cell & Developmental Biology *99*, 115–130.

Ochs, K., and Málaga-Trillo, E. (2014). Common themes in PrP signaling: the Src remains the same. Frontiers in Cell and Developmental Biology *2*, 63.

Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., and Hood, L.E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell *40*, 735–746.

Olsson, T.T., Klementieva, O., and Gouras, G.K. (2018). Prion-like seeding and nucleation of intracellular amyloid-β. Neurobiology of Disease *113*, 1–10.

Onodera, T. (2017). Dual role of cellular prion protein in normal host and Alzheimer's disease. Proceedings of the Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences *93*, 155–173.

Organisation mondiale de la santé animale (2016). Situation de l'ESB dans le monde et taux d'incidence annuel: OIE - World Organisation for Animal Health.

Østergaard, H., Henriksen, A., Hansen, F.G., and Winther, J.R. (2001). Shedding light on disulfide bond formation: Engineering a redox switch in green fluorescent protein. EMBO Journal *20*, 5853–5862.

Østergaard, H., Tachibana, C., and Winther, J.R. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. J Cell Biol *166*, 337–345.

Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., Dias, I.H.K., Debelec, B., Vucetic, M., Fladmark, K.E., Basaga, H., Ribaric, S., Milisav, I., and Cuadrado, A. (2015). Redox control of protein degradation. Redox Biology *6*, 409–420.

Pamplona, R., Naudí, A., Gavín, R., Pastrana, M.A., Sajnani, G., Ilieva, E.V., del Río, J.A., Portero-Otín, M., Ferrer, I., and Requena, J.R. (2008). Increased oxidation, glycoxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease. Free Radical Biology and Medicine *45*, 1159–1166.

Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., and Cohen, F.E. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. PNAS *90*, 10962–10966.

Paquet, S., Langevin, C., Chapuis, J., Jackson, G.S., Laude, H., and Vilette, D. (2007). Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. Journal of General Virology, *88*, 706–713.

Pattison, I.H. (1965). Resistance of the scrapie agent to formalin. Journal of Comparative Pathology *75*, 159–164.

Pattison, I.H., and Jones, K.M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. Vet. Rec. *80*, 2–9.

Pavoni, S., Jarray, R., Nassor, F., Guyot, A.-C., Cottin, S., Rontard, J., Mikol, J., Mabondzo, A., Deslys, J.-P., and Yates, F. (2018). Small-molecule induction of A $\beta$ -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. PLOS ONE *13*, e0209150.

Peckeu, L., Brandel, J.-P., Welaratne, A., Costagliola, D., and Haïk, S. (2018). Susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment in France. Neurology *91*, e724–e731.

Peden, A.H., Head, M.W., Ritchie, D.L., Bell, J.E., and Ironside, J.W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *364*, 3.

Pedersen, J.T., and Sigurdsson, E.M. (2015). Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. Trends Mol Med *21*, 394–402.

Pei, Y., Peng, J., Behl, M., Sipes, N.S., Shockley, K.R., Rao, M.S., Tice, R.R., and Zeng, X. (2016). Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. Brain Research *1638*, 57–73.

Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F., and Serafini, M. (2012). Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets *12*, 351–360.

Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. Lab Chip *11*, 3663–3673.

Pham, K., Pal, R., Qu, Y., Liu, X., Yu, H., Shiao, S.L., Wang, X., O'Brian Smith, E., Cui, X., Rodney, G.G., et al. (2015). Nuclear glutaredoxin 3 is critical for protection against oxidative stress-induced cell death. Free Radical Biology and Medicine *85*, 197–206. Pietri, M., Dakowski, C., Hannaoui, S., Alleaume-Butaux, A., Hernandez-Rapp, J., Ragagnin, A., Mouillet-Richard, S., Haik, S., Bailly, Y., Peyrin, J.-M., et al. (2013). PDK1 decreases TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. Nature Medicine *19*, 1124–1131.

Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A.R., and Harford, J.A. (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. Analytical Biochemistry 593, 113608.

Pou, S., Hassett, D.J., Britigan, B.E., Cohen, M.S., and Rosen, G.M. (1989). Problems associated with spin trapping oxygen-centered free radicals in biological systems. Analytical Biochemistry *177*, 1–6.

Premzl, M., Sangiorgio, L., Strumbo, B., Marshall Graves, J.A., Simonic, T., and Gready, J.E. (2003). Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. Gene *314*, 89–102.

Prescott, M.J. (2010). Ethics of primate use. Adv. Sci. Res. 5, 11–22.

Price, D.L., Martin, L.J., Sisodia, S.S., Wagster, M.V., Koo, E.H., Walker, L.C., Koliatsos, V.E., and Cork, L.C. (1991). Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegene-rative disease. Brain Pathol. *1*, 287–296.

Priola, S.A. (2018). Chapter 3 - Cell biology of prion infection. In Handbook of Clinical Neurology, M. Pocchiari, and J. Manson, eds. (Elsevier), pp. 45–68.

Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science *216*, 136–144.

Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.-M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.-L., Serban, D., Carlson, G.A., et al. (1990). Transgenetic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. Cell *63*, 673–686.

Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S.L., and DeArmond, S.J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *90*, 10608–10612.

Puig, B., Yang, D., Brenna, S., Altmeppen, H.C., and Magnus, T. (2020). Show Me Your Friends and I Tell You Who You Are: The Many Facets of Prion Protein in Stroke. Cells *9*, 1609.

Puliafito, A., Hufnagel, L., Neveu, P., Streichan, S., Sigal, A., Fygenson, D.K., and Shraiman, B.I. (2012). Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. PNAS *109*, 739–744.

Purro, S.A., Farrow, M.A., Linehan, J., Nazari, T., Thomas, D.X., Chen, Z., Mengel, D., Saito, T., Saido, T., Rudge, P., et al. (2018a). Transmission of amyloid- $\beta$  protein pathology from cadaveric pituitary growth hormone. Nature 564, 415–419.

Purro, S.A., Nicoll, A.J., and Collinge, J. (2018b). Prion Protein as a Toxic Acceptor of Amyloid-β Oligomers. Biological Psychiatry *83*, 358–368.

Qiang, W., Yau, W.-M., Luo, Y., Mattson, M.P., and Tycko, R. (2012). Antiparallel β-sheet architecture in Iowa-mutant β-amyloid fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 4443–4448.

Race, R.E., Fadness, L.H., and Chesebro, B. (1987). Characterization of Scrapie Infection in Mouse Neuroblastoma Cells. Journal of General Virology, *68*, 1391–1399.

Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P., Arlotto, M., Riondel, J., Laude, H., Lehmann, S., and Favier, A. (2003). Expression of Prion Protein Increases Cellular Copper Binding and Antioxidant Enzyme Activities but Not Copper Delivery. J. Biol. Chem. *278*, 9064–9072.

Rasmussen, J., Jucker, M., and Walker, L.C. (2017). Aβ seeds and prions: How close the fit? Prion *11*, 215–225.

Raymond, G.J., Zhao, H.T., Race, B., Raymond, L.D., Williams, K., Swayze, E.E., Graffam, S., Le, J., Caron, T., Stathopoulos, J., et al. (2019). Antisense oligonucleotides extend survival of prioninfected mice. JCI Insight *4*, e131175.

Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. Nat Genet *11*, 177–184.

Regmi, S.C., Park, S.-Y., Ku, S.K., and Kim, J.-A. (2014). Serotonin regulates innate immune responses of colon epithelial cells through Nox2-derived reactive oxygen species. Free Radical Biology and Medicine *69*, 377–389.

Reidenbach, A.G., Minikel, E.V., Zhao, H.T., Guzman, S.G., Leed, A.J., Mesleh, M.F., Kordasiewicz, H.B., Schreiber, S.L., and Vallabh, S.M. (2020). Characterization of the Prion Protein Binding Properties of Antisense Oligonucleotides. Biomolecules *10*, 1.

Reimann, R.R., and Aguzzi, A. (2018). Intrinsic toxicity of antibodies to the globular domain of the prion protein. Biological Psychiatry.

Renault, R., Durand, J.-B., Viovy, J.-L., and Villard, C. (2016). Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. Lab Chip *16*, 2188–2191.

Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertle, T., and Grosclaude, J. (2005). Sequential Generation of Two Structurally Distinct Ovine Prion Protein Soluble Oligomers Displaying Different Biochemical Reactivities. Journal of Molecular Biology *347*, 665–679.

Ricciarelli, R., and Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. Current Neuropharmacology *15*, 926–935.

Ridley, R.M., Baker, H.F., Windle, C.P., and Cummings, R.M. (2005). Very long term studies of the seeding of  $\beta$ -amyloidosis in primates. J Neural Transm *113*, 1243.

Riedel, B.C., Thompson, P.M., and Brinton, R.D. (2016). Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology *160*, 134–147.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). Nature *382*, 180–182.

Riemenschneider, M., Klopp, N., Xiang, W., Wagenpfeil, S., Vollmert, C., Muller, U., Forstl, H., Illig, T., Kretzschmar, H., and Kurz, A. (2004). Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. Neurology 63, 364–366.

Riener, C.K., Kada, G., and Gruber, H.J. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. Anal Bioanal Chem *373*, 266–276.

Rienstra, C.M. (2013). Amyloid structures from alzheimer's disease patients. Structure *21*, 1722–1723.

Rodrigues, R., Petersen, R.B., and Perry, G. (2014). Parallels between major depressive disorder and Alzheimer's disease: role of oxidative stress and genetic vulnerability. Cellular and Molecular Neurobiology *34*, 925–949.

Rosen, R.F., Tomidokoro, Y., Farberg, A.S., Dooyema, J., Ciliax, B., Preuss, T.M., Neubert, T.A., Ghiso, J.A., LeVine, H., and Walker, L.C. (2016). Comparative pathobiology of  $\beta$ -amyloid and the unique susceptibility of humans to Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 44, 185–196.

Roucou, X. (2014). Regulation of PrPC signaling and processing by dimerization. Front Cell Dev Biol *2*.

Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A. (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. Cell Death Differ. *12*, 783–795.

Rubenstein, R., Chang, B., Grinkina, N., Drummond, E., Davies, P., Ruditzky, M., Sharma, D., Wang, K., and Wisniewski, T. (2017). Tau phosphorylation induced by severe closed head traumatic brain injury is linked to the cellular prion protein. Acta Neuropathol Commun *5*, 30.

Ruch, W., Cooper, P.H., and Baggiolini, M. (1983). Assay of H2O2 production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. J. Immunol. Methods *63*, 347–357.

Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., and Eliceiri, K.W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. BMC Bioinformatics *18*, 529.

Sakaguchi, S., and Chida, J. (2020). Prion Protein is a Novel Modulator of Influenza: Potential Implications for Anti-Influenza Therapeutics. Current Issues in Molecular Biology 21–32.

Sakudo, A., Onodera, T., and Ikuta, K. (2007). Prion Protein Gene-Deficient Cell Lines: Powerful Tools for Prion Biology. Microbiology and Immunology *51*, 1–13.

Salazar, S.V., and Strittmatter, S.M. (2017). Cellular prion protein as a receptor for amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease. Biochemical and Biophysical Research Communications *483*, 1143–1147.

Sandoe, J., and Eggan, K. (2013). Opportunities and challenges of pluripotent stem cell neurode-generative disease models. Nat Neurosci *16*, 780–789.

Santos, A.L., Sinha, S., and Lindner, A.B. (2018). The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms (Hindawi).

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. J. Cell Biol. *169*, 341–354.

Sardar Sinha, M., Ansell-Schultz, A., Civitelli, L., Hildesjö, C., Larsson, M., Lannfelt, L., Ingelsson, M., and Hallbeck, M. (2018). Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. Acta Neuropathol *136*, 41–56.

Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., Hardy, J., Vassar, R., Winblad, B., and Saido, T.C. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. The EMBO Journal *36*, 2473–2487.

Saunders, G.C., Cawthraw, S., Mountjoy, S.J., Hope, J., and Windl, O. (2006). PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. Journal of General Virology, *87*, 3141–3149.

Sawamura, N., Morishima-Kawashima, M., Waki, H., Kobayashi, K., Kuramochi, T., Frosch, M.P., Ding, K., Ito, M., Kim, T.W., Tanzi, R.E., et al. (2000). Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. J. Biol. Chem. *275*, 27901–27908.

Schätzl, 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.

Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., and Van der Flier, W.M. (2016). Alzheimer's disease. The Lancet *388*, 505–517.

Scherer, C., Cristofanon, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2008). Homogenous luminescence-based assay for quantifying the glutathione content in mammalian cells. Cell Notes 7.

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., et al. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. J. Mol. Biol. *314*, 1209–1225.

Schneider, L. (2020). A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. The Lancet Neurology *19*, 111–112.

Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., and Kellermann, O. (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 13326–13331.

Schneider, B., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., and Kellermann, O. (2004). Contrôler l'équilibre redox cellulaire: Une fonction ubiquitaire pour la protéine prion cellulaire? Medecine/Sciences *20*, 21–23.

Scott, B. (2015). Conservation of fungal and animal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complexes. Molecular Microbiology *95*, 910–913.

Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Wälchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., et al. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. Cell *59*, 847–857.

Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S.L., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. Cell *73*, 979–988.

Scott-McKean, J.J., Surewicz, K., Choi, J.-K., Ruffin, V.A., Salameh, A.I., Nieznanski, K., Costa, A.C.S., and Surewicz, W.K. (2016). Soluble prion protein and its N-terminal fragment prevent impairment of synaptic plasticity by Aβ oligomers: Implications for novel therapeutic strategy in Alzheimer's disease. Neurobiology of Disease *91*, 124–131. Seki, T., Kanagawa, M., Kobayashi, K., Kowa, H., Yahata, N., Maruyama, K., Iwata, N., Inoue, H., and Toda, T. (2020). Galectin 3–binding protein suppresses amyloid- $\beta$  production by modulating  $\beta$ -cleavage of amyloid precursor protein. J Biol Chem 295, 3678–3691.

Sengupta, U., Nilson, A.N., and Kayed, R. (2016). The Role of Amyloid-β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. EBioMedicine *6*, 42–49.

Shaik, J.B., Palaka, B.K., Penumala, M., Kotapati, K.V., Devineni, S.R., Eadlapalli, S., Darla, M.M., Ampasala, D.R., Vadde, R., and Amooru, G.D. (2016). Synthesis, pharmacological assessment, molecular modeling and in silico studies of fused tricyclic coumarin derivatives as a new family of multifunctional anti-Alzheimer agents. European Journal of Medicinal Chemistry *107*, 219–232.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat. Med. *14*, 837–842.

Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. Mol Med Rep *20*, 1479–1487.

Shoffner, J.M., Watts, R.L., Juncos, J.L., Torroni, A., and Wallace, D.C. (1991). Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in parkinson's disease. Annals of Neurology *30*, 332–339.

Sideri, T.C., Stojanovski, K., Tuite, M.F., and Grant, C.M. (2010). Ribosome-associated peroxiredoxins suppress oxidative stress-induced de novo formation of the [PSI+] prion in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 6394–6399.

Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biology *11*, 613–619.

Silva, G.M., Netto, L.E., Discola, K.F., Piassa-Filho, G.M., Pimenta, D.C., Barcena, J.A., and Demasi, M. (2008). Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. FEBS J *275*, 2942–2955.

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.

Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., et al. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. Biomolecules *6*, 6.

Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.-G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., et al. (2007). In Vitro and In Vivo Neurotoxicity of Prion Protein Oligomers. PLoS Pathog *3*, e125.

Singh, A., Haldar, S., Horback, K., Tom, C., Zhou, L., Meyerson, H., and Singh, N. (2013). Prion Protein Regulates Iron Transport by Functioning as a Ferrireductase. J Alzheimers Dis *35*, 541–552.

Singh, N., Singh, A., Das, D., and Mohan, M.L. (2010). Redox control of prion and disease pathogenesis. Antioxidants & Redox Signaling *12*, 1271–1294.

Smirnovas, V., Baron, G.S., Offerdahl, D.K., Raymond, G.J., Caughey, B., and Surewicz, W.K. (2011). Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deute-rium exchange. Nat. Struct. Mol. Biol. *18*, 504–506.

Smith, L.M., and Strittmatter, S.M. (2017). Binding sites for amyloid-β oligomers and synaptic toxicity. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine *7*.

Société canadienne du sang (2020). Voyages | Canadian Blood Services.

Solassol, J., Crozet, C., and Lehmann, S. (2003). Prion propagation in cultured cells. Br. Med. Bull. *66*, 87–97.

Sonati, T., Reimann, R.R., Falsig, J., Baral, P.K., O'Connor, T., Hornemann, S., Yaganoglu, S., Li, B., Herrmann, U.S., Wieland, B., et al. (2013). The toxicity of antiprion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. Nature *501*, 102–106.

Sorce, S., Nuvolone, M., Keller, A., Falsig, J., Varol, A., Schwarz, P., Bieri, M., Budka, H., and Aguzzi, A. (2014). The role of the NADPH oxidase NOX2 in prion pathogenesis. PLoS Pathogens *10*, e1004531.

Speck-Planche, A., V. Kleandrova, V., Luan, F., and Natalia D. S. Cordeiro, M. (2013). Multi-Target Inhibitors for Proteins Associated with Alzheimer: In Silico Discovery using Fragment-Based Descriptors (Bentham Science Publishers).

Squellerio, I., Caruso, D., Porro, B., Veglia, F., Tremoli, E., and Cavalca, V. (2012). Direct glutathione quantification in human blood by LC–MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis *71*, 111–118.

Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell *51*, 229–240.

Stamler, J., and Hausladen, A. (1998). Oxidative modifications in nitrosative stress. Nat Struct Biol 5, 247–249.

Stańczak, P., and Kozlowski, H. (2007). Can chicken and human PrPs possess SOD-like activity after beta-cleavage? Biochem. Biophys. Res. Commun. *352*, 198–202.

Stein, F., Kress, M., Reither, S., Piljić, A., and Schultz, C. (2013). FluoQ: A Tool for Rapid Analysis of Multiparameter Fluorescence Imaging Data Applied to Oscillatory Events. ACS Chem. Biol. *8*, 1862–1868.

Stöhr, J., Watts, J.C., Mensinger, Z.L., Oehler, A., Grillo, S.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Giles, K. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (Aβ) prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 11025–11030.

Surguchev, A.A., Emamzadeh, F.N., and Surguchov, A. (2019). Cell Responses to Extracellular  $\alpha$ -Synuclein. Molecules 24, 305.

Swomley, A.M., and Butterfield, D.A. (2015). Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics. Archives of Toxicology *89*, 1669–1680. Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M.A., German, M.J., Fullwood, N.J., and Allsop, D. (2005). Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Biochemical Society Transactions *33*, 5.

Takada, L., and Geschwind, M. (2013). Prion Diseases. Semin Neurol 33, 348–356.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell *126*, 663–676.

Tanase, M., Urbanska, A.M., Zolla, V., Clement, C.C., Huang, L., Morozova, K., Follo, C., Goldberg, M., Roda, B., Reschiglian, P., et al. (2016). Role of Carbonyl Modifications on Aging-Associated Protein Aggregation. Sci Rep *6*, 19311.

Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell *83*, 79–90.

Thackray, A.M., Andréoletti, O., and Bujdoso, R. (2018). Mammalian prion propagation in PrP transgenic Drosophila. Brain *141*, 2700–2710.

Thal, D.R., Larionov, S., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Van Dooren, T., Yamaguchi, H., Haass, C., Van Leuven, F., Staufenbiel, M., and Capetillo-Zarate, E. (2007). Occurrence and co-localization of amyloid beta-protein and apolipoprotein E in perivascular drainage channels of wild-type and APP-transgenic mice. Neurobiol. Aging *28*, 1221–1230.

Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. J Biol Chem *283*, 29615–29619.

Thinakaran, G., Teplow, D.B., Siman, R., Greenberg, B., and Sisodia, S.S. (1996). Metabolism of the Swedish Amyloid Precursor Protein Variant in Neuro2a (N2a) Cells EVIDENCE THAT CLEA-VAGE AT THE "β-SECRETASE" SITE OCCURS IN THE GOLGI APPARATUS. J. Biol. Chem. *271*, 9390–9397.

Tian, Y., Meng, L., and Zhang, Z. (2019). What is strain in neurodegenerative diseases? Cell. Mol. Life Sci.

Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Dur, A.L., Laude, H., and Béringue, V. (2010). The Physical Relationship between Infectivity and Prion Protein Aggregates Is Strain-Dependent. PLOS Pathogens *6*, e1000859.

Tolar, M., Abushakra, S., and Sabbagh, M. (2019). The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis. Alzheimer's & Dementia.

Tortereau, F. (2013). Conséquences de la sélection pour la résistance à la tremblante sur la diversité génétique du génome ovin. (Paris).

Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2014). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. Brain Research Bulletin 1–10.

Turk, E., Teplow, D.B., Hood, L.E., and Prusiner, S.B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. European Journal of Biochemistry *176*, 21–30.

Um, J.W., and Strittmatter, S.M. (2013). Amyloid-β induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease. Prion *7*, 37–41.

Um, J.W., Nygaard, H.B., Heiss, J.K., Kostylev, M.A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E.C., and Strittmatter, S.M. (2012). Alzheimer amyloid-β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. Nat. Neurosci. *15*, 1227–1235.

Um, J.W., Kaufman, A.C., Kostylev, M., Heiss, J.K., Stagi, M., Takahashi, H., Kerrisk, M.E., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Koleske, A.J., et al. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer aβ oligomer bound to cellular prion protein. Neuron *79*, 887–902.

Urrea, L., Ferrer, I., Gavín, R., and Río, J.A. del (2017). The cellular prion protein (PrPC) as neuronal receptor for α-synuclein. Prion *11*, 226–233.

Urwin, P.J.M., Mackenzie, J.M., Llewelyn, C.A., Will, R.G., and Hewitt, P.E. (2016). Creutzfeldt–Jakob disease and blood transfusion: updated results of the UK Transfusion Medicine Epidemiology Review Study. Vox Sanguinis *110*, 310–316.

Varges, D., Manthey, H., Heinemann, U., Ponto, C., Schmitz, M., Schulz-Schaeffer, W.J., Krasnianski, A., Breithaupt, M., Fincke, F., Kramer, K., et al. (2017). Doxycycline in early CJD: a double-blinded randomised phase II and observational study. J Neurol Neurosurg Psychiatry *88*, 119–125.

Vassallo, N., and Herms, J.W. (2003). Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. Journal of Neurochemistry *86*, 538–544.

Vassar, R. (2004). BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. J. Mol. Neurosci. *23*, 105–114.

Vázquez-Fernández, E., Vos, M.R., Afanasyev, P., Cebey, L., Sevillano, A.M., Vidal, E., Rosa, I., Renault, L., Ramos, A., Peters, P.J., et al. (2016). The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. PLOS Pathogens *12*, e1005835.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 2042–2047.

Vilette, D. (2008). Cell models of prion infection. Veterinary Research 39, 1–18.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 4055–4059.

Vilette, D., Courte, J., Peyrin, J.M., Coudert, L., Schaeffer, L., Andréoletti, O., and Leblanc, P. (2018). Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions. Cell. Mol. Life Sci. *75*, 2557–2574.

Vilotte, J.-L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M.-G., Vaiman, D., Lepourry, L., Silva, J.C.D., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., et al. (2001). Markedly Increased Susceptibility to Natural Sheep Scrapie of Transgenic Mice Expressing Ovine PrP. Journal of Virology *75*, 5977–5984.

Wadsworth, J.D.F., and Collinge, J. (2007). Update on human prion disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease *1772*, 598–609.

Waggoner, D.J., Bartnikas, T.B., and Gitlin, J.D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. Neurobiol. Dis. *6*, 221–230.

Walker, L.C. (2016). Proteopathic Strains and the Heterogeneity of Neurodegenerative Diseases. Annual Review of Genetics *50*, 329–346.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature *416*, 535–539.

Walsh, K.P., Minamide, L.S., Kane, S.J., Shaw, A.E., Brown, D.R., Pulford, B., Zabel, M.D., Lambeth, J.D., Kuhn, T.B., and Bamburg, J.R. (2014). Amyloid-β and Proinflammatory Cytokines Utilize a Prion Protein-Dependent Pathway to Activate NADPH Oxidase and Induce Cofilin-Actin Rods in Hippocampal Neurons. PLOS ONE *9*, e95995.

Walter, E.D., Chattopadhyay, M., and Millhauser, G.L. (2006). The affinity of copper binding to the prion protein octarepeat domain: evidence for negative cooperativity. Biochemistry *45*, 13083–13092.

Wang, H., and Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader11Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable. Free Radical Biology and Medicine *27*, 612–616.

Wang, Y., and Wu, C. (2017). Quantitative Study of the Oligomerization of Yeast Prion Sup35NM Proteins. Biochemistry *56*, 6575–6584.

Wang, H., Schoebel, S., Schmitz, F., Dong, H., and Hedfalk, K. (2020a). Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes *1862*, 183065.

Wang, L.-Q., Zhao, K., Yuan, H.-Y., Wang, Q., Guan, Z., Tao, J., Li, X.-N., Sun, Y., Yi, C.-W., Chen, J., et al. (2020b). Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. Nat Struct Mol Biol *27*, 598–602.

Wang, S., Konorev, E.A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., and Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms: INTERMEDIACY OF H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - AND p53-DEPENDENT PATHWAYS. J. Biol. Chem. *279*, 25535–25543.

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. J Cell Biol *217*, 1915–1928.

Wang, Z.-F., Yin, J., Zhang, Y., Zhu, L.-Q., Tian, Q., Wang, X.-C., Li, H.-L., and Wang, J.-Z. (2010). Overexpression of Tau Proteins Antagonizes Amyloid-β-Potentiated Apoptosis Through Mitochondria-Caspase-3 Pathway in N2a Cells. Journal of Alzheimer's Disease *20*, 145–157.

Warm, E., and Laties, G.G. (1982). Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. Phytochemistry *21*, 827–831.

Watanabe-Nakayama, T., Ono, K., Itami, M., Takahashi, R., Teplow, D.B., and Yamada, M. (2016). High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid  $\beta$ 1-42 aggregates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *113*, 201524807.

Watt, N.T., Taylor, D.R., Gillott, A., Thomas, D.A., Perera, W.S.S., and Hooper, N.M. (2005). Reactive Oxygen Species-mediated  $\beta$ -Cleavage of the Prion Protein in the Cellular Response to Oxidative Stress. J. Biol. Chem. *280*, 35914–35921.

Watt, N.T., Routledge, M.N., Wild, C.P., and Hooper, N.M. (2007). Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage. Free Radical Biology and Medicine *43*, 959–967.

Watts, J.C., Condello, C., Stöhr, J., Oehler, A., Lee, J., DeArmond, S.J., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Giles, K., and Prusiner, S.B. (2014a). Serial propagation of distinct strains of Aβ prions from Alzheimer's disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 10323–10328.

Watts, J.C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2014b). Evidence That Bank Vole PrP Is a Universal Acceptor for Prions. PLOS Pathogens *10*, e1003990.

Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bähr, M., and Zerr, I. (2004). Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. Neuroscience Letters *372*, 146–150.

Weissmann, C., and Büeler, H. (2004). A mouse to remember. Cell 116, S111–S115.

Westaway, D., Daude, N., Wohlgemuth, S., and Harrison, P. (2011). The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. Top Curr Chem *305*, 225–256.

Westergard, L., Christensen, H.M., and Harris, D.A. (2007). The Cellular Prion Protein (PrPc) : Its Physiological Function and Role in Disease. Biochimica et Biophysica Acta *1772*, 629–644.

Westermark, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S., Frangione, B., Ikeda, S.-I., Masters, C.L., Merlini, G., Saraiva, M.J., and Sipe, J.D. (2005). Amyloid: Toward terminology clarification Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Amyloid *12*, 1–4.

Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. Biometrics Bulletin 1, 80–83.

Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Estibeiro, K., Cousens, S.N., Smith, P.G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., and Hofman, A. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. The Lancet *347*, 921–925.

Wille, H., and Requena, J.R. (2018). The Structure of PrPSc Prions. Pathogens 7, 20.

Williams, E.S., and Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. Journal of Wildlife Diseases *16*, 89–98.

Woerman, A.L., Aoyagi, A., Patel, S., Kazmi, S.A., Lobach, I., Grinberg, L.T., McKee, A.C., Seeley, W.W., Olson, S.H., and Prusiner, S.B. (2016). Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *113*, E8187–E8196.

Wolschner, C., Giese, A., Kretzschmar, H.A., Huber, R., Moroder, L., and Budisa, N. (2009). Design of anti- and pro-aggregation variants to assess the effects of methionine oxidation in human prion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 7756–7761.

Wong, B.S., Liu, T., Li, R., Pan, T., Petersen, R.B., Smith, M.A., Gambetti, P., Perry, G., Manson, J.C., Brown, D.R., et al. (2001). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. J. Neurochem. *76*, 565–572.

Woolhouse, M.E.J., Coen, P., Matthews, L., Foster, J.D., Elsen, J.-M., Lewis, R.M., Haydon, D.T., and Hunter, N. (2001). A centuries-long epidemic of scrapie in British sheep? Trends in Microbiology *9*, 67–70.

Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T., and Schätzl, H.M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein 11Edited by A. R. Fersht. Journal of Molecular Biology *289*, 1163–1178.

Wu, B., McDonald, A.J., Markham, K., Rich, C.B., McHugh, K.P., Tatzelt, J., Colby, D.W., Millhauser, G.L., and Harris, D.A. (2017). The N-terminus of the prion protein is a toxic effector regulated by the C-terminus. ELife *6*, e23473.

Xiao, Y., Ma, B., McElheny, D., Parthasarathy, S., Long, F., Hoshi, M., Nussinov, R., and Ishii, Y. (2015). A $\beta$ (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. Nature Structural & Molecular Biology *22*, 499–505.

Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T.R., Liu, C.-C., and Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. Nat Rev Neurol *15*, 501–518.

Yan, Y., Gong, K., Ma, T., Zhang, L., Zhao, N., Zhang, X., Tang, P., and Gong, Y. (2012). Protective effect of edaravone against Alzheimer's disease-relevant insults in neuroblastoma N2a cells. Neuroscience Letters *531*, 160–165.

Yang, T.-T., Hsu, C.-T., and Kuo, Y.-M. (2009). Cell-derived soluble oligomers of human amyloid- $\beta$  peptides disturb cellular homeostasis and induce apoptosis in primary hippocampal neurons. Journal of Neural Transmission *116*, 1561–1569.

Yehiely, F., Bamborough, P., Da Costa, M., Perry, B.J., Thinakaran, G., Cohen, F.E., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1997). Identification of Candidate Proteins Binding to Prion Protein. Neurobiology of Disease *3*, 339–355.

Younan, N.D., Chen, K.-F., Rose, R.-S., Crowther, D.C., and Viles, J.H. (2018). Prion protein stabilizes amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers and enhances A $\beta$  neurotoxicity in a *Drosophila* model of Alzheimer disease. Journal of Biological Chemistry jbc.RA118.003319.

Yuan, J., and Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. Nature 407, 802–809.

Yuan, P., Condello, C., Keene, C.D., Wang, Y., Bird, T.D., Paul, S.M., Luo, W., Colonna, M., Baddeley, D., and Grutzendler, J. (2016). TREM2 haplodeficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. Neuron *90*, 724–739.

Zafar, S., Noor, A., and Zerr, I. (2019). Therapies for prion diseases. In Handbook of Clinical Neurology, (Elsevier), pp. 47–58.

Zekry, D., Epperson, T.K., and Krause, K.-H. (2003). A Role for NOX NADPH Oxidases in Alzheimer's Disease and Other Types of Dementia? IUBMB Life *55*, 307–313. Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radical Biology and Medicine *33*, 337–349.

Zhang, B., Shen, P., Yin, X., Dai, Y., Ding, M., and Cui, L. (2020). Expression and functions of cellular prion proteins in immunocytes. Scandinavian Journal of Immunology *91*, e12854.

Zhang, C.C., Steele, A.D., Lindquist, S., and Lodish, H.F. (2006a). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. PNAS *103*, 2184–2189.

Zhang, Y., Li, H.-L., Wang, D.-L., Liu, S.-J., and Wang, J.-Z. (2006b). A transitory activation of protein kinase-A induces a sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites in N2a cells-imply a new mechanism in Alzheimer pathology. J Neural Transm *113*, 1487–1497.

Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vásquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. Free Radic. Biol. Med. *34*, 1359–1368.

Zheng, M., Åslund, F., and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science *279*, 1718–1721.

Zielonka, J., and Kalyanaraman, B. (2010). Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. Free Radical Biology and Medicine *48*, 983–1001.

Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2008). Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. Nat Protoc *3*, 8–21.

Zou, W.-Q., and Gambetti, P. (2004). Modeling of human prions and prion diseases in vitro and in vivo. Drug Discovery Today: Disease Models *1*, 157–164.

Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2002). A Novel Function of Monomeric Amyloid β-Protein Serving as an Antioxidant Molecule against Metal-Induced Oxidative Damage. J Neurosci *22*, 4833–4841.

Zou, W.-Q., Xiao, X., Yuan, J., Puoti, G., Fujioka, H., Wang, X., Richardson, S., Zhou, X., Zou, R., Li, S., et al. (2011). Amyloid-beta42 interacts mainly with insoluble prion protein in the Alzheimer brain. J. Biol. Chem. *286*, 15095–15105.

### 6. Annexes

## 6.1. Article de revue publié dans l'International Journal of Molecular Sciences (CC-BY-NC-ND)



International Journal o f Molecular Sciences



#### Review

# **Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review**

Elise Lévy <sup>1,2</sup>, Nadine El Banna <sup>2</sup>, Dorothée Baïlle <sup>2</sup>, Amélie Heneman-Masurel <sup>2</sup>, Sandrine Truchet <sup>1</sup>, Human Rezaei <sup>1</sup>, Meng-Er Huang <sup>2</sup>, Vincent Béringue <sup>1</sup>, Davy Martin <sup>1,\*</sup> and Laurence Vernis <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Molecular Virology and Immunology Unit (VIM-UR892), INRA, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3348, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91400 Orsay, France

\* Correspondence: davy.martin@inra.fr (D.M.); laurence.vernis@curie.fr (L.V.)

Received: 17 July 2019; Accepted: 1 August 2019; Published: 9 August 2019

**Abstract:** Compelling evidence supports a tight link between oxidative stress and protein aggregation processes, which are noticeably involved in the development of proteinopathies, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and prion disease. The literature is tremendously rich in studies that establish a functional link between both processes, revealing that oxidative stress can be either causative, or consecutive, to protein aggregation. Because oxidative stress monitoring is highly challenging and may often lead to artefactual results, cutting-edge technical tools have been developed recently in the redox field, improving the ability to measure oxidative perturbations in biological systems. This review aims at providing an update of the previously known functional links between oxidative stress and protein aggregation, thereby revisiting the long-established relationship between both processes.

Keywords: protein aggregation; redox; oxidative stress; proteinopathy

#### 1. Introduction

Protein aggregation consists of any association of proteins into larger structures with non-native conformation [1]. Aggregates can have either an amorphous or a highly ordered structure (amyloid). The presence of aggregates is generally indicative of proteostasis imbalance, either due to insufficient proteostasis or to disrupted chaperone capacity. Aggregates can also be a response to cellular stress related to environmental changes [2] (Figure 1).

The intrinsic parameters of protein aggregation are not fully understood, but the ability of certain proteins to aggregate more readily compared to others has been known for a while. Intrinsic aggregation capacity can be obvious, as in the case of peptide poly(Q) tracts that form high molecular

weight aggregates in some neurodegenerative diseases (including Huntington's disease). Such aggregates exhibit a fibrillar or ribbon-like morphology, reminiscent of prion rods and amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) fibrils in Alzheimer's disease (AD) [3]. Aggregation is controlled in vitro, not only by poly(Q) tracts length (51–122 glutamines causing huntingtin's aggregation in vitro), but also by protein concentration and reaction time [4]. In addition, most proteins contain one or more aggregation prone-regions (APR), which are protected from aggregation by protein interactions or by specific structural features (e.g., burying into a hydrophobic core) in physiological conditions [5].



Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 3896; doi:10.3390/ijms20163896

Figure 1. General picture of the protein aggregation process. The unfolded and misfolded monomer structures are aggregation prone. Folded monomers can also aggregate from native-like conformations without going through the unfolded step. The association of several monomers gives rise to oligomeric aggregates with low molecular weight. The addition of

oligomers in an ordered manner permits the growth of oligomers to protofibrils and mature fibrils. Amorphous aggregates can arise from the precipitation of monomers or oligomers, possibly leading to protein inclusions.

However, the aggregation of proteins without any obvious features is intriguing. An interesting study used three different stress agents: Arsenite, a toxic metalloid, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a ubiquitous oxidative stress agent, and azetidine-2-carboxylic acid (AZC), a proline analog whose incorporation into proteins provokes conformation alterations, misfolding, and aggregation [6,7]. The authors identified that despite distinct stress conditions with distinct mechanisms of action, some of the proteins that aggregate are of similar types, suggesting that proteins within aggregates are intrinsically aggregation-prone [7]. Indeed, it appears that aggregation prone proteins like PrP<sup>C</sup> (the prion protein) or Shadoo (also a member of the prion protein family) exhibit large intrinsically disordered domains (IDDs). The resulting conformational plasticity is likely to offer a wide range of interacting possibilities for these proteins, thereby regulating their localization and aggregation propensity [8– 10]. Several computational approaches have tried to question the intrinsic determinisms of aggregation. Noticeably, the Waltz algorithm was developed to try to predict amylogenic regions in protein sequences, based on a scoring matrix deduced from the biophysical and structural analysis of previously characterized hexapeptides with amyloid properties [11]. Based on the accuracy of their pWALTZ prion prediction method derived from Waltz, Sabate and co-workers recently suggested a model for prion formation that depends on the presence of specific short sequence elements, embedded in intrinsically Q/N-rich regions, with high amyloid propensity [12].

Interestingly, the aggregation of globular proteins into amyloids from a native or native-like state has also been described. In such cases, aggregation-prone states can be reached from native-like conformations after small temperature or pH changes, or stress modulations in general, without the need to cross the energy barrier to unfold [13]. Several examples in the literature illustrate this fact, such as the aggregation of one of the acylphosphatases from the *Drosophila melanogaster* (AcPDro2) [13], the human lysozyme aggregating through a nucleation-dependent growth process [14], the globular acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* (forming aggregates in which the monomers maintain their native-like topology [15]), and the transthyretin-like domain of human carboxypeptidase D (h-TTL), a monomeric protein with homology to human transthyretin that aggregates under close to physiological conditions [16]. Another example is the src tyrosine kinase SH3 domain, whose aggregation-prone state favors a domain swap that allows amyloid formation [17]. In such cases, the free energy gap between the native and the aggregation-prone state is an essential determinant of the aggregation propensity of the proteins [14,17]. Moreover, even though unfolded proteins have a high capacity to aggregate, the residual aggregation potential of proteins within a folded state may be physiologically relevant and play a role in several clinical situations [13,14,16].

Protein aggregation is obviously related to several human pathological situations. Amyloidoses, for example, are a group of diseases originating from the aggregation of oligomers into amyloid fibrils that deposit in tissues and are, in turn, toxic to the cells. Which of the oligomers or the fibrils are the most toxic to cells is still a matter of debate. Further, well-known neurodegenerative diseases, including Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD), and motor neuron diseases, appear to be a consequence of protein aggregation in neurons, leading to toxicity and neuronal cell death. Although pathological protein aggregation may have different causes, the chronic disturbance of cellular homeostasis (due to exogenous pollutants, or aging for example) is likely to play a major role by modifying the physico-chemical equilibrium and influencing protein folding and aggregation. Redox perturbations, in particular, have long been linked to protein aggregation diseases.

Reactive oxygen species (ROS) are normal by-products arising from various cellular reactions, mostly during electron transport in mitochondria or chloroplasts. Intracellular ROS levels are maintained low within cells, ensuring redox homeostasis for proper cellular chemical reactions. Oxidative stress occurs when the ROS concentration is excessive regarding the antioxidant capacities of the cell, leading to the oxidation of cellular molecules and their alteration [18]. Proteins appear to be a major target for oxidation due to their elevated quantities compared to other cell components and also due to their high reactivity with ROS [19]. Proteins are susceptible to ROS modifications of amino acid side chains that alter their structure. We provide here a review of recent data on the functional links between oxidative stress and protein aggregation.

#### 2. Oxidative Stress Can Produce Aggregation: A Mechanistic View

#### 2.1. Oxidation of Critical Amino Acids Induces Structural Changes within Proteins, Leading to Aggregation

#### 2.1.1. Cysteine Oxidation

Among the amino acids, cysteine (Cys) possesses a thiol group, which is highly nucleophilic. This structural feature makes cysteine particularly prone to oxidation by ROS. Amorphous aggregation of  $\gamma$ -cristallins is the cause of cataracts, a widespread disease among seniors. Internal disulfide bond formation between Cys32 and Cys41 due to oxidation was found necessary and sufficient to provoke aggregation under physiological conditions, likely by stabilizing an unfolded intermediate prone to protein–protein interaction between an extruded hairpin and a distal  $\beta$ -sheet in the  $\gamma$ D-crystallin [20].

Being essential for serotonin synthesis, Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) is considered a phenotypic marker for serotonin neurons. Known to be extremely labile to oxidation, TPH2 aggregates through both intra- and inter-molecular disulfide cross-linking upon oxidation of cysteines [21]. Accordingly, in a systematic cysteine-mutagenesis approach, a single cysteine out of 13 was found sufficient for aggregation, whereas only cysteine-less mutants were found resistant to aggregation upon oxidation, thereby indicating that cysteines are necessary for the responses of TPH2 to oxidation. These results led the authors to hypothesize that redox homeostasis changes occurring during Parkinson's disease might be involved in disulfide links in TPH2, causing TPH2 to shift from a soluble compartment to large inclusion bodies, consequently losing its catalytic function [21].

Alternatively, disulfide bonds can occur in proteins' native structures in physiological conditions. Disulfide-rich domains (DRDs) are peptide domains whose native structures are stabilized by covalent disulfide bonds through an oxidative folding reaction. The authors questioned whether this specific folding might be associated with an increased aggregation propensity of DRDs. Among the 97 DRDs analyzed in silico, a majority were intrinsically disordered, but remained more soluble and had fewer aggregating regions than those of other globular domains [22]. This work suggests that DRDs might have evolved to avoid aggregation before proteins acquire their covalently linked native structures or after oxidative stress.

#### 2.1.2. Other Aminoacids Involved

Caseins are very abundant in milk as they represent more than 80% of total milk protein content [23]. Inter- and intra- covalent di-tyrosine (di-Tyr) and di-tryptophan (di-Trp) cross-links have been shown to provoke  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein aggregation, due to the Trp-or Tyr- derived radicals produced by photo-oxidation mediated by riboflavin, a photosensitizing vitamin [24]. Oxygen was found to strongly modulate this phenomenon and to increase protein aggregation by decreasing the overall cross-link formation, but allowing the formation of oxidized Trp, Tyr, Methionine (Met), and Histidine (His) residues [24].

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is involved in energy production and has been shown to convert from its native soluble state into a non-native high molecular weight, which is insoluble, and an aggregated state, during the course of several diseases, including Alzheimer's disease [25–27]. Interestingly, methionine, rather than cysteine oxidation, was shown to be a primary cause of GAPDH aggregation, as mutating methionine 46 to leucine rendered GAPDH highly resistant to aggregation after exposure to (3E)-4-ethyl-2-hydroxyimino-5-nitro-3-hexenamide (NOR3), a potent oxidative agent driving GAPDH aggregation [25,28,29]. In this case, the authors propose that methionine oxidation represents a "linchpin", a permissive event for subsequent misfolding and aggregation [28]. It appears that protein residue oxidation, including the resulting disulfide bonds between cysteines, is not directly responsible for aggregation, per se, but in most cases induces limited or extensive unfolding of the surrounding environment of the protein. This further favors protein–protein interactions and aggregation, as summarized in Table 1.

Protein(s) Involved	Mechanism	Residue Involved	Related	Reference
			Disease/Pathway	
γD-crystallin	Cys32–Cys41 internal disulfide bond formation leads to the stabi- lization of a partially unfolded domain, which is prone to further intermolecular interactions. Inter- nal disulfide bond formation pro- vokes aggregation under physio- logical conditions.	Cysteine	Cataracts in older people	[20]
Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2)	Intra- and inter-molecular di- sulfide bonds responsible for high molecular weight aggre- gates.	Cysteine	Parkinson's disease	[21]
Milk caseins	Oxidation of Tryptophan, Tyro- sine, Methionine, and Histidine residues decreases di-Tyr and di-Trp formation but allows in- creased protein aggregation.	Tryptophan, Tyrosine, Methionine, Histi- dine	None	[24]
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Oxidation of Methionine allows subsequent misfolding and further aggregation of GAPDH.	Methionine	None	[28]

**Table 1.** Residue oxidation causing protein aggregation.

#### 2.2. Role of Metals

Metals' contributions to Fenton's or Haber-Weiss' reactions have been described for a number of years, as they lead to highly reactive ROS that can be deleterious to cell components. In particular, they are responsible for amino acid oxidation. The involvement of metals in various pathological situations has also been recognized [30].

Parkinson's disease pathology involves misfolding and aggregation of the presynaptic protein  $\alpha$ -synuclein, together with an alteration of the homeostasis of brain metals, including iron. A recent analysis of iron's role in the aggregation and secondary structure of N-terminally acetylated  $\alpha$ -synuclein (<sup>NAc</sup> $\alpha$ S), the pathologically relevant form in PD, revealed the importance of oxidation in the phenomenon [31]. The sole addition of iron(II) in presence of oxygen was shown to induce an antiparallel right-twisted conformation of <sup>NAc</sup> $\alpha$ S, and generate the oligomer-locked <sup>NAc</sup> $\alpha$ S<sup>-</sup>Fe<sup>II</sup>/O<sub>2</sub> conformation, thus initiating oligomer formation but preventing further processing into fibrils. This was not observed in the absence of oxygen. In contrast, the addition of iron(III) led to the formation of fibrils in the presence of oxygen. Thus, the iron oxidation status in the presence of oxygen differentially controls aggregation. This may have physiological or pathological implications [31].

Particular mutations in the Apolipoprotein A-I (APOA1) gene provoke hereditary amyloidosis. Interestingly, Fe(II) can reduce the formation of fibrillar APOA1 species, as opposed to Fe(III), which enhances their formation in vitro [32]. The increased levels in Fe(III) compared to Fe(II) under particular oxidative physiological conditions, e.g., in older patients or in presence of air pollutants, might thus contribute to the development of amyloidosis and possibly other diseases involving protein aggregation [32].

Several studies have demonstrated amyloid- $\beta$ -mediated ROS production in the presence of Cu ions, and mechanisms that can generate a superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and a hydroxyl radical (HO•) have been proposed [33,34]. The Amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) is produced after cleavage of the transmembrane Amyloid Precursor Protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. A $\beta$  is thus released in the extracellular space. Its accumulation and aggregation are a hallmark of Alzheimer's disease (See Figure 2). A recent work identified that Cu(I) or Cu(II) cations predominantly bind the M1 site located in domain E2 of APP, with a comparablely high affinity (picomolar) being liganded by four histidine residues. Cu(II) binding to M1 was found to stabilize E2 but also alters its structural conformation into a more open state [35]. The authors demonstrated the aerobic catalytic oxidation of ascorbate, an abundant antioxidant molecule in the central nervous system, by the Cu-E2 complex, with an experimental set up close to physiological conditions. APP $\beta$  might thus play the role of redox catalyst in vivo and cause protein damage, as observed in brain tissues from Alzheimer's patients [35].



**Figure 2.** Amyloid Precursor Protein (APP) processing. (**A**) Cleavage of APP occurs through two pathways. The nonamyloidogenic pathway (grey, left) involves two cleavages by  $\alpha$ - and  $\gamma$ -secretases and produces a long APP $\alpha$  fragment, which is secreted. C-Terminal Fragment (CTF)83, 3-kd peptide, (P3), and APP intracellular domain (AICD) fragments are also released. In parallel, the amyloidogenic pathway (pink, right) involves two cleavages by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, producing a long APP $\beta$ , which is secreted. CTF99, AICD, and A $\beta$  fragments are also produced. In pathological conditions, A $\beta$  peptides accumulate and can ultimately aggregate and form oligomers and fibrils that are toxic for the cells (adapted from [36]). (**B**) Schematic representation of the APP $\alpha$  fragment, produced after cleavage of the APP by  $\alpha$ -secretase. The E2 domain is highlighted (green). (**C**) Zooming in on the four cysteine residues involved in the tetra-His M1 site, included in the E2 domain. The Cu cation is pictured as a red ball (adapted from [37] with permission).

#### 2.3. Carbonylation Leads to Aggregation

Carbonylation is a particular type of oxidation involving the irreversible addition of a carbonyl group (CO) into proteins. The ROS-mediated carbonylation of proteins mainly affects lysine, arginine, threonine, and proline residues [38] and was frequently reported in chronic inflammatory diseases [39,40]. Protein carbonylation is commonly considered a standard marker of oxidative stress. While carbonylation is reported as having a role in protein quality control, in tagging damaged proteins for degradation with the 20S proteasome (via an unresolved mechanism), excessive carbonylation has been shown to be responsible for protein aggregation, especially when proteasome activity is impaired [41]. However, few publications provide mechanistic insight into how protein carbonylation causes aggregation. A recent report indicated that these specific modifications are also associated with physiological aging and favor the formation of denser and more compact aggregates, including several proteins previously reported for their aggregation propensity [42]. Inducing carbonyl stress in young mice increased protein aggregation, similar to the aggregation naturally observed in old mice, indicating that post-translational oxidative alterations are responsible for increased protein aggregation [42]. Despite evidence that carbonylation leads to aggregation, to our knowledge, no direct mechanism has been explicitly reported.

Recent attention has been paid to reactive dicarbonyl species, such as methylglyoxal (MGO) and glyoxal (GO), considered to be side-products of several metabolic pathways, as they produce specific oxidative modifications of proteins, mainly reacting with lysine and arginine [43]. These oxidative modifications, including carbonylation, are subsequently responsible for secondary and tertiary structure alterations and the formation of high molecular mass protein aggregates and may have an underestimated role in several proteinopathies, including Alzheimer's and Parkinson's diseases.

#### 2.4. Protein Oxidation Influences Aggregation by Modulating Chaperone Protein Activity

Oxidation-induced structural changes in proteins may also prevent specific interactions with partners. A very interesting case has been described recently, with the nucleotide exchanger and cochaperone Mge1 within the mitochondria. Mge1 is actually modified by persistent oxidative stress, and methionine 155, in particular, can be reversibly oxidized into methionine sulfoxide. As a result, due to local structural changes in Mge1 binding to its partner, the heat shock protein 70 (Hsp70) is defective. Hsp70 is a central heat-shock protein involved in controlling protein folding and plays an important role in ensuring proteostasis. If not reduced by the endogenous methionine sulfoxide reductase, the oxidized Mge1 aggregates into amyloid-type particles. Interestingly, the authors noticed that highly oxidized Mge1 actually increased the binding capacity of Hsp70 to a denatured protein, suggesting that the oxidation-induced defective binding of Meg1 to Hsp70 and MgeI aggregation may protect the cells from the aggregation of other proteins in an oxidative stress context [44]. It is interesting to note that some isoforms of Hsp70 are stress-modulated. For instance, oxidants like methylene blue and hydrogen peroxide inactivate Hsp72, possibly due to the oxidation of two specific cysteine residues resulting in structural changes within the nucleotide-binding domain. Noticeably, this oxidation-induced inactivation of Hsp72 is associated with decreased levels of tau in several Alzheimer's disease models. The authors suggest that Hsp72 inactivation could clear the cytosol from misfolded Hsp72 substrates like tau, even though the mechanism remains unclear [45].

Tsa1 is a surprising protein that exhibits a double role, acting as a peroxidase but also as a chaperone for aggregated proteins—specifically, by chaperoning misassembled ribosomal proteins, thereby preventing toxicity to arise from aggregation [46]. It is noticeable that the absence of Tsa1 both provokes an increase in  $[H_2O_2]$  and the accumulation of aggregated proteins in the meantime [47]. This dual role might argue for a strong functional connection between oxidative stress and protein aggregation.

#### 2.5. Protein Oxidation Influences Aggregation by Perturbing the Translational Process

Yeast Sup35 is a translation termination factor well known for its capacity to form a prion (i.e., a self-perpetuating amyloid aggregate), in response to environmental or cellular factors. This prion is called [*PSI*+] [48]. When aggregated into [*PSI*+], Sup35 loses its function in translation termination, and an elevated read-through of the stop codons occurs, thereby generating C-terminally extended polypeptides. Following exposure to  $H_2O_2$ , [*PSI*<sup>+</sup>] formation was shown to occur with increased frequency, possibly linked to the oxidation of methionine residues [49]. As a consequence, exposure to oxidative stress perturbs the translational process through titration of Sup35.

Defective mRNAs are normally handled by mRNA quality control systems within cells, among which the non-stop decay (NSD) pathway and the no-go decay (NGD) pathways prevent the production of abnormal, potentially aggregation-prone proteins. Interestingly, NSD components (e.g., Ski7) and NGD components (e.g., Dom34/Hbs1) were recently shown to be required during oxidative stress [50]. Moreover, overexpression of Sup35 actually decreases stop codon read-through and improves the tolerance of yeast cells to oxidative stress, thus providing an unanticipated link between oxidative stress tolerance and NSD, as NSD substrates noticeably accumulate as a consequence of [*PSI*<sup>+</sup>] formation after oxidative stress [50].

### 2.6. Oxidative Stress Contributes to Aggregation by Modulating the Proteasome and Autophagy Capacity

Proteasomes are central players of the Ubiquitin–Proteasome System (UPS), which ensures the quality control of proteins. The 20S proteasome, constituting 28 subunits, is considered the "core" proteasome and is involved in unfolded, misfolded, or intrinsically disordered or oxidized protein removal by proteolytic degradation. Ubiquitination is not needed for degradation by the 20S proteasome, unlike the 26S proteasome. Several other proteasome components regarded as regulators have been characterized, including the 19S proteasome. Obviously, increasing 20S proteasome activity in pathogenic conditions due to protein aggregation might be of interest. The small, imidazoline-derivative molecule TCH-165 was shown to increase 20S proteasome levels to the detriment of the 26S proteasome, resulting in the enhanced proteolysis of intrinsically disordered proteins. These include aggregation-prone proteins such as  $\alpha$ -synuclein and tau, whose aggregation are hallmarks of Parkinson's and Alzheimer's diseases, respectively, and proto-oncogenes, such as ornithine decarboxylase and c-Fos. Noticeably, high concentrations of this molecule resulted in the accumulation of ubiquitinated substrates [51].

Similarly, proteasome impairment has been shown to favor the accumulation and aggregation of aggregation-prone proteins [52–55]. UPS disturbances have been correlated with the spreading of diseases involving protein aggregation, including Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases, as well as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). ALS, in particular, is characterized by ubiquitinated proteic inclusions.

For our current focus, it is worth noticing that the UPS is actually redox regulated, and Sglutathionylation, specifically, has been involved in the post-translational control of proteasome activity. For example, 20S glutathionylation was shown to be responsible for increased proteolytic activity [56], favoring theremoval of oxidizedor unstructured proteins in stressful situations. After an acuteoxidative event, a coordinated response involving poly[ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) activation and a ubiquitination block, followed by the inactivation of the proteolytic capacity, occurs, before massive de novo synthesis of proteasome players and consequently increased proteolytic activity [57]. In contrast to 20S, 26S proteolytic activity was reduced in oxidative conditions. Indeed, the Sgluthationylation of a regulatory subunit of the 19S proteasome, resulting in diminished 26S proteasome activity, was observed in the presence of chronically increased hydrogen peroxide concentrations both in vitro and in cellulo [58]. These data might reveal differential redox regulations for the proteasome's components. Under normal physiological conditions, the oxidized proteasomes (ubiquitin-dependent proteolytic 20S core and regulatory 19S) are S-glutathionylated, as evidenced in several cellular contexts [56,58–60]. It is also interesting to report here that the anti-malaria drug dihydroartemisinin, an artemisinin derivative used in clinics, acts by inhibiting the parasite's proteasome, possibly through oxidative damage to the proteasome [61].

Thus, chronic oxidative stress favors protein aggregation through by impairing proteasome capacity (Figure 3). In addition, the slow and gradual accumulation of aggregates during aging has been observed. These aggregates are composed of oxidized proteins (including carbonylated aggregates) due to proteins escaping the UPS and are suggested to bind the proteasome and inhibit its function [62,63], thereby fostering this aggregation loop.

Autophagy is a cellular process that allows the recycling of cellular components, such as proteins or organelles, through a lysosome-mediated catabolic pathway. Particular types of autophagy are primarily distinguished (macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, microautophagy) by how target substrates are recognized and delivered to lysosomes. More specifically, autophagy is central in eliminating the substrates that will ultimately give rise to amyloids and fibrils in several neurodegenerative diseases (A $\beta$  peptide and tau protein in AD [64,65], alpha-synuclein in PD [66], mutated huntingtin in Huntington disease [67], and superoxide dismutase 1 (SOD1) in ALS [68]). Accordingly, mice deficient in autophagy show neurodegenerative diseases [69–73].

Redox regulation of autophagy has been suggested, as antioxidant treatments actually prevent autophagy [74]. This type of regulation was proposed by several authors [75–79]. Interestingly, recent work identified that the absence of the glutathione reductase *gsr-1* gene leads to major redox homeostasis unbalance in the model organism, Caenorhabditis elegans, and is also responsible for autophagy impairment by preventing the nuclear translocation of a key transcription factor, HLH-30/TFEB. In addition, the aggregation of both homologous and heterologous proteins (Aβ peptide (AD), α-synuclein:: YFP (PD), and Q40::YFP (Huntington disease) expressed in *C. elegans* was increased. This study reveals a glutathione-dependent regulation of autophagy, allowing the control of protein aggregation, a process also conserved from lower eukaryotes to mammals [80]. Recently, several drugs were developed to modulate autophagy in search of therapeutic improvement in neurodegenerative disorders. Noticeably, Rapamycin targets mTor, a master regulator of cell growth and metabolism. Rapamycin activates autophagy and lysosomal biogenesis [81] and, furthermore, was shown capable of reducing Aβ accumulation and improving cognitive impairments in a transgenic mouse model by increasing autophagy [82,83]. Autophagy activation by rapamycin in neurons was also shown to favor the clearing of intracellular aggregates of misfolded prion proteins and to reduce neurotoxicity [84]. The rapamycin derivative, Rilmenidine, which is protective against oxidative cytotoxicity [85], was also shown to increase autophagy, despite failing to decrease the accumulation and aggregation of SOD1 in a mouse ALS model [86]. Another rapamycin derivative, biolimus, was also shown to be capable of activating autophagy efficiently in smooth muscle cells [87]. Most of these drugs have been shown to play on the oxidative balance within cells. Nevertheless, whether the effect of these drugs on protein aggregation is related to redox modulation has not been consistently characterized.



**Figure3.** General diagram showing the regulation of protein aggregation. Arrows indicate the activation relationship, and blunt-ended arrows indicate the repression relationship. References supporting this diagram within this review are as follows: 1: [20,21,24,28,31,32,35,41–47,49,50]; 2: [58,61]; 3: [57]; 4: [62,63]; 5: [51–55]; 6: [80]; 7: [74–80]; 8: [64–73,82–84]; 9: [47,88–99]; 10: [100–107].

#### 3. Aggregation Can, in Turn, Produce Oxidative Stress, or Protect Against Oxidative Insults

#### 3.1. Pro-Oxidative Effects

As noticed previously, the yeast peroxiredoxin Tsa1 acts both as a chaperone and an ROS scavenger. The proline analogue azetidine-2-carboxylic acid (AZC) induces aggregation in yeast cells, and yeast mutants lacking *TSA1* are highly sensitive to AZC-induced misfolding. The toxicity of AZC is actually related to ROS accumulation, as decreasing ROS levels prevents sensitivity to AZC. Interestingly, inhibiting nascent protein synthesis with cycloheximide rescues the *tsa1* mutant sensitivity to AZC, confirming that aggregation in this case causes ROS production [47].

ROS production due to mitochondrial dysfunction was often found to be associated with protein aggregation, as in the case of Huntington's [88,89] or Alzheimer's disease [90]. Alpha–synuclein aggregation is a hallmark of Parkinson's disease, as previously explained, and is known to influence mitochondrial morphology, interrupting ER–mitochondria communication [108–110] and modulating mitochondrial fragmentation [111], even though the molecular determinants of these changes are not very clear. The preferential binding of pathological alpha–synuclein aggregates to mitochondria was recently identified in neurons [91], and this process was accompanied by cellular respiration defects, suggesting mitochondrial dysfunction and leading to the hypothesis of a direct mitochondrial impairment by alpha-synuclein aggregates, inducing ROS production.

RNA aptamers are synthetic nontoxic and non-immunogenic RNA oligonucleotides able to bind a specific target and can thus be used as therapeutic weapons. For instance, specific RNA aptamers can efficiently inhibit aggregation of mutant huntingtin, with a pathogenic polyglutamine stretch, by stabilizing the monomer both in vitro and in cellulo. Oxidative stress is a hallmark of Huntington's disease and has been shown to occur in cells exposed to mutant huntingtin aggregates. Whether it is a cause or a consequence of the disease is not yet clear. However, it is interesting to note that RNA aptamers inhibiting mutant huntingtin's aggregation lead to reduced oxidative stress levels in cellular models [92]. The authors smartly engineered cells expressing RNA aptamers under the control of an oxidative stress-inducible promoter. A nine-fold increase in aptamer expression occurred in mutant huntingtin-expressing cells, which consequently reduced mutant huntingtin aggregation in these cells. As a consequence, oxidative stress levels were also reduced, so RNA aptamer expression was also, in turn, reduced [93]. This smart design unambiguously demonstrates that protein aggregation is responsible for intracellular oxidative stress production in this context. Accordingly, mitochondrial dysfunction was also reduced using this particular experimental design, indicating that ROS production is likely related to mitochondrial impairment [93].

Human Amylin (hA) is a 4 kDa pancreatic hormone, synthesized and secreted along with insulin by islet beta cells. Like other amyloid proteins, it is prone to aggregation and remains a hallmark of type-2 diabetes mellitus [96]. Previous studies indicated that either exposure of beta cells to hA or hA-overexpression in cells results in intracellular ROS accumulation, supporting the hypothesis that hA aggregation might be a cause of oxidative stress [94], possibly through mitochondrial dysfunction [95]. Recent work identified that a misfolded amylin actually activates an upstream apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK1), with a concomitant decrease in the intracellular levels of reduced glutathione [96]. Moreover, the pro-oxidative activity and expression of a plasma membrane bound NADPH oxidase (NOX) and its regulatory subunits were stimulated, suggesting that NOX1 and ASK1 mediate the cytotoxic effect of aggregated hA in pancreatic beta-cells [96]. Inter-estingly, NOX had also been previously identified as a main ROS producer in cultured neurons exposed to amyloid-β peptides [97,98].

Stabilizing  $\alpha$ -synuclein monomers also proved to decrease the growth of misfolded cytotoxic aggregates and consequently reduced oxidative damage to the cells by limiting the binding of aggregates to the cell membrane [99]. Thus, a membrane's structure seems to play an important role in oxidative stress production in response to protein aggregation, possibly involving membrane bound oxidases for ROS production, as a consequence of aggregates binding to the membrane.

#### 3.2. Anti-Oxidative Effects

Even though the role of aggregates in ROS production was unambiguously demonstrated through obvious examples, other findings describe how aggregates can also "buffer" oxidative effects. Surprisingly, 40-aminoacids, as well as 28-aminoacids amyloid- $\beta$  peptides (A $\beta_{1-40}$  or A $\beta_{1-28}$ ), either soluble or aggregated, revealed potent anti-oxidant activity in cell-free systems, despite their accumulation and aggregation being a hallmark of Alzheimer's disease, which is also characterized by chronic oxidative stress [100,101]. The authors suggest that peptides might first chelate metal ions, including Zn(II), Cu(II), and Fe(II), as previously suggested by other authors [102–104], which would inhibit Fenton's reaction, and then scavenge radicals by oxidation of His and Tyr residues [100,101]. Whether a peptide with similar His and Tyr residue content are also capable of "buffering" free radicals would be worth testing. A more recent study reported similar anti-oxidant activity of amyloid-B aggregates. Overexpression of 21 variants of the amyloid-β 42 peptide fused with GFP in yeast (covering a broad range of intrinsic aggregation propensities) led to various levels of intrinsic oxidative stress production [105]. A striking correlation was observed—the more aggregation-prone the mutated GFP-Abeta is, the less oxidative stress is produced, suggesting that large insoluble aggregates might act to limit cellular oxidative stress. An aggregation propensity threshold could be defined, above which proteins with a high aggregation propensity accumulate into foci. The authors then suggested that protein foci formation is an active ATP-dependent process, which might serve as a protective mechanism against oxidative stress damage, despite its high energetic price [106].

Similarly, it is noteable that [*PSI*+] formation has been reported as protective against oxidative stress, as antioxidant enzyme-lacking yeasts become more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when [*PSI*+] is eliminated [107].

Finally, Carija et al. propose that different kinds of aggregates have different effects on ROS levels, as small particles called "diffuse" aggregates are associated with increased intracellular oxidative stress, whereas larger protein inclusions are not [105]. Similar conclusions were previously reached, that hydrogen peroxide is generated during the early stages of protein aggregation in the

course of Alzheimer's disease pathogenesis, possibly by an early form of protein aggregation, in the absence of a mature amyloid fibril [112].

#### 4. Aggregation and Oxidation can be Parts of a Vicious Circle

In about 12% of familiar and 1.5% of sporadic cases of ALS, mutations in the superoxide dismutase 1 (SOD1), a major player in ROS detoxification, are found. The misfolding and aggregating of SOD1 are considered a hallmark of the disease [113]. A mutated version of SOD1 named SOD1<sup>A4V</sup> is particularly aggregation-prone. Its expression is associated with a profound disturbance of free ubiquitin distribution within the cells, and with UPS dysfunction. These data suggest that protein aggregation, per se, might cause UPS disturbance and participate in a vicious circle that eventually prevents the elimination of aggregates [114]. Because SOD1 is a major player in ROS detoxification, and its absence is responsible for increased oxidative stress, the latter being suggested to play a key role in ALS progression [115,116], it is a possibility that oxidative stress plays a role in UPS disturbance in this particular case. Both would participate a vicious circle involving SOD1 aggregation and oxidative stress.

In light of the mechanistic insights described previously, multifunctional modulators that are able to chelate metals and prevent ROS generation and protein aggregation have been designed for several years, in an attempt to develop new therapeutic tools [117,118]. TGR86 is composed of both the metal chelating clioquinol and the antioxidant, epigallocatechin gallate [119]. TGR86 was shown to be capable of both interacting with amyloid- $\beta$  and efficiently modulating its aggregation and complexing with Cu(II), as well as preventing ROS generation. Another bifunctional molecule, composed of a nitroxide spin label linked to an amyloidophilic fluorine (spin-labeled fluorine, SLF), was recently developed [120]. Using super-resolution confocal microscopy imaging, the authors identified that assembling those two modules within SLF creates a synergistic effect in cultured neurons, preventing the intracellular accumulation of amyloid- $\beta$  on the one hand, together with the reduction and the scavenging of amyloid- $\beta$ -induced ROS on the other. Further studies are now needed to evaluate the therapeutic potential of these molecules in Alzheimer's disease.

Author Contributions: All co-authors conceived, designed, and drafted the review. All authors approved the submitted version.

Funding: This resarch was funded by regular funding from the Centre National de la Recherche Scientifique

(CNRS) and Institut Curie. E.L. is supported by a doctoral research fellowship from the Doctoral School ABIES,

AgroParisTech. N.E.B. is supported by a doctoral research fellowship from the Doctoral School SDSV, Université Paris-Saclay, and from "La Fondation pour la Recherche Médicale". S.T., H.R., V.B., and D.M. are supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). L.V. is supported by Inserm.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the writing of the manuscript.

#### References

- Hipp, M.S.; Park, S.H.; Hartl, F.U. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* 2014, 24, 506–514. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Li, J.; Labbadia, J.; Morimoto, R.I. Rethinking HSF1 in Stress, Development, and Organismal Health. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 895–905. [CrossRef] [PubMed]
- Scherzinger, E.; Lurz, R.; Turmaine, M.; Mangiarini, L.; Hollenbach, B.; Hasenbank, R.; Bates, G.P.; Davies, S.W.; Lehrach, H.; Wanker, E.E. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates *in vitro* and *in vivo*. *Cell* 1997, *90*, 549–558. [CrossRef]
- 4. Scherzinger, E.; Sittler, A.; Schweiger, K.; Heiser, V.; Lurz, R.; Hasenbank, R.; Bates, G.P.; Lehrach, H.; Wanker, E.E. Selfassembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils:
- Implications for Huntington's disease pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 4604–4609. [CrossRef] [PubMed]
- Beerten, J.; Schymkowitz, J.; Rousseau, F. Aggregation prone regions and gatekeeping residues in protein sequences. *Curr. Top. Med. Chem.* 2012, *12*, 2470–2478. [CrossRef] [PubMed]
- Trotter, E.W.; Berenfeld, L.; Krause, S.A.; Petsko, G.A.; Gray, J.V. Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in Saccharomycescerevisiae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, *98*, 7313–7318. [CrossRef] [PubMed]
- 7. Weids, A.J.; Ibstedt, S.; Tamas, M.J.; Grant, C.M. Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24554. [CrossRef]
- 8. Ciric, D.; Richard, C.A.; Moudjou, M.; Chapuis, J.; Sibille, P.; Daude, N.; Westaway, D.; Adrover, M.; Beringue, V.; Martin, D.; et al. Interaction between Shadoo and PrP Affects the PrP-Folding Pathway. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6287–6293. [CrossRef]
- 9. Pepe, A.; Avolio, R.; Matassa, D.S.; Esposito, F.; Nitsch, L.; Zurzolo, C.; Paladino, S.; Sarnataro, D. Regulation of sub-compartmental targeting and folding properties of the Prion-like protein Shadoo. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3731. [CrossRef]
- 10. Sarnataro, D. Attempt to Untangle the Prion-Like Misfolding Mechanism for Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3081. [CrossRef]
- 11. Maurer-Stroh, S.; Debulpaep, M.; Kuemmerer, N.; Lopez de la Paz, M.; Martins, I.C.; Reumers, J.; Morris, K.L.; Copland, A.; Serpell, L.; Serrano, L.; et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 237–242. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Sabate, R.; Rousseau, F.; Schymkowitz, J.; Ventura, S. What makes a protein sequence a prion? *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004013. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Soldi, G.; Bemporad, F.; Torrassa, S.; Relini, A.; Ramazzotti, M.; Taddei, N.; Chiti, F. Amyloid formation of a protein in the absence of initial unfolding and destabilization of the native state. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4234–4244. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Dumoulin, M.; Kumita, J.R.; Dobson, C.M. Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 603–610. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Bemporad, F.; Vannocci, T.; Varela, L.; Azuaga, A.I.; Chiti, F. A model for the aggregation of the acylphosphatase from Sulfolobus solfataricus in its native-like state. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 1986–1996. [CrossRef] [PubMed]
- 16. Garcia-Pardo, J.; Grana-Montes, R.; Fernandez-Mendez, M.; Ruyra, A.; Roher, N.; Aviles, F.X.; Lorenzo, J.; Ventura, S. Amyloid formation by human carboxypeptidase D transthyretin-like domain under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 33783–33796. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Zhuravlev, P.I.; Reddy, G.; Straub, J.E.; Thirumalai, D. Propensity to form amyloid fibrils is encoded as excitations in the free energy landscape of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2653–2666. [CrossRef] [PubMed]
- 18. Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, 24, 325–340. [CrossRef]
- 19. Ahmad, S.; Khan, H.; Shahab, U.; Rehman, S.; Rafi, Z.; Khan, M.Y.; Ansari, A.; Siddiqui, Z.; Ashraf, J.M.; Abdullah, S.M.; et al. Protein oxidation: An overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front. Biosci.* **2017**, *9*, 71–87. [CrossRef]
- 20. Serebryany, E.; Woodard, J.C.; Adkar, B.V.; Shabab, M.; King, J.A.; Shakhnovich, E.I. An Internal Disulfide
- Locks a M is folded Aggregation-prone Intermediate in Cataract-linked Mutants of Humangamma D-Crystallin.
  - J. Biol. Chem. 2016, 291, 19172–19183. [CrossRef]
- Kuhn, D.M.; Sykes, C.E.; Geddes, T.J.; Jaunarajs, K.L.; Bishop, C. Tryptophan hydroxylase 2 aggregates through disulfide cross-linking upon oxidation: Possible link to serotonin deficits and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2011, *116*, 426–437. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Fraga, H.; Grana-Montes, R.; Illa, R.; Covaleda, G.; Ventura, S. Association between foldability and aggregation propensity in small disulfide-rich proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 368–383. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Jenness, R. Comparative aspects of milk proteins. J. Dairy Res. 1979, 46, 197–210. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Fuentes-Lemus, E.; Silva, E.; Leinisch, F.; Dorta, E.; Lorentzen, L.G.; Davies, M.J.; Lopez-Alarcon, C. Alpha- and beta-casein aggregation induced by riboflavin-sensitized photo-oxidation occurs via di-tyrosine cross-links and is oxygen concentration dependent. *Food Chem.* **2018**, *256*, 119–128. [CrossRef] [PubMed]
- Nakajima, H.; Amano, W.; Kubo, T.; Fukuhara, A.; Ihara, H.; Azuma, Y.T.; Tajima, H.; Inui, T.; Sawa, A.; Takeuchi, T. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 34331–34341. [CrossRef] [PubMed]
- 26. Cumming, R.C.; Schubert, D. Amyloid-beta induces disulfide bonding and aggregation of GAPDH in Alzheimer's disease. *FA-SEB J.* **2005**, *19*, 2060–2062. [CrossRef] [PubMed]
- Tsuchiya, K.; Tajima, H.; Kuwae, T.; Takeshima, T.; Nakano, T.; Tanaka, M.; Sunaga, K.; Fukuhara, Y.; Nakashima, K.; Ohama, E.; et al. Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions. *Eur. J. Neurosci.* 2005, *21*, 317–326. [CrossRef] [PubMed]
- Samson, A.L.; Knaupp, A.S.; Kass, I.; Kleifeld, O.; Marijanovic, E.M.; Hughes, V.A.; Lupton, C.J.; Buckle, A.M.; Bottomley, S.P.; Medcalf, R.L. Oxidation of an exposed methionine instigates the aggregation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 2014, 289, 26922–26936. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Nakajima, H.; Amano, W.; Fujita, A.; Fukuhara, A.; Azuma, Y.T.; Hata, F.; Inui, T.; Takeuchi, T. The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26562–26574. [CrossRef]
- 30. Sayre, L.M.; Perry, G.; Atwood, C.S.; Smith, M.A. The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol.* 2000, *46*, 731–741.
- **31**. Abeyawardhane, D.L.; Fernandez, R.D.; Murgas, C.J.; Heitger, D.R.; Forney, A.K.; Crozier, M.K.; Lucas, H.R. Iron Redox Chemistry Promotes Antiparallel Oligomerization of alpha-Synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5028–5032. [CrossRef] [PubMed]
- **32**. Del Giudice, R.; Pesce, A.; Cozzolino, F.; Monti, M.; Relini, A.; Piccoli, R.; Arciello, A.; Monti, D.M. Effects of iron on the aggregation propensity of the N-terminal fibrillogenic polypeptide of human apolipoprotein AI. *BioMetals* **2018**, *31*, 551–559. [CrossRef] [PubMed]
- **33**. Cheignon, C.; Jones, M.; Atrian-Blasco, E.; Kieffer, I.; Faller, P.; Collin, F.; Hureau, C. Identification of key structural features of the elusive Cu-Abeta complex that generates ROS in Alzheimer's disease. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5107–5118. [CrossRef] [Pub-Med]

- 34. Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 450–464. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Young, T.R.; Pukala, T.L.; Cappai, R.; Wedd, A.G.; Xiao, Z. The Human Amyloid Precursor Protein Binds Copper Ions
- Dominated by a Picomolar-Affinity Site in the Helix-Rich E2 Domain. *Biochemistry* **2018**, *57*, 4165–4176. [CrossRef]
- **36**. Thinakaran, G.; Koo, E.H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29615–29619. [CrossRef] [PubMed]
- 37. Dienemann, C.; Coburger, I.; Mehmedbasic, A.; Andersen, O.M.; Than, M.E. Mutants of metal binding site M1 in APP E2 show metal specific differences in binding of heparin but not of sorLA. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2490–2499. [CrossRef]
- Weng, S.L.; Huang, K.Y.; Kaunang, F.J.; Huang, C.H.; Kao, H.J.; Chang, T.H.; Wang, H.Y.; Lu, J.J.; Lee, T.Y. Investigation and identification of protein carbonylation sites based on position-specific amino acid composition and physicochemical features. *MC Bioinform.* **2017**, *18*, 1105. [CrossRef]
- 39. Arena, S.; Salzano, A.M.; Renzone, G.; D'Ambrosio, C.; Scaloni, A. Non-enzymatic glycation and glycoxidation protein products in foods and diseases: An interconnected, complex scenario fully open to innovative proteomic studies. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 49–77. [CrossRef]
- 40. Haigis, M.C.; Yankner, B.A. The aging stress response. Mol. Cell 2010, 40, 333–344. [CrossRef]
- 41. Castro, J.P.; Ott, C.; Jung, T.; Grune, T.; Almeida, H. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 916–925. [CrossRef] [PubMed]
- Tanase, M.; Urbanska, A.M.; Zolla, V.; Clement, C.C.; Huang, L.; Morozova, K.; Follo, C.; Goldberg, M.; Roda, B.; Reschiglian, P.; et al. Role of Carbonyl Modifications on Aging-Associated Protein Aggregation. *Sci. Rep.* 2016, *6*, 19311. [CrossRef] [PubMed]
- 43. Bhat, S.A.; Bhat, W.F.; Afsar, M.; Khan, M.S.; Al-Bagmi, M.S.; Bano, B. Modification of chickpea cystatin by reactive dicarbonyl species: Glycation, oxidation and aggregation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *650*, 103–115. [CrossRef] [PubMed]
- 44. Karri, S.; Singh, S.; Paripati, A.K.; Marada, A.; Krishnamoorthy, T.; Guruprasad, L.; Balasubramanian, D.; Sepuri, N.B.V. Adaptation of Mge1 to oxidative stress by local unfolding and altered Interaction with mitochondrial Hsp70 and Mxr2. *Mitochondrion* **2018**, *46*, 140–148. [CrossRef] [PubMed]
- 45. Miyata, Y.; Rauch, J.N.; Jinwal, U.K.; Thompson, A.D.; Srinivasan, S.; Dickey, C.A.; Gestwicki, J.E. Cysteine reactivity distinguishes redox sensing by the heat-inducible and constitutive forms of heat shock protein 70. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1391–1399. [CrossRef] [PubMed]
- 46. Rand, J.D.; Grant, C.M. The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 387–401. [CrossRef] [PubMed]
- 47. Weids, A.J.; Grant, C.M. The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 1327–1335. [CrossRef]
- 48. Wickner, R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: Evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. *Science* **1994**, *264*, 566–569. [CrossRef]
- 49. Doronina, V.A.; Staniforth, G.L.; Speldewinde, S.H.; Tuite, M.F.; Grant, C.M. Oxidative stress conditions increase the frequency of de novo formation of the yeast [PSI+] prion. *Mol. Microbiol.* **2015**, *96*, 163–174. [CrossRef]
- 50. Jamar, N.H.; Kritsiligkou, P.; Grant, C.M. The non-stop decay mRNA surveillance pathway is required for oxidative stress tolerance. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 6881–6893. [CrossRef]
- 51. Njomen, E.; Osmulski, P.A.; Jones, C.L.; Gaczynska, M.; Tepe, J.J. Small Molecule Modulation of Proteasome Assembly. *Biochemistry* **2018**, *57*, 4214–4224. [CrossRef] [PubMed]
- 52. Matsui, H.; Ito, H.; Taniguchi, Y.; Inoue, H.; Takeda, S.; Takahashi, R. Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 178–187. [CrossRef] [PubMed]
- 53. Kitajima, Y.; Tashiro, Y.; Suzuki, N.; Warita, H.; Kato, M.; Tateyama, M.; Ando, R.; Izumi, R.; Yamazaki, M.; Abe, M.; et al. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 5204–5217. [CrossRef] [PubMed]
- 54. Wang, R.; Zhao, J.; Zhang, J.; Liu, W.; Zhao, M.; Li, J.; Lv, J.; Li, Y. Effect of lysosomal and ubiquitin-proteasome system dysfunction on the abnormal aggregation of alpha-synuclein in PC12 cells. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *9*, 2088–2094. [CrossRef] [PubMed]
- 55. Kumar, V.; Singh, D.; Singh, B.K.; Singh, S.; Mittra, N.; Jha, R.R.; Patel, D.K.; Singh, C. Alpha-synuclein aggregation, Ubiquitin proteasome system impairment, and L-Dopa response in zinc-induced Parkinsonism: Resemblance to sporadic Parkinson's disease. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *444*, 149–160. [CrossRef] [PubMed]
- 56. Silva, G.M.; Netto, L.E.S.; Simões, V.; Santos, L.F.A.; Gozzo, F.C.; Demasi, M.A.A.; Oliveira, C.L.P.; Bicev, R.N.;
- Klitzke, C.F.; Sogayar, M.C.; et al. Redox Control of 20S Proteasome Gating. *Antioxid. RedoxSignal.***2012**, *16*, 1183–1194. [CrossRef] [PubMed]
- 57. Korovila, I.; Hugo, M.; Castro, J.P.; Weber, D.; Hohn, A.; Grune, T.; Jung, T. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 550–567. [CrossRef]
- 58. Zmijewski, J.W.; Banerjee, S.; Abraham, E. S-glutathionylation of the Rpn2 regulatory subunit inhibits 26 S proteasomal function. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22213–22221. [CrossRef] [PubMed]
- 59. Demasi, M.; Shringarpure, R.; Davies, K.J. Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *389*, 254–263. [CrossRef]
- Silva, G.M.; Netto, L.E.; Discola, K.F.; Piassa-Filho, G.M.; Pimenta, D.C.; Barcena, J.A.; Demasi, M. Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. *FEBS J.* 2008, *275*, 2942–2955. [CrossRef]

- Bridgford, J.L.; Xie, S.C.; Cobbold, S.A.; Pasaje, C.F.A.; Herrmann, S.; Yang, T.; Gillett, D.L.; Dick, L.R.; Ralph, S.A.; Do-govski, C.; et al. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat. Commun.* 2018, *9*, 3801. [CrossRef] [PubMed]
- 62. Nystrom, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1311–1317. [CrossRef] [PubMed]
- 63. Grune, T.; Jung, T.; Merker, K.; Davies, K.J. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2519–2530. [CrossRef] [PubMed]
- 64. Cho, M.-H.; Cho, K.; Kang, H.-J.; Jeon, E.-Y.; Kim, H.-S.; Kwon, H.-J.; Kim, H.-M.; Kim, D.-H.; Yoon, S.-Y. Autophagy in microglia degrades extracellular β-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 2014, *10*, 1761–1775. [CrossRef]
- 65. Caccamo, A.; Ferreira, E.; Branca, C.; Oddo, S. p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy. *Mol. Psychiatry* **2016**, 22, 865. [CrossRef]
- 66. Cuervo, A.M.; Stefanis, L.; Fredenburg, R.; Lansbury, P.T.; Sulzer, D. Impaired Degradation of Mutant α-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* **2004**, *305*, 1292. [CrossRef]
- 67. Ravikumar, B.; Duden, R.; Rubinsztein, D.C. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 1107–1117. [CrossRef]
- 68. Yung, C.; Sha, D.; Li, L.; Chin, L.-S. Parkin Protects Against Misfolded SOD1 Toxicity by Promoting Its Aggresome Formation and Autophagic Clearance. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6270–6287. [CrossRef]
- Bordi, M.; Berg, M.J.; Mohan, P.S.; Peterhoff, C.M.; Alldred, M.J.; Che, S.; Ginsberg, S.D.; Nixon, R.A. Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy* 2016, *12*, 2467–2483. [CrossRef]
- 70. Nixon, R.A.; Yang, D.-S. Autophagy failure in Alzheimer's disease—Locating the primary defect. Neurobiol. Dis. **2011**, *43*, 38–45. [CrossRef]
- 71. Ramirez, A.; Heimbach, A.; Grundemann, J.; Stiller, B.; Hampshire, D.; Cid, L.P.; Goebel, I.; Mubaidin, A.F.; Wriekat, A.L.; Roeper, J.; et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat. Genet.* 2006, *38*, 1184–1191. [CrossRef] [PubMed]
- Zavodszky, E.; Seaman, M.N.; Moreau, K.; Jimenez-Sanchez, M.; Breusegem, S.Y.; Harbour, M.E.; Rubinsztein, D.C. Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat. Commun.* 2014, 5, 3828. [CrossRef] [PubMed]
- 73. Chen, Y.; Liu, H.; Guan, Y.; Wang, Q.; Zhou, F.; Jie, L.; Ju, J.; Pu, L.; Du, H.; Wang, X. The altered autophagy mediated by TFEB in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 1574–1587. [PubMed]
- 74. Levonen, A.L.; Hill, B.G.; Kansanen, E.; Zhang, J.; Darley-Usmar, V.M. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: Implications for electrophile therapeutics. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *71*, 196–207. [CrossRef] [PubMed]
- 75. Scherz-Shouval, R.; Shvets, E.; Fass, E.; Shorer, H.; Gil, L.; Elazar, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1749–1760. [CrossRef] [PubMed]
- Bensaad, K.; Cheung, E.C.; Vousden, K.H. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J.* 2009, *28*, 3015–3026. [CrossRef]
- 77. Chen, Y.; Azad, M.B.; Gibson, S.B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*. **2009**, *16*, 1040. [CrossRef]
- 78. Dodson, M.; Darley-Usmar, V.; Zhang, J. Cellular metabolic and autophagic pathways: Traffic control by redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *63*, 207–221. [CrossRef]
- 79. Lee, J.; Giordano, S.; Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* **2012**, 441, 523–540. [CrossRef]
- Guerrero-Gomez, D.; Mora-Lorca, J.A.; Saenz-Narciso, B.; Naranjo-Galindo, F.J.; Munoz-Lobato, F.; Parrado-Fernandez, C.; Goikolea, J.; Cedazo-Minguez, Á.; Link, C.D.; Neri, C.; et al. Loss of glutathione redox homeostasis impairs proteostasis by inhibiting autophagy-dependent protein degradation. *Cell Death Differ.* 2019. Available online: https://www.nature.com/articles/s41418-018-0270-9 (accessed on 15 February 2019). [CrossRef]
- Civiletto, G.; Dogan, S.A.; Cerutti, R.; Fagiolari, G.; Moggio, M.; Lamperti, C.; Beninca, C.; Viscomi, C.; Zeviani, M. Rapamycin rescues mitochondrial myopathy via coordinated activation of autophagy and lysosomal biogenesis. *EMBO Mol. Med.* 2018, 10, e8799. [CrossRef] [PubMed]
- 82. Richardson, A.; Galvan, V.; Lin, A.-L.; Oddo, S. How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Exp. Gerontol.* **2015**, *68*, 51–58. [CrossRef] [PubMed]
- Zhang, L.; Wang, L.; Wang, R.; Gao, Y.; Che, H.; Pan, Y.; Fu, P. Evaluating the Effectiveness of GTM-1, Rapamycin, and Carbamazepine on Autophagy and Alzheimer Disease. *Med. Sci. Monit.* 2017, *23*, 801–808. [CrossRef] [Pub-Med]
- 84. Thellung, S.; Scoti, B.; Corsaro, A.; Villa, V.; Nizzari, M.; Gagliani, M.C.; Porcile, C.; Russo, C.; Pagano, A.; Tacchetti, C.; et al. Pharmacological activation of autophagy favors the clearing of intracellular aggregates of misfolded prion protein peptide to prevent neuronal death. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 166. [CrossRef] [PubMed]
- Choi, D.H.; Kim, D.H.; Park, Y.G.; Chun, B.G.; Choi, S.H. Protective effects of rilmenidine and AGN 192403 on oxidative cytotoxicity and mitochondrial inhibitor-induced cytotoxicity in astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, *33*, 1321–1333. [CrossRef]
- Perera, N.D.; Sheean, R.K.; Lau, C.L.; Shin, Y.S.; Beart, P.M.; Horne, M.K.; Turner, B.J. Rilmenidine promotes MTOR-independent autophagy in the mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis without slowing disease progression. *Autophagy* 2017, *14*, 534–551. [CrossRef]

- 87. Kim, Y.; Park, J.K.; Seo, J.H.; Ryu, H.S.; Lim, K.S.; Jeong, M.H.; Kang, D.H.; Kang, S.W. A rapamycin derivative, biolimus, preferentially activates autophagy in vascular smooth muscle cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16551. [CrossRef]
- Bossy-Wetzel, E.; Petrilli, A.; Knott, A.B. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 2008, *31*, 609–616. [CrossRef]
- 89. Gruber, A.; Hornburg, D.; Antonin, M.; Krahmer, N.; Collado, J.; Schaffer, M.; Zubaite, G.; Luchtenborg, C.; Sachsenheimer, T.; Brugger, B.; et al. Molecular and structural architecture of polyQ aggregates in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E3446–E3453. [CrossRef]
- 90. Cenini, G.; Rub, C.; Bruderek, M.; Voos, W. Amyloid beta-peptides interfere with mitochondrial preprotein import competence by a coaggregation process. *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27*, 3257–3272. [CrossRef]
- 91. Wang, X.; Becker, K.; Levine, N.; Zhang, M.; Lieberman, A.P.; Moore, D.J.; Ma, J. Pathogenic alpha-synuclein aggregates preferentially bind to mitochondria and affect cellular respiration. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 41. [CrossRef]
- 92. Chaudhary, R.K.; Patel, K.A.; Patel, M.K.; Joshi, R.H.; Roy, I. Inhibition of Aggregation of Mutant Huntingtin by Nucleic Acid Aptamers *In vitro* and in a Yeast Model of Huntington's Disease. *Mol. Ther.* 2015, *23*, 1912–1926. [CrossRef] [PubMed]
- 93. Patel, K.A.; Kolluri, T.; Jain, S.; Roy, I. Designing Aptamers which Respond to Intracellular Oxidative Stress and Inhibit Aggregation of Mutant Huntingtin. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *120*, 311–316. [CrossRef]
- 94. Mattson, M.P.; Goodman, Y. Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. *Brain Res.* **1995**, *676*, 219–224. [CrossRef]
- 95. Lim, Y.A.; Rhein, V.; Baysang, G.; Meier, F.; Poljak, A.; Raftery, M.J.; Guilhaus, M.; Ittner, L.M.; Eckert, A.; Gotz, J. Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. *Proteomics* 2010, *10*, 1621–1633. [CrossRef] [PubMed]
- 96. Singh, S.; Bhowmick, D.C.; Pany, S.; Joe, M.; Zaghlula, N.; Jeremic, A.M. Apoptosis signal regulating kinase-1 and NADPH oxidase mediate human amylin evoked redox stress and apoptosis in pancreatic beta-cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, *1860*, 1721–1733. [CrossRef]
- 97. Abramov, A.Y.; Duchen, M.R. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* **2005**, *360*, 2309–2314. [CrossRef]
- 98. Abeti, R.; Abramov, A.Y.; Duchen, M.R. Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death. *Brain* **2011**, *134*, 1658–1672. [CrossRef]
- 99. Palazzi, L.; Bruzzone, E.; Bisello, G.; Leri, M.; Stefani, M.; Bucciantini, M.; Polverino de Laureto, P. Oleuropein aglycone stabilizes the monomeric alpha-synuclein and favours the growth of non-toxic aggregates. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8337. [CrossRef]
- Baruch-Suchodolsky, R.; Fischer, B. Soluble amyloid beta1-28-copper(I)/copper(II)/Iron(II) complexes are potent antioxidants in cell-free systems. *Biochemistry* 2008, 47, 7796–7806. [CrossRef]
- 101. Baruch-Suchodolsky, R.; Fischer, B. Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4354–4370. [CrossRef] [PubMed]
- **102**. Garzon-Rodriguez, W.; Yatsimirsky, A.K.; Glabe, C.G. Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(II) ions to Alzheimer's A beta peptide studied by fluorescence. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2243–2248. [CrossRef]
- 103. Khan, A.; Dobson, J.P.; Exley, C. Redox cycling of iron by Abeta42. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 557–569. [CrossRef] [PubMed]
- 104. Yang, E.Y.; Guo-Ross, S.X.; Bondy, S.C. The stabilization of ferrous iron by a toxic beta-amyloid fragment and by an aluminum salt. *Brain Res.* **1999**, *839*, 221–226. [CrossRef]
- 105. Carija, A.; Navarro, S.; de Groot, N.S.; Ventura, S. Protein aggregation into insoluble deposits protects from oxidative stress. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 699–711. [CrossRef] [PubMed]
- 106. Sanchez de Groot, N.; Gomes, R.A.; Villar-Pique, A.; Babu, M.M.; Coelho, A.V.; Ventura, S. Proteome response at the edge of protein aggregation. *Open Biol.* **2015**, *5*, 140221. [CrossRef] [PubMed]
- 107. Sideri, T.C.; Stojanovski, K.; Tuite, M.F.; Grant, C.M. Ribosome-associated peroxiredoxins suppress oxidative stress-induced de novo formation of the [PSI+] prion in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6394–6399. [CrossRef] [PubMed]
- Cali, T.; Ottolini, D.; Negro, A.; Brini, M. alpha-Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* 2012, *287*, 17914–17929. [CrossRef] [PubMed]
- 109. Guardia-Laguarta, C.; Area-Gomez, E.; Rub, C.; Liu, Y.; Magrane, J.; Becker, D.; Voos, W.; Schon, E.A.; Przedborski, S. alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 249–259. [CrossRef]
- 110. Paillusson, S.; Gomez-Suaga, P.; Stoica, R.; Little, D.; Gissen, P.; Devine, M.J.; Noble, W.; Hanger, D.P.; Miller, C.C.J. Alpha-Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca(2+) homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta Neuropathol.* 2017, 134, 129–149. [CrossRef]
- 111. Pozo Devoto, V.M.; Dimopoulos, N.; Alloatti, M.; Pardi, M.B.; Saez, T.M.; Otero, M.G.; Cromberg, L.E.; Marín-Burgin, A.; Scassa, M.E.; Stokin, G.B.; et al. αSynuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5042. [CrossRef] [PubMed]
- 112. Tabner, B.J.; El-Agnaf, O.M.; German, M.J.; Fullwood, N.J.; Allsop, D. Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1082–1086. [CrossRef] [PubMed]
- 113. Zhu, C.; Beck, M.V.; Griffith, J.D.; Deshmukh, M.; Dokholyan, N.V. Large SOD1 aggregates, unlike trimeric SOD1, do not impact cell viability in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018, 115, 4661–4665. [CrossRef] [Pub-Med]
- 114. Farrawell, N.E.; Lambert-Smith, I.; Mitchell, K.; McKenna, J.; McAlary, L.; Ciryam, P.; Vine, K.L.; Saunders, D.N.; Yerbury, J.J. SOD1(A4V) aggregation alters ubiquitin homeostasis in a cell model of ALS. *J. Cell Sci.* 2018, 131, jcs209122. [CrossRef] [PubMed]

- 115. D'Amico, E.; Factor-Litvak, P.; Santella, R.M.; Mitsumoto, H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, *65*, 509–527. [CrossRef]
- 116. Petrov, D.; Daura, X.; Zagrovic, B. Effect of Oxidative Damage on the Stability and Dimerization of Superoxide Dismutase 1. *Biophys. J.* **2016**, *110*, 1499–1509. [CrossRef] [PubMed]
- 117. Dedeoglu, A.; Cormier, K.; Payton, S.; Tseitlin, K.A.; Kremsky, J.N.; Lai, L.; Li, X.; Moir, R.D.; Tanzi, R.E.; Bush, A.I.; et al. Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. *Exp. Gerontol.* 2004, *39*, 1641–1649. [CrossRef]
- 118. Sharma, A.K.; Pavlova, S.T.; Kim, J.; Finkelstein, D.; Hawco, N.J.; Rath, N.P.; Kim, J.; Mirica, L.M. Bifunctional
- CompoundsforControllingMetal-MediatedAggregationoftheAβ42Peptide. *J.Am. Chem. Soc.***2012**, *134*, 6625–6636. [CrossRef]
- 119. Rajasekhar, K.; Mehta, K.; Govindaraju, T. Hybrid Multifunctional Modulators Inhibit Multifaceted Abeta Toxicity and Prevent Mitochondrial Damage. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 1432–1440. [CrossRef]
- 120. Hilt, S.; Altman, R.; Kalai, T.; Maezawa, I.; Gong, Q.; Wachsmann-Hogiu, S.; Jin, L.W.; Voss, J.C. A Bifunctional
- Anti-Amyloid Blocks Oxidative Stress and the Accumulation of Intraneuronal Amyloid-Beta. Molecules 2018,

23, 2010. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

# 6.2. Article soumis pour publication au *journal of Biological Chemistry*

# Aβ<sub>1-40</sub> binding to Prion protein promotes PrP oligomerization and induces structural changes of PrP globular domain

Katarina Grznarova<sup>1,2,#</sup>, Elise Levy<sup>1</sup>, Angélique Igel-Egalon<sup>1</sup>, Laurence Vernis<sup>3</sup>, Joan Torrent<sup>1,‡</sup>,

Christelle Jas<sup>1,†</sup>, Carola Munoz-Montesino<sup>1,§</sup>, Vincent Beringue<sup>1</sup>, Jean-Philippe Deslys<sup>2</sup>, Davy Martin<sup>1\*</sup> and Human Rezaei<sup>1\*</sup>

 <sup>1</sup> - Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France
<sup>2</sup> - CEA - Université Paris-Saclay, NeuroPrion - SEPIA, 92265, Fontenay-aux-Roses, France
<sup>3</sup> -Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France

Present addresses :

 \* - Sorbonne Université, Inserm, CNRS UMR 7225, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, 47, blvd de l'Hôpital, 75013, Paris, France
\* - MMDN, Univ. Montpellier, EPHE, Inserm, U1198, 34095, Montpellier, France
\* - Pathogenesis and Control of Chronic Infections, EFS, Inserm, Univ. Montpellier, 34000, Montpellier, France
\* - Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepcíon, Barrio Universitario s/n, PO Box 160C, Concepcíon, Chile

> \*Corresponding authors: Davy Martin and Human Rezaei E-mails: <u>davy.martin@inrae.fr</u>, <u>human.rezaei@inrae.fr</u> Tel: +33 1 34 65 26 41

Postal address: Virologie et Immunologie Moléculaires, INRAE, Domaine de Vilvert, 78352, Jouy-en-Josas cedex, France

# **Running title:** $A\beta_{1-40}$ induces PrP oligomerization and structural changes

**Keywords:** Alzheimer's disease, prion, structural dynamics, oligomerization, protein-protein interaction

#### Abstract

Normal prion protein (PrP<sup>C</sup>) has been reported to interact with specific conformers of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) assemblies and plays an important role in their neurotoxicity during Alzheimer's disease (AD) progression. Even if  $PrP^{C}$  may not affect either the A $\beta$  plaque amount or the astrogliosis associated with AD evolution in transgenic mice, it intervenes in the behaviour impairment and cognitive deficits mediated by a physical interaction between  $PrP^{C}$  and A $\beta$ . The effect of this interaction has extensively been explored in AD context, but little is known about the consequences of this interaction on PrP and how this interaction affects the structural dynamics of PrP in order to mediate a signal transduction. In the present work, we explored the effect of the interaction between PrP and the most abundant Aβ peptide  $(A\beta_{1-40})$  on the dynamics of PrP oligomerization process. We show that the three PrP sites involved in A $\beta_{1-40}$  binding display different affinities. Furthermore, we demonstrate that sites 1 and 2 located in PrP N-terminal region inhibit PrP oligomerization while  $A\beta_{1-40}$  binding to these two sites abolishes this autoinhibition. Aβ binding to site 3 located in PrP globular domain induces a structural rearrangement of PrP and promotes its oligomerization. These molecular findings identify a structural pathway through which  $A\beta_{1-40}$  affects PrP oligomerization, and indicate that  $A\beta_{1-40}$  acts as an allosteric effector. These results provide new insights into the mechanisms of the physiologically relevant PrP:A $\beta_{1-40}$  interaction as well as key structural changes that may be involved in PrP-mediated signal transduction.

#### Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurological disorder associated with severe atrophy of the cerebral cortex and an irreversible loss of cortical neurons (for an overview, see (1)). While the early-onset form of the disease is mostly associated with mutations in different genes involved in the processing of amyloid precursor protein APP (APP, Presenilin-1, Presenilin-2), late-onset AD is related to impaired biological processes driven by a complex interplay between genetic and environmental factors that becomes visible with aging (Apolipoprotein E, gender, oxidative stress, energy metabolism, protein homeostasis...) (for reviews, see (2–6)). AD is mainly characterised by the harmful accumulation of amyloid-ß peptide  $(A\beta)$  plaques (7) and neurofibrillary tangles of phosphorylated tau protein. The major constituent of the plaques, the A $\beta$  peptide, is composed of 39 to 43 amino acids (8) and is a product of the cleavage of the transmembrane amyloid precursor protein (APP) by the  $\beta$ - and ysecretases (for an overview, see (9)). Two  $A\beta$ species are predominantly formed and have been identified as the main neurotoxic species:  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$ . Recent investigations highlight that a structural polymorphism of A<sup>β</sup> assemblies correlates with phenotype variations in AD patients, allowing to hypothesize the existence of strains in AD (10–12).

Whereas the association of A $\beta$  peptide accumulation with brain injury is clear, the molecular mechanisms of cell toxicity remain uncertain. The debate is mainly focused on the potential toxicity of the A $\beta$  fibrils and oligomers and whether a single type of assemblies or multiple ones are toxic. More than 20 years ago, the amyloid hypothesis of AD stipulated that A $\beta$  fibril assemblies are the primary toxic species (13). Recent convergent observations support a role of A $\beta$  oligomers in the cytotoxic process, at least in the early stage of AD (14).

Evidence supporting a relationship between AD and  $PrP^{C}$  is increasing. In a study seeking to identify the cellular receptor that may mediate A $\beta$ -oligomer toxicity in AD,  $PrP^{C}$  was identified as a unique protein with relevant affinity

for Aβ oligomers (15). In the same study, monomeric A<sub>β1-42</sub> exhibited an avidity 2.5-fold weaker than that of A $\beta_{1-42}$  oligomers composed of ~50-100 protomers. The colocalization of PrP and Aβ in animals, cellular models and AD patient brains has also been well documented (16–19). Moreover PrP<sup>C</sup> has been shown to play a role in the regulation of A $\beta$  production as an inhibitor of  $\beta$ -secretase involved in APP cleavage (20). The colocalization of large assemblies of A $\beta$  and PrP or the co-occurrence of AD and Creutzfeldt-Jakob disease (the most common human prion disease) in the same patient has also recently been reported (21). Moreover, the literature reports that at cellular scale the AB:PrP interaction has for consequences the clusterization of PrP<sup>C</sup> at the cell membrane and the activation of Fyn, a Src Family Kinase via caveolin in lipid rafts (16, 22-25). This results in the activation of different cell pathways like ERK1/2 and in the synaptotoxicity of A $\beta_{1-42}$  oligomers.

Specific antibodies that interfere with the PrP:A $\beta$  interaction (15, 26–28) or the use of truncated PrP constructs (16, 26, 29) have revealed that the two main interaction sites are located in the unstructured N-terminal tail of PrP. The first site is located in the polybasic region (residues 23-27 in the human protein (30), corresponding to residues 25-29 in the ovine protein), and the second site is located between residues 90 and 110 in the human protein (residues 93-113 in the ovine protein). The globular domain of PrP may also be a binding site for Aβ, since an antibody against the H1 helix of PrP blocks Aβ binding and prevents long-term potentiation (LTP) impairment (27). Moreover, peptide membrane array experiments have suggested that the H1, H2 and H3 helices of PrP intervene in the interaction with A $\beta_{1-42}$  oligomers (19, 27, 30). Centred now on A $\beta$  peptides, the interaction domain with PrP is far from being identified. Owing to the short

length of A $\beta$  peptide, it is unlikely that PrP recognizes a specific A $\beta$  conformation but rather a charged stretch (31).

Although interactions between different aggregated conformers of  $A\beta_{1-42}$  peptides and PrP have been established, few studies have reported the molecular basis of the monomeric  $A\beta$ :PrP interaction and the consequence of this interaction on the folding landscape of the respective partners. The absence of such studies is mainly due to the fact that most of the studies considered the interaction between PrP<sup>C</sup> and  $A\beta$  peptide in the pathological situation and therefore considered the interaction between  $A\beta_{1-42}$  assemblies and PrP<sup>C</sup>. Furthermore, the high propensity of  $A\beta_{1-42}$  to aggerate render the exploration of monomeric  $A\beta_{1-42}$  with PrP<sup>C</sup> difficult and unprecise.

The AB:PrP interaction should affect the conformational dynamics of both partners, but most studies have explored the effect of the  $A\beta_{1-42}$ : PrP interaction on  $A\beta_{1-42}$  aggregation (32–34). Whereas these studies have suggested that the propensity of  $A\beta_{1-42}$  to form amyloid assemblies is reduced in the presence of monomeric PrP, little is known about the effect of the most abundant A $\beta$  peptides (35) present in healthy brain (A $\beta_{1-40}$ ) on PrP structural dynamics and polymerization. PrP is indeed able to oligomerize and its C-terminal globular domain is deeply involved in this process. Moreover, PrP N-terminal flexible region has been reported to interact with the C-terminal domain inhibiting PrP oligomerization (36–40). These inter-domain interactions also appear as a key element in the regulation exerted by the C-terminal globular domain on the membrane receptor activation processes performed by the Nterminal region (37, 38, 41, 42). In the present work, we investigated out of AD and prion disease contexts the consequence of the  $A\beta_{1-40}$ : PrP interaction on the oligomerization process of monomeric PrP at neutral pH, which is auto-inhibited through the interactions of regions 25-103 and 103-124 with PrP globular domain (residues 124-234) as described above. Using different truncated PrP constructs, we report the first exploration of the contribution of each A $\beta$  binding site to PrP oligomerization. We observed that each site exhibits a different A $\beta_{1-40}$  binding affinity. A $\beta_{1-40}$  binding to site 2 (PrP region 103124) abolishes the auto-inhibition of PrP oligomerization. Moreover, upon A $\beta_{1-40}$  binding to site 3 (PrP region 124-234) we observed a conformational shift of PrP and an enhancement of PrP oligomerization. A $\beta_{1-40}$ acts as an allosteric effector that affects the conformational dynamics of PrP.

### Results

# Monomeric $A\beta_{1-40}$ binds to PrP expressing cells.

Previous studies reported the interaction between PrP<sup>C</sup> and oligomeric Aβ assemblies as responsible for signal transduction inducing cell death. To determine if monomeric  $A\beta_{1-40}$ could induce a rearrangement of PrP<sup>C</sup> at the cell surface membrane, we purified monomeric A $\beta_{1-40}$  (Figure 1) and RK13 cells expressing or not ovine PrP (PrP<sup>+</sup> and PrP<sup>-</sup> respectively) were incubated with monomeric  $A\beta_{1-40}$  (0 or 50  $\mu$ M). After A $\beta_{1-40}$  and PrP immunolabeling, cells were imaged using a confocal microscope (Figures 2A and S1). As observed and pointed by arrows,  $A\beta_{1-40}$  and PrP colocalize in some spots (Figures 2A, S1 panels B and C), suggesting a potential interaction between these two molecules. Furthermore, the size of PrP<sup>C</sup> spots significantly (P value < 0.05) increases in presence of  $A\beta_{1-40}$  (Figure 2B) suggesting a reorganization of PrP<sup>C</sup> molecules at the surface of the cell membrane compatible with a PrP<sup>C</sup> oligomerization induced by  $A\beta_{1-40}$  peptide. We also noticed that the size of  $A\beta_{1-40}$  spots decreased in presence of  $PrP^{C}$  (Figure 2C), suggesting that  $PrP^{C}$  inhibits  $A\beta_{1-40}$  aggregation as observed for  $A\beta_{1-42}$  (32).

# Monomeric A $\beta_{1-40}$ binds to PrP with different affinities according to the binding site and induces PrP aggregation.

To determine how  $A\beta_{1-40}$  can induce PrP oligomerization, we first determined the affinity of monomeric A $\beta_{1-40}$  for the three binding sites previously described for A $\beta_{1-42}$  assemblies (15, 17, 26–29) (Figure 3A). To perform in solution measurements and to circumvent the drawbacks of protein immobilization on surfaces (26, 27, 29, 30, 43), we tried a microscale thermophoresis approach. The different PrP constructs (full-length PrP, PrP 25-124, PrP 103-234, PrP 124-234 and PrP ∆103-124) (Figure 3B), whose correct folding was checked using circular dichroism (Figure S2) were fluorescently labelled and a fix amount of these labelled constructs was incubated with increasing amounts of A $\beta_{1-40}$  pior analysis. The bumpy thermophoresis traces indicate the formation of PrP aggregates upon the addition of  $A\beta_{1-40}$  to the solution (Figure S3 shows thermophoresis traces observed with PrP 103-234 as an example), preventing the use of canonical thermophoresis data treatment to extract  $A\beta_{1-40}$ :PrP binding parameters. However, like with a standard fluorimeter, the variation of the initial fluorescence intensity due to the fluorophore environment modification upon A $\beta_{1-40}$  binding can be used to estimate the  $A\beta_{1-40}$ : PrP binding parameters (as described by the manufacturer in its manual and application notes) (Figure 3C and Table 1). With PrP 124-234 which contains site 3, a single binding event associated to a large fluorescence increase was observed (Figure 3C, dark blue curve) with a low affinity (Kd around 14 µM). With PrP 103-234 (purple curve), which contains sites 2 and 3, a larger fluorescence increase was observed and the shape of the curve reveals two binding events, one with a low affinity (Kd around 23 µM) and one with a high affinity (Kd around 0.6  $\mu$ M) (Figure S4). From the experiments with these two constructs, we conclude that site 3 is the low affinity binding site and that site 2 is the high affinity binding one. With full-length PrP (black curve), two binding events could also be detected, one with a high affinity (Kd around  $0.7 \mu$ M) and a second with a low affinity (Kd above 100 µM). With the PrP construct 25-124 (light blue curve) which contains sites 1 and 2, two binding sites similar to full-length PrP were identified: a high affinity binding site (Kd around 82 nM) corresponding to site 2 and a low one (Kd above 100 µM) corresponding to site 1. Overall, these observations highlight that (i) the N-terminal part of PrP, i.e. the 25-103 region that contains site 1, poorly binds A $\beta_{1-40}$ , (ii) the N-terminal part of PrP inhibits A $\beta_{1-40}$  binding to the 124-234 region (site 3), implying that the N- and C-termini are structurally close and in interaction. In addition, we observed a single binding event with an increased Kd around 32  $\mu$ M with PrP  $\Delta$ 103-124 (green curve) which contains sites 1 and 3. We thus conclude that PrP region 25-103 requires the region 103-124 to fully inhibit  $A\beta_{1-40}$  binding to the 124-234 region of PrP, i.e. the region 103-124 is required to allow the interaction between the N- and C-termini of PrP. Moreover, the absence of the high affinity binding with PrP  $\Delta 103-124$  confirms that site 2, i.e. the 103124 region is the high affinity binding site. The difference in Kds observed for site 2 between full-length PrP, PrP 25-124 and PrP 103-234 underlines that the 124-234 region of PrP modulates by 10-fold the affinity of A $\beta_{1-40}$  to the 103-124 binding site (site 2).

It is worth noting that we observed a large increase of fluorescence when  $A\beta_{1-40}$  is bound the 124-234 region of PrP, implying a major change in the fluorophore environment. Since this binding site lies within the globular do-

main of PrP, these data suggest that the C-terminal part of PrP is rearranged when  $A\beta_{1-40}$  is bound to this PrP region. Altogether these experiments confirmed the presence of three  $A\beta_{1-40}$  binding sites along the PrP sequence (Figure 3A). They present a broad affinity range (from high to very low) which is modulated by neighbouring PrP regions, i.e. site 1 inhibits site 3 and site 3 modulates site 2. We also conclude that (i) the C-terminal part of PrP is in close contact to  $A\beta$  binding sites 1 and 2, (ii) PrP C-terminus is structurally rearranged when  $A\beta_{1-40}$  is bound to PrP and (iii)  $A\beta_{1-40}$  induces the aggregation of PrP.

# Monomeric $A\beta_{1-40}$ enhances PrP oligometrization.

As previously observed, both *ex vivo* and on the thermophoresis traces (Figure S3),  $A\beta_{1-40}$ induces PrP aggregation. To further elucidate the consequences of the PrP:A $\beta_{1-40}$  interaction on PrP oligomerization, we monitored PrP oligomerization in the presence of different concentrations of A $\beta_{1-40}$  peptide using a light scattering device. Figure 4A shows the scattered light intensity as a function of time with different A $\beta_{1-40}$  concentrations. This intensity is related to the weighted average molecular weight of the assemblies. In our experimental conditions, no aggregation was detected for either PrP alone (Figure 4A, blue curve) or A $\beta_{1-40}$ alone, even at the highest tested concentration (5 µM, see Figure S5). However, when PrP and  $A\beta_{1-40}$  were mixed, the scattered light intensity increased, thus highlighting PrP oligomerization. Furthermore, the scattered intensity after 15 min exponentially increased as a function of  $A\beta_{1-40}$  concentration (Figure 4B), suggesting a cooperative effect of Aβ<sub>1-40</sub> on PrP oligomerization rate. These observations are in accordance with our previous results, that  $A\beta_{1-40}$  significantly enhances PrP oligomerization process.

### Aβ<sub>1-40</sub>:PrP interaction induces a PrP conformational rearrangement.

The MST experiments show that monomeric A $\beta_{1-40}$  binds to three different regions of PrP (Figure 3). These interactions induce PrP oligomerization as shown by RK13 cells expressing  $PrP^{C}$  and exposed to monomeric  $A\beta_{1-40}$ (Figure 2), by thermophoresis (Figure S3) and by static light scattering measurement (Figure 4). To determine the propensity of different binding sites to affect PrP oligomerization we compared the oligomerization process of different PrP constructs (Figures 3B and 5) in the presence (5  $\mu$ M) and absence of A $\beta_{1-40}$  using time resolved static light scattering. As shown in Figure 5 in the absence of  $A\beta_{1-40}$  (black curves), the light scattered intensity measured at the plateau is 10-fold higher for PrP 124-234 than for full-length PrP. This observation indicates a higher intrinsic propensity of 124-234 PrP construct to oligomerize (Figure 5A and B, black curves). Similarly, the two deletions 25-102 (PrP construct 103-234) and 103-124 (PrP construct D103-124) increase the propensity of PrP to oligomerize (respectively Figure 5 D and E), however with a much lower effect than the one observed with the 25-123 deletion. These observations reveal that (i) PrP N-terminal region (25-123) acts as an inhibitor domain reducing the intrinsic propensity of the globular domain (PrP 124-234) to oligomerize, (ii) PrP segments corresponding to sites 1 and 2 synergistically contribute to the oligomerization inhibition mediated by the N-terminal region.

In the presence of  $A\beta_{1-40}$  the oligomerization propensity of full-length PrP is considerably enhanced as judged by the comparison between the amplitude of the SLS signal intensity in the absence or in the presence of  $A\beta_{1-40}$  (Figure 5A, black and red curves respectively). A similar phenomenon is observed for PrP 103-234 (Figure 5D). Indeed, the presence of  $A\beta_{1-40}$  considerably enhances the oligomerization propensity of PrP 103-234. The enhancing effect of A $\beta_{1-40}$  on PrP 124-234 and PrP  $\Delta$ 103-124 oligomerization is effective yet moderate compared to full-length PrP and PrP 103-234 (Figure 5B and E). In contrast with these last constructs, A $\beta_{1-40}$  did not significantly affect the oligomerization propensity of PrP 167-234 (Figure 5C). Moreover, according to the SLS signal A $\beta_{1-40}$  did not induce any oligomerization of PrP 25-124 (Figure 5F) even if MST experiments revealed the existence of two A $\beta_{1-40}$ binding sites located in this construct.

Considering that the N-terminal region acts as an inhibitor domain by reducing the intrinsic propensity of the globular domain 124-234 to oligomerize and that  $A\beta_{1-40}$  enhances the oligomerization of different PrP constructs, we can conclude that  $A\beta_{1-40}$  binding to the 25-124 segment decreases the oligomerization inhibitory effect of the N-terminal region. Furthermore, by comparing the oligomerization propensity of PrP 124-234 and PrP 103-234 in the presence of  $A\beta_{1-40}$  we can conclude that segment 103-123 plays an important role in the modulation of PrP oligomerization process mediated by  $A\beta_{1-40}$ .

# Aβ<sub>1-40</sub> induces an increase in the size of PrP assemblies.

The time resolved light scattering experiments demonstrate that the interaction between  $A\beta_{1-40}$  and PrP increases the propensity of PrP to oligomerize. However, these experiments do not allow to determine if this increase is related to a higher oligomerization rate i.e. a larger amount of oligomers or to an increase of the size of the assemblies. To determine how  $A\beta_{1-40}$  affects the formation rate and the size of PrP assemblies, the effect of  $A\beta_{1-40}$  on the oligomerization of full-length PrP and PrP 103-234 was explored by size exclusion chromatography (SEC) coupled to static light scattering

(Figure 6). In the absence of  $A\beta_{1-40}$  the chromatogram of full-length PrP and PrP 103-234 revealed the existence of two main peaks corresponding to oligomeric PrP assemblies and monomeric PrP respectively (Figure 6A and B, black curves). Moreover, as shown by SLS measurements (Figure 6A and B, blue open circles), in the absence of  $A\beta_{1-40}$  the average size of the oligomers formed by full-length PrP is significantly lower than for PrP 103-234 (0.7 MDa and 1.2 MDa respectively). This observation highlights the role of the N-terminal region in the quaternary structure rearrangement during PrP oligomerization.

For both PrP constructs in the presence of A $\beta_{1-40}$  the chromatogram peaks corresponding to the oligomer elution volume were shifted toward a lower elution volume indicating an increase in the size of PrP assemblies (Figure 6A and B, red curves). It should be noted that the contribution of  $A\beta_{1-40}$  signal to the chromatogram is neglectable due to its low molar attenuation coefficient at 280 nm compared to the PrP one ( $\epsilon^{A\beta}$ = 1490 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and  $\epsilon^{PrP}$  = 59485 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). The molecular weight determination using light scattering coupled to SEC, confirmed the increase of PrP assembly size in the presence of  $A\beta_{1-40}$  for both constructs (Figure 6A and B, orange open circles). These observations suggest that for full-length PrP as well as for PrP 103-234 the presence of  $A\beta_{1-40}$  induces the formation of larger assemblies. The formation of larger oligomers in the presence of A $\beta_{1-40}$  is associated with a higher monomer transformation for full-length PrP. This is not the case with PrP 103-234. For full-length PrP the peak surface corresponding to the monomer is lower in the presence of  $A\beta_{1-40}$  whereas for PrP 103234 the peak surface corresponding to the monomer is quasi-identic in the presence or absence of A $\beta_{1-40}$  (Figure 6B). We can thus conclude that in the case of PrP 103-234 A $\beta_{1-40}$ did not affect the monomer to oligomer transformation rate but rather the condensation rate of oligomers. This hypothesis is further supported by transmission electron microscopy analysis of PrP 103-234, which revealed larger worm-like objects in the presence of A $\beta_{1-40}$  than in its absence (Figure 6C and D). We thus conclude from these experiments that A $\beta_{1-40}$  does not solely increase PrP oligomerization rate but also increases the size of the oligomers.

#### Aβ<sub>1-40</sub> does not affect PrP oligomer stability.

Our experiments showed that  $A\beta_{1-40}$  binds three different segments of PrP and modulates PrP oligomerization process. The increase of PrP oligomerization propensity due to  $A\beta_{1-40}$ binding could be the consequence of either a stabilisation of a transient intermediate during oligomer formation or a direct stabilisation of PrP oligomers. Both phenomena would displace the equilibrium towards the oligomer formation (Figure 7A). To discriminate between these two possibilities, we produced and purified PrP oligomers at pH 7.2 (Figure 7B, (44)). This oligomer presents the same elution volume as the one observed in presence of A $\beta_{1-40}$ with PrP 25-234 (Figure 6A, red curve). We next monitored the oligomer depolymerization by recording the static light scattering signal as a function of temperature in the presence or absence of  $A\beta_{1-40}$ . As shown in Figure 7C, the presence of A $\beta_{1-40}$  did not modify the oligomer stability. This observation highlights that the Aβ<sub>1-40</sub> does not enhance full-length PrP oligomerization process through oligomer stabilisation and consequently suggests that  $A\beta_{1-40}$  affect the formation of transient folding or unfolding intermediates prior to PrP oligomer formation.

#### Discussion

A $\beta$ :PrP<sup>C</sup> interaction has extensively been explored in the context of AD (32–34). Indeed, the consequence of A $\beta$  oligomer interaction

with PrP<sup>C</sup> has been reported to induce the formation of PrP<sup>C</sup> clusters at the cell membrane and to activate different pathways like the caveolin-mediated Fyn kinase cascade and ERK1/2 (16, 22–25) conducing to apoptosis and the neurotoxicity of A $\beta_{1-42}$  assemblies (45– 47). On the other hand, little is known about the consequences of PrP:Aβ binding on PrP structural dynamics. In the present study, we thus studied the influence of the major A $\beta$  peptide  $(A\beta_{1-40})$  produced by specific APP cleavages in healthy brain (43, 48) on PrP structural dynamics through its oligomerization process. We show that monomeric  $A\beta_{1-40}$  binds to 3 different PrP regions with different affinities. These interactions modulate the oligomerization of PrP and its structure. This process is thus likely to have biological consequences like the formation of  $PrP^{\breve{C}}$  clusters at the cell surface membrane and the transduction of a cellular signal.

Using different PrP constructs with specific deletions, we estimated the affinity of monomeric A $\beta_{1-40}$  for three different binding sites. Two of these sites are located in the disordered PrP Nterminal region (residues 25-123) and a third one is located in the globular domain (124-234). Site 1 (residues 25-29) corresponding to the polybasic region has been described in the literature as a high affinity binding site for  $A\beta_{1-}$ 42 oligomers (29, 30). However, our experiments highlight that A $\beta$  binding site 1 presents a low affinity for monomeric A $\beta_{1-40}$  with a Kd above 100 µM. This result is very likely to be in agreement with the absence of binding of monomeric Ab<sub>1-42</sub> to a PrP N-terminal fragment reported by Fluharty et al. (29). Indeed, in their construct, only Site 1 is likely to be accessible, since Site 2 is directly linked to the Cmyc epitope bound by the anti-myc antiboby. The use of detergent may have weakened the interaction and prevented them to detect the interaction. Site 2 located within residues 103-124 presents the highest affinity for  $A\beta_{1-40}$  even if this affinity is modulated by PrP globular domain. Indeed, in the absence of the globular domain (124-234) the Kd of site 2 has been estimated around 82 nM and around 600 to 700 nM in the presence of the 124-234 region. The third site of A $\beta$  binding is located within the globular domain with an estimated Kd ranging between 14 to 23  $\mu$ M depending on the presence of the 103-124 region. The fact that site 2 and site 3 affect their respective Kd constitutes a hallmark of a folding-linkage between region 103-124 and the globular domain. This mutual interference constitutes the base for an allosteric linkage between site 2 and site 3.

The oligomerization experiments performed in the absence of  $A\beta$  demonstrates that even the disordered PrP N-terminal segment (23-124) affects the dynamics of the globular domain and per se PrP oligomerization. The comparison of the oligomerization propensity of fulllength PrP and PrP 124-234 construct revealed that the 23-124 segment inhibits the oligomerization process. The Poisson-Boltzmann electrostatic density calculation for full-length PrP highlights the existence of highly localized positive charge densities on A<sup>β</sup> binding sites 1 and 2 and negative charges in the globular domain (Figure 8). Thus, segment 25-124 is likely to act as an oligomerization inhibitor region through intramolecular electrostatic interactions with the C-terminal globular domain (Figure 9A). The oligomerization enhancement induced by A $\beta$  binding to sites 1 and 2 can hence be due to charge neutralization and the disruption of PrP intramolecular interactions. Indeed A $\beta_{1-40}$  has an isoelectric point below 7, meaning that at neutral pH it is mainly negatively charged and its binding to sites 1 and 2 should significantly contribute to charge neutralization. According to this mechanism Aß supresses PrP oligomerization auto-inhibition and induces PrP oligomerization (Figure 9B and C).

The interaction of  $A\beta_{1-40}$  with PrP construct 124-234 revealed that the binding of  $A\beta$  to site

3 significantly enhanced the oligomerization process. The visualisation of the 3D-structure of PrP and its Poisson-Boltzmann electrostatic charge density (Figure 8) revealed that positively charged residues between H1 and S2 are spatially close to positively charged residues located at the second half of H2. Basic residues between S1 and H1 are also spatially close to basic residues on H3. The PrP oligomerization enhancement through AB binding to site 3 could therefore occur by an intercalation within these positively charged residues. Since site 3 involves different PrP segments of the globular domain, its interaction with A<sub>β</sub> could have for consequence a partial unfolding of PrP globular domain and S1H1S2 domain expansion from H2H3 in order to enable Aβ access to the positive charges.

This domain expansion has already been reported to be required for PrP oligomerization ignition (49). Consequently, the interaction of A $\beta$  with the globular domain 124-234 (site 3) has an oligomerization enhancer effect by inducing a partial unfolding in the 124-234 region (Figure 9C).

The *ex vivo* experiments presented in this work clearly demonstrate that out of a neuron context monomeric  $A\beta_{1-40}$  is able to directly modulate PrP<sup>C</sup> conformational dynamics and PrP<sup>C</sup> oligomerization. This observation underlines that the formation of PrP clusters ex vivo is inherent to  $A\beta_{1-40}$ : PrP interaction. Moreover, the presence of Aβ<sub>1-40</sub> gave rise to larger immunostained spots of PrP<sup>C</sup>, some of them colocalizing with  $A\beta_{1-40}$  as shown in Figures 2 and S1. The formation of PrP clusters at the cell surface is compatible with the formation of PrP oligomers. Like for many cell membrane receptors, PrP oligomerization and structural shifts are essential to adopt an active conformation and trigger its mediated signal transduction (for review (50)). Moreover, through its three  $A\beta$ binding sites with different affinities, PrP<sup>C</sup> appears capable of sensing various AB concentrations as well as conformations. The modification of PrP structural landscape may also be modulated by various antagonist ligands, such as Shadoo and Acetylcholine esterase (31, 51). Hence, the disordered N-terminal region of PrP appears as a platform for the binding of different types of ligands what provides another layer of complexity. The nature of the ligand is likely to determine the type of signal transduced into the cell. All this illustrates how PrPmediated signal transduction is finely tuned.

### **Experimental procedures**

#### Preparation of recombinant Aβ<sub>1-40</sub> peptide.

Human A $\beta_{1-40}$  peptide in the PetSac vector was expressed in *Escherichia coli* and produced as previously described (52). Briefly, inclusion bodies prepared from 1.5 L of bacterial culture were solubilised in 10 mL of solubilisation buffer 1 (8 M urea, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8.0) and purified using DEAEcellulose ion-exchange chromatography and stepwise elution with 10 mL of elution buffer 2 (25 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) with increasing NaCl concentrations (0, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 and 500 mM). The eluted samples were analysed by SDS-PAGE and pooled according to their purity. A $\beta_{1-40}$  solutions were clarified by ultracentrifugation (100,000 g for 1.5 h), and the supernatants and pellets were analysed by SDS-PAGE. Buffer exchange was performed using dialysis membranes (SnakeSkin®Dialysis Tubing, Thermo Scientific) at 4°C against 18.2 MQ filtered water in a volume at least 100-fold greater than the sample volume that was changed 3 times. The samples were then concentrated by freezedrying and then solubilised in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich), dried under nitrogen flow and solubilised in elution buffer 3 (6 M urea, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl pH 8.0). Highly

pure A $\beta_{1-40}$  peptides were obtained by gel filtration using Superdex columns (S200, 10/300 mm, GE Healthcare) and an ÄKTA purifier (GE Healthcare). Highly pure A $\beta_{1-40}$  fractions were pooled and dialysed against 18.2 $\Omega$  water in a volume at least 1000-fold greater than the sample volume using Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes with a MWCO of 3,500 (Thermo Scientific). The dialysis step was repeated three times, and the highly pure recombinant A $\beta_{1-40}$ fractions were freeze-dried.

# Preparation of recombinant $A\beta_{1-40}$ monomers.

Highly pure recombinant  $A\beta_{1-40}$  was solubilised in HFIP at 4°C until the white opaque solution became clear and uncoloured (from 3 h to 2 days, depending on the peptide concentration). After brief sonication followed by centrifugation (Micro 22R, Hettich) at 4000 g for 20 min, the concentration of the solubilised  $A\beta_{1-40}$  in the supernatant was estimated by measuring the absorbance at 280 nm using the appropriate extension coefficient (1490 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>).

The A $\beta_{1-40}$  concentration was then adjusted to 150 µM with HFIP and dried under nitrogen flow. The solubilisation and drying were repeated three times until a transparent film of A $\beta_{1-40}$  was obtained. A $\beta_{140}$  was then solubilised in buffer 1 containing 8 M urea at a maximum concentration of 150  $\mu$ M. Urea prevents A $\beta_{1-40}$ aggregation during phase transfer and was removed progressively by dialysis against reaction buffer 4 (20 mM MOPS pH 7.0) at 4°C using Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (3,500 MWCO, Thermo Scientific). The Aβ<sub>1-40</sub> monomeric state was verified by gel filtration (TSKgel G4000SW, 25 mL) (Figure. 1B) and dynamic light scattering (Malvern Zetasizer NanoZS). The A $\beta_{1-40}$  samples prepared following this method were stored in reaction buffer 4 at 4°C and remained stable for two weeks.

### Preparation of recombinant PrP constructs.

Full-length ovine PrP 25-234 (Ala-136, Arg-154, Gln-171 variant), PrP 25-124, PrP Δ103-124 and different His-tagged truncated forms (103-234, 124-234, and 167-234) were produced in Escherichia coli and purified as described previously (39). The pure monomeric PrP constructs were analysed by SDS-PAGE, bufferexchanged against desalting buffer 5 (0.5 g/L ammonium acetate, pH 4.5) using Sephadex<sup>®</sup> G-25 columns (GE Healthcare) and freeze-dried. Before use, monomeric PrP was obtained by dissolving the lyophilised recombinant PrP in buffer 6 (15 mM sodium acetate, pH 5.1) followed by a buffer exchange chromatography on Sephadex<sup>®</sup> HiTrap Desalting G-25 columns (GE Healthcare) against reaction buffer 4 using an ÄKTA purifier (GE Healthcare).

# Protein labelling for microscale thermophoresis experiments.

After dialysis against 20 mM MES pH 6.5, 20 mM NaCl, proteins were incubated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 carboxylic acid, succinimidyl ester (molar ratio 1:1.3) (Molecular Probes Inc., Life Technologies, USA) during 1H at RT. The excess dye was removed by dialysis against 20 mM MES pH 6.5, 20 mM NaCl.

#### Microscale thermophoresis.

Microscale thermophoresis is a technology that uses the motion of fluorescent molecules along a microscale temperature gradient to detect any changes in their hydration shell, which can be induced by the binding to a partner (53–56). A fixed concentration of labelled proteins (either 120 nM of PrP 103-234 or 20 nM of PrP D103-124 or 20 nM of PrP 25-234 or 20 nM of PrP 25-124 or 120 nM of PrP 124-234) was incubated with increasing amounts of A $\beta_{1-40}$  in 20 mM MES pH 6.5, 20 mM NaCl and 10% DMSO at room temperature for 10 min. For these experiments, we freshly dissolved commercial Aβ<sub>1-40</sub> (Genscript) in DMSO at a final concentration of 1 mM. The measurements were performed using a Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) at 25°C (blue LED power between 20 and 30%). The initial fluorescence data from three independent measurements were averaged and analysed using the NTAnalysis software (Nanotemper technologies) and a standard fitting sofware (GraphPad Prism 7.0a for Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com)).

# Circular dichroism.

The CD spectra were recorded on a Jasco J-810 dichrograph at room temperature in 20 mM MES pH 6.5, 20 mM NaCl. All spectra were recorded using a 0.5-mm-path-length quartz cell. Each spectrum is an average of 4 scans; a 4<sup>th</sup>-order polynomial smoothing with 6 neighbours on each size was performed using GraphPad Prism 7.0a.

# Cell culture and confocal microscopy.

RK-13 cells were stably transfected with a P2F plasmid expressing ovine PrP variant V136 R154 Q171; the cells were later cloned to establish a stable cell line (57). RK-13 and PrP expressing RK13 cells were grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-air atmosphere using Opti-MEM medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin.

Cells  $(1.25 \times 10^6)$  were seeded on 12-mm glass coverslips. After 2 h, the medium was changed and cells were incubated with A $\beta_{1-40}$  peptide (0

or 50 µM) at 37°C for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature for 10 min. Fixed cells were washed twice in PBS and once with PBS containing 0,05% Tween-20 (PBST). Non-specific binding of antibody was blocked by incubation of cells for 10 min twice in PBST containing 3% BSA.

Subsequent washes and dilutions were performed in the following buffer PBST with 1% BSA. Cells were incubated for 1 h with the primary antibodies (mouse anti-Aß MAb (6E10 (BioLegend), 1:1000) and rabbit anti-PrP pAb (MH44, 1:500)), then washed three times during 15 min. Cells were incubated with the secondary antibodies (Alexa Fluor 555 conjugated goat anti-mouse IgG H+L and Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG H+L (Invitrogen, 1:1000) and with DAPI (4',6diamidino-2phenylindole) (Sigma-Aldrich, 1 µg/mL) for 1 h. Cells were washed three time for 15 min, and twice with PBS for 15 min. Coverslips were mounted on glass slides with ProLong Gold Antifade Mountant (Thermofisher). Pictures were acquired with a Zeiss LSM 700 confocal laser scanning microscope (plan-apochromat 40x magnification/NA 1.3 and plan-apochromat 63x magnification/NA 1.4 oil immersion objectives) using laser excitation at 405 nm, 488 nm and 555 nm. Stacks were recorded using a frame sequential mode to sequentially excite each fluorophore and record its fluorescence frame after frame. Background subtraction and image analyses were performed using ImageJ (version 2.0.0-rc68/1.52e) (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2018). MannWhitney statistical tests were performed using GraphPad Prism 7.0a.

Static light scattering (SLS) and mean average molecular weight estimation. Static light scattering for kinetics and temperature ramping experiments were performed on a custom device using a 630-nm laser beam in 2mm quartz cuvettes. Kinetic experiments were performed at the temperature that enhanced PrP oligomer formation (60°C), as previously reported (58). The PrP concentration was fixed at 20  $\mu$ M in 20 mM MOPS pH 7.0. The A $\beta_{1-40}$ concentration varied from 0.1 to 5 µM or was fixed at 5 µM. PrP 25-234 oligomers (3 µM monomer equivalent) were prepared as previously described (49), and their depolymerization was monitored as a function of temperature (1°C/min from 20°C to 90°C) in the presence or absence of 0.75  $\mu$ M monomeric A $\beta_{1-40}$ at pH 7.0.

The mean average molecular weight (<Mw>) was estimated using the Rayleigh relation: I = R\*C\*<Mw<sup>2</sup>>, where I is the scattering intensity and R is the Rayleigh constant previously estimated and fixed for the device. C is the object concentration. For homopolymers, the size of the polymers, N (i.e., number of protomers) can be extracted from the Rayleigh relation: I = R\*c\*N\* M<sup>2</sup>.

Here, c is the concentration equivalent to the monomer concentration, N is the size of the oligomers, and M is the molecular weight of the monomer.

# Size exclusion chromatography and molecular weight determination.

Full-length recPrP and PrP 103-234 (50  $\mu$ M) were heated at 60°C in buffer 4 in the presence or absence of 12.5  $\mu$ M A $\beta_{1-40}$  for 20 min. The samples were then analysed by gel filtration (TSK 4000 SW) coupled to a multi-wavelength static light scattering device for molecular weight estimation using a custom MATLab program.

# Transmission electron microscopy (TEM).

Sample morphology was analysed by TEM using a Zeiss EM902 (80 kV) microscope, and acquisitions were saved at 85,000 x magnification. Briefly, 10  $\mu$ l of the post-reaction PrP 103-234 sample (60°C in the presence or absence of A $\beta$ <sub>1-40</sub>, pH 7.0) was adsorbed on carbon-coated Formvar grids (Agar Scientific). Each grid was washed three times with deionised water, stained with 2% uranyl acetate and air-dried.

# Acknowledgements

We thank P. Adenot from the INRAE MIMA2 imaging core facility (MIMA2, INRAE, 2018. Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods, https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12) for expert support with confocal microscopy. We are grateful to Drs. Paola Llinas and Julie Ménétrey (I2BC, UMR9198, Gif-sur-Yvette) for advices and assistance for MST experiments which were performed with an equipment from the Macromolecular interaction measurements Platform of I2BC.supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01.

# Funding and additional information

The French National Research Agency (ANR) has supported this work.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest in regards to this manuscript.

# References

- 1. Musiek, E. S., and Schindler, S. E. (2013) Alzheimer disease: current concepts & future directions. *Mo. Med.* **110**, 395–400
- 2. Armstrong, R. A. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **57**, 87–105
- 3. Silva, M. V. F., Loures, C. de M. G., Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G., and Carvalho, M. das G. (2019) Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J. Biomed. Sci.* 10.1186/s12929-019-0524-y
- 4. Lane, C. A., Hardy, J., and Schott, J. M. (2018) Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **25**, 59–70
- 5. Grimm, A., Mensah-Nyagan, A. G., and Eckert, A. (2016) Alzheimer, mitochondria and gender. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **67**, 89–101
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., and Collin, F. (2018) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 14, 450–464
- 7. Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. **297**, 353–356
- 8. Walsh, D. M., and Selkoe, D. J. (2007) A beta oligomers a decade of discovery. *J. Neurochem.* **101**, 1172–1184
- Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741– 766 10. Qiang, W., Yau, W.-M., Lu, J.-X., Collinge, J., and Tycko, R. (2017) Structural variation in amyloid-β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature*. 541, 217– 221
- Watts, J. C., Condello, C., Stöhr, J., Oehler, A., Lee, J., DeArmond, S. J., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Giles, K., and Prusiner, S. B. (2014) Serial propagation of distinct strains of Aβ prions from Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 10323–10328
- 12. Rasmussen, J., Mahler, J., Beschorner, N., Kaeser, S. A., Häsler, L. M., Baumann, F., Nyström, S., Portelius, E., Blennow, K., Lashley, T., Fox, N. C., Sepulveda-Falla, D., Glatzel, M., Oblak, A. L., Ghetti, B., Nilsson, K. P. R., Hammarström, P., Staufenbiel, M., Walker, L.

C., and Jucker, M. (2017) Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 13018–13023

- 13. Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. **256**, 184–185
- 14. Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012) The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **15**, 349–357
- 15. Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*. **457**, 1128–1132
- Caetano, F. A., Beraldo, F. H., Hajj, G. N. M., Guimaraes, A. L., Jürgensen, S., WasilewskaSampaio, A. P., Hirata, P. H. F., Souza, I., Machado, C. F., Wong, D. Y.-L., De Felice, F. G., Ferreira, S. T., Prado, V. F., Rylett, R. J., Martins, V. R., and Prado, M. A. M. (2011) Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *J. Neurochem.* **117**, 538–553
- Schwarze-Eicker, K., Keyvani, K., Görtz, N., Westaway, D., Sachser, N., and Paulus, W. (2005) Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol. Aging.* 26, 1177–1182
- 18. Takahashi, R. H., Tobiume, M., Sato, Y., Sata, T., Gouras, G. K., and Takahashi, H. (2011) Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* **31**, 208–214
- Zou, W.-Q., Xiao, X., Yuan, J., Puoti, G., Fujioka, H., Wang, X., Richardson, S., Zhou, X., Zou, R., Li, S., Zhu, X., McGeer, P. L., McGeehan, J., Kneale, G., Rincon-Limas, D. E., Fernandez-Funez, P., Lee, H., Smith, M. A., Petersen, R. B., and Guo, J.-P. (2011) Amyloidbeta42 interacts mainly with insoluble prion protein in the Alzheimer brain. *J. Biol. Chem.* 286, 15095–15105
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453
- Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J. D. F., Nicoll, A. J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A. S., Rudge, P., Collinge, J., and Brandner, S. (2015) Evidence for human transmission of amyloid-β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*. **525**, 247–250 22.
- Um, J. W., Nygaard, H. B., Heiss, J. K., Kostylev, M. A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E. C., and Strittmatter, S. M. (2012) Alzheimer Amyloid-β Oligomer Bound to Post-Synaptic Prion Protein Activates Fyn to Impair Neurons. *Nat. Neurosci.* **15**, 1227–1235
- 23. Pantera, B., Bini, C., Cirri, P., Paoli, P., Camici, G., Manao, G., and Caselli, A. (2009) PrPc activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway. *J. Neurochem.* **110**, 194–207
- 24. Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Pradines, E., Pietri, M., Ermonval, M., Grassi, J., Richards, J. G., Mutel, V., Launay, J.-M., and Kellermann, O. (2007) Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1096**, 106–119
- 25. Williamson, R., Usardi, A., Hanger, D. P., and Anderton, B. H. (2008) Membrane-bound betaamyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 1552–1559
- 26. Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Sclip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., and Forloni, G.

(2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2295–2300

- 27. Freir, D. B., Nicoll, A. J., Klyubin, I., Panico, S., Mc Donald, J. M., Risse, E., Asante, E. A., Farrow, M. A., Sessions, R. B., Saibil, H. R., Clarke, A. R., Rowan, M. J., Walsh, D. M., and Collinge, J. (2011) Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat. Commun.* **2**, 336
- 28. Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* **271**, 22908–22914
- Fluharty, B. R., Biasini, E., Stravalaci, M., Sclip, A., Diomede, L., Balducci, C., Vitola, P. L., Messa, M., Colombo, L., Forloni, G., Borsello, T., Gobbi, M., and Harris, D. A. (2013) An N-terminal Fragment of the Prion Protein Binds to Amyloid-β Oligomers and Inhibits Their Neurotoxicity in Vivo. *J. Biol. Chem.* 288, 7857–7866
- 30. Chen, S., Yadav, S. P., and Surewicz, W. K. (2010) Interaction between human prion protein and amyloid-beta (Abeta) oligomers: role OF N-terminal residues. *J. Biol. Chem.* **285**, 26377–26383 31.
- 31. Torrent, J., Vilchez-Acosta, A., Munoz-Torrero, D., Trovaslet, M., Nachon, F., Chatonnet, A., Grznarova, K., Acquatella-Tran Van Ba, I., Le Goffic, R., Herzog, L., Beringue, V., and Rezaei, H. (2015) Interaction of prion protein with acetylcholinesterase: potential pathobiological implications in prion diseases. *Acta Neuropathol Commun.* **3**, 18
- 32. Nieznanski, K., Choi, J.-K., Chen, S., Surewicz, K., and Surewicz, W. K. (2012) Soluble prion protein inhibits amyloid-β (Aβ) fibrillization and toxicity. *J. Biol. Chem.* **287**, 33104–33108
- Nieznanski, K., Surewicz, K., Chen, S., Nieznanska, H., and Surewicz, W. K. (2014) Interaction between prion protein and Aβ amyloid fibrils revisited. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 340–345
- 34. Risse, E., Nicoll, A. J., Taylor, W. A., Wright, D., Badoni, M., Yang, X., Farrow, M. A., and Collinge, J. (2015) Identification of a Compound That Disrupts Binding of Amyloid-β to the Prion Protein Using a Novel Fluorescence-based Assay. *J. Biol. Chem.* **290**, 17020–17028
- 35. Bayer, T. A., and Wirths, O. (2014) Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **127**, 787–801
- McDonald, A. J., Leon, D. R., Markham, K. A., Wu, B., Heckendorf, C. F., Schilling, K., Showalter, H. D., Andrews, P. C., McComb, M. E., Pushie, M. J., Costello, C. E., Millhauser, G. L., and Harris, D. A. (2019) Altered Domain Structure of the Prion Protein Caused by Cu2+ Binding and Functionally Relevant Mutations: Analysis by Cross-Linking, MS/MS, and NMR. *Struct. Lond. Engl. 1993.* 27, 907-922.e5
- Evans, E. G. B., and Millhauser, G. L. (2017) Chapter Two Copper- and Zinc-Promoted Interdomain Structure in the Prion Protein: A Mechanism for Autoinhibition of the Neurotoxic N-Terminus. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Legname, G., and Vanni, S. eds), pp. 35–56, Prion Protein, Academic Press, **150**, 35–56
- Wu, B., McDonald, A. J., Markham, K., Rich, C. B., McHugh, K. P., Tatzelt, J., Colby, D. W., Millhauser, G. L., and Harris, D. A. (2017) The N-terminus of the prion protein is a toxic effector regulated by the C-terminus. *eLife*. 10.7554/eLife.23473
- Evans, E. G. B., Pushie, M. J., Markham, K. A., Lee, H.-W., and Millhauser, G. L. (2016) Interaction between the Prion Protein's Copper-Bound Octarepeat Domain and a Charged Cterminal Pocket Suggests a Mechanism for N-terminal Regulation. *Struct. Lond. Engl. 1993*. 24, 1057–1067
- 40. Martínez, J., Sánchez, R., Castellanos, M., Makarava, N., Aguzzi, A., Baskakov, I. V., and Gasset, M. (2015) PrP charge structure encodes interdomain interactions. *Sci. Rep.* **5**, 13623

- 41. Sonati, T., Reimann, R. R., Falsig, J., Baral, P. K., O'Connor, T., Hornemann, S., Yaganoglu, S., Li, B., Herrmann, U. S., Wieland, B., Swayampakula, M., Rahman, M. H., Das, D., Kav, N., Riek, R., Liberski, P. P., James, M. N. G., and Aguzzi, A. (2013) The toxicity of antiprion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature*. **501**, 102–106
- 42. McDonald, A. J., and Millhauser, G. L. (2014) PrP overdrive. *Prion.* 8, 183–191
- 43. Fryer, J. D., Demattos, R. B., McCormick, L. M., O'Dell, M. A., Spinner, M. L., Bales, K. R., Paul, S. M., Sullivan, P. M., Parsadanian, M., Bu, G., and Holtzman, D. M. (2005) The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 25754–25759
- Chakroun, N., Prigent, S., Dreiss, C. A., Noinville, S., Chapuis, C., Fraternali, F., and Rezaei, H. (2010) The oligomerization properties of prion protein are restricted to the H2H3 domain. *FASEB J.* 24, 3222–31
- 45. Younan, N. D., Chen, K.-F., Rose, R.-S., Crowther, D. C., and Viles, J. H. (2018) Prion protein stabilizes amyloid-β (Aβ) oligomers and enhances Aβ neurotoxicity in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **293**, 13090–13099
- 46. Rösener, N. S., Gremer, L., Reinartz, E., König, A., Brener, O., Heise, H., Hoyer, W., Neudecker, P., and Willbold, D. (2018) A d-enantiomeric peptide interferes with heteroassociation of amyloid-β oligomers and prion protein. *J. Biol. Chem.* **293**, 15748–15764
- Kong, C., Xie, H., Gao, Z., Shao, M., Li, H., Shi, R., Cai, L., Gao, S., Sun, T., and Li, C. (2019) Binding between Prion Protein and Aβ Oligomers Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Virol. Sin.* **34**, 475–488
- 48. Ida, N., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) Rapid cellular uptake of Alzheimer amyloid betaA4 peptide by cultured human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **394**, 174–178
- 49. Eghiaian, F., Daubenfeld, T., Quenet, Y., van Audenhaege, M., Bouin, A. P., van der Rest, G., Grosclaude, J., and Rezaei, H. (2007) Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage. *Proc Natl Acad Sci U A.* **104**, 7414–9
- 50. Roucou, X. (2014) Regulation of PrP(C) signaling and processing by dimerization. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 57
- 51. Ciric, D., Richard, C.-A., Moudjou, M., Chapuis, J., Sibille, P., Daude, N., Westaway, D., Adrover, M., Béringue, V., Martin, D., and Rezaei, H. (2015) Interaction between Shadoo and PrP Affects the PrP-Folding Pathway. *J. Virol.* **89**, 6287–6293
- 52. Walsh, D. M., Thulin, E., Minogue, A. M., Gustavsson, N., Pang, E., Teplow, D. B., and Linse, S. (2009) A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid betapeptide. *FEBS J.* **276**, 1266–1281
- 53. Baaske, P., Wienken, C. J., Reineck, P., Duhr, S., and Braun, D. (2010) Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 2238–41 54.
- 54. Duhr, S., and Braun, D. (2006) Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**, 19678–19682
- 55. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol.* **9**, 342–353
- 56. Zillner, K., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Braun, D., Längst, G., and Baaske, P. (2012) Microscale thermophoresis as a sensitive method to quantify protein: nucleic acid interactions in solution. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. **815**, 241–52
- 57. 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 A*. **98**, 4055–9

Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertle, T., and Grosclaude, J. (2005) Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *J Mol Biol.* 347, 665–79

**Table 1.** Binding affinity of A $\beta_{1-40}$  to different PrP constructs.

PrP construct	Kd
25-234	0.7 μM and > 100 μM
25-124	82 nM and > 100 μM
103-234	0.6 μM and 23 μM
124-234	14 μΜ
Δ103-124	32 μM

# Figures



**Figure 1.** Analyses of monomeric  $A\beta_{1-40}$ . Purification of the  $A\beta_{1-40}$  peptide expressed in *E. coli* led to highly pure and monomeric  $A\beta_{1-40}$  according to (**A**) SDS PAGE followed by silver staining and (**B**) size exclusion chromatography.



**Figure 2.** Effect of monomeric  $A\beta_{1-40}$  on PrP-expressing cells. **A.** Cells expressing PrP (PrP<sup>+</sup>) or not (PrP<sup>-</sup>) were incubated either with monomeric  $A\beta_{1-40}$  or buffer. Cells were then fixed with PFA 24-h postinoculation. Cells were immunostained with mouse anti-A $\beta$  MAb (6E10) and rabbit anti-PrP pAb (MH44) and then with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (green) and Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse IgG (red). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). Cells were imaged using a confocal microscope, scale bar is 10 µm. Arrows point at some remarkable regions discussed in the text. **B.** Mann-Whitney statistical analysis of PrP spot area. The whiskers are drawn down to the min value and up to the max value. **C.** Mann-Whitney statistical analysis of A $\beta$  spot area. The whiskers are drawn down to the min value and up to max value.



**Figure 3.** Estimation of the dissociation constant of  $A\beta_{1-40}$  for its different binding sites on PrP. **A.** Scheme of A $\beta$  binding sites on PrP. **B.** Scheme of the different PrP constructs. **C.** Results of fluorescence experiments using  $A\beta_{1-40}$  to titrate fluorescently labelled full-length PrP (black), the 25-124 N-terminal region (light blue), the 103-234 C-terminal domain (purple), the 124-234 C-terminal domain (dark blue) and the D103-124 construct (green). The results are expressed as the means ± SDs from three different experiments.



**Figure 4.** The effect of monomeric  $A\beta_{1-40}$  on PrP oligomerization process. **A.** PrP (20 µM) oligomerization was monitored by static light scattering intensity as a function of time in the presence of different  $A\beta_{1-40}$  concentrations ranging from 0 to 5 µM (blue to red). **B.** The exponential variation of light scattering intensity (n=3) at 15 min as function of  $A\beta_{1-40}$  concentration suggests a cooperative effect of  $A\beta_{1-40}$  on PrP oligomerization.



**Figure 5.** Identification of PrP segments through which Aβ<sub>1-40</sub> modulates PrP oligomerization. The oligomerization kinetics of different PrP constructs were monitored by the variation of scattered light intensity as a function of time in the absence (black curves) or presence (red curves) of 5 µM Aβ<sub>1-40</sub> (**A**: PrP 25-234, **B**: PrP 124-234, **C**: PrP 167-234, **D**: PrP 103-234, **E**: PrP D103-124, **F**: PrP 25-124).



В



**Figure 6.** Size characterisation of PrP oligomer assemblies generated in the presence of A $\beta_{1-40}$ . Oligomerization profile analysis by multiwavelength static light scattering coupled to SEC was performed for **A:** PrP 25-234 (50 µM) and **B:** PrP 103-234 (50 µM). The black and red curves are the chromatograms in the absence and presence of 12.5 µM A $\beta_{1-40}$ , respectively, whereas the open circles represent the size distributions (in MDa) of the monomer (black and red) and the oligomers (blue and orange) formed in the absence or presence of A $\beta_{1-40}$ , respectively. The morphology of PrP 103-234 assemblies **C:** in the absence or **D:** presence of A $\beta_{1-40}$  was explored by MET. The scale corresponds to 200 nm.



**Figure 7.** Effect of  $A\beta_{1-40}$  binding on PrP oligomer stability. **A.** Reaction scheme leading to the oligomer formation. **B.** To explore the stability of oligomers in the presence of  $A\beta_{1-40}$ , we first purified the oligomers as previously described (44). The integrity of the quaternary structure of the oligomer was confirmed by size-exclusion chromatography. The arrow indicates the position of the monomer (M) when the oligomer is depolymerized. **C.** The oligomer stability in the absence or presence of 0.75 µM  $A\beta_{1-40}$  (black or red lines, respectively) was investigated by following depolymerization as a function of temperature.



#### Site 3

**Figure 8.** 3D representation of PrP 25-234. The three a-helices are highlighted (grey for H1, clear blue for H2 and black for H3). Electrostatic potential was calculated using only charged residues and PoissonBoltzmann's computation method with swiss-pdb viewer software (http://www.expasy.org/spdbv/). Positive surfaces are in blue and negative surfaces in red.



**Figure 9.** Schematic representation of the allosteric relationship between different PrP segments and the oligomerization process. **A.** A $\beta$  binding sites 1 and 2 inhibit PrP oligomerization thanks to their interaction with the globular domain. **B.** A $\beta$  binding to site 2 abolishes the interaction between site 2 and the globular domain preventing the effect of site 2 on the globular domain. Moreover A $\beta$  binding to site 2 weakens the effect of site 1 on the globular domain. **C.** A $\beta$  binding to site 1 abolishes the interaction between site 1 and the globular domain, and A $\beta$  binding to site 3 enhances PrP oligomerization.

### 6.3. Expériences de suivi de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une sonde chimique

Nous avons souhaité confirmer les résultats obtenus avec les sondes peptidiques par l'utilisation d'un autre type de sonde. Nous avons choisi d'utiliser la sonde chimique PY1, qui est, comme HyPer, spécifique d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et qui présente l'avantage de pouvoir être adressée aux mitochondries (Dickinson et al., 2013). Dans le but d'évaluer la possibilité d'utiliser cette sonde pour suivre la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytoplasme de cellules de la lignée RK13, nous avons adapté un protocole de (Dickinson et al., 2013). Après incubation avec la sonde, les cellules sont exposées pendant deux heures à un traitement contrôle par de l'eau ou à un traitement oxydant : 100  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M de buthionine sulfoximine (BSO) ou 100  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 100 µM de BSO. Le BSO est un inhibiteur de la synthèse du glutathion et favorise donc l'apparition d'un stress oxydant dans les cellules (Maeda et al., 2004). Après remplacement du milieu par du PBS, les cellules sont observées en microscopie à fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 511±22 nm et une longueur d'onde d'émission de 555±12,5 nm. L'intensité de fluorescence des cellules semble légèrement plus élevée pour les cellules soumises aux trois traitements oxydants que pour les cellules traitées par de l'eau (Figure 94A). Le rapport  $\frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}}$  des images étant trop faible pour que les cellules puissent être segmentées avec précision, nous avons choisi de quantifier l'intensité de fluorescence moyenne de l'ensemble de chaque image. Même si l'intensité de fluorescence a tendance à être plus élevée pour les cellules exposées aux traitements oxydants, il n'y a pas de différence significative avec les cellules non traitées, probablement en raison du faible nombre de réplicats (Figure 94B). La caractérisation par spectrofluorimétrie de PY1 in vitro confirme que le pic d'excitation de la sonde oxydée est proche du pic d'émission de la DEL utilisée en microscopie (Figure 94C). En revanche, même si la fluorescence de la sonde augmente effectivement suite à un traitement par de faibles concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cette réaction est très lente : pour les deux concentrations en H2O2 testées, la réaction n'arrive à l'équilibre qu'en 14 heures environ (Figure 94D). Cette faible réactivité de la sonde la rend peu compatible avec la détection d'un stress oxydant transitoire. Dans le cadre de ce travail, nous avons donc choisi de nous concentrer sur l'utilisation des sondes protéigues.



# Figure 94 : Caractéristiques de la sonde PY1.

A : Cellules RK13 incubées avec 5  $\mu$ M de sonde PY1 pendant 1 h puis traitées pendant 2h, soit par de l'eau (témoin négatif), soit par 100  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit par 100  $\mu$ M de buthionine sulfoximine (BSO), soit par 100  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 100  $\mu$ M de BSO. Le milieu est remplacé par du PBS juste avant l'observation. Le bruit de fond est atténué avec ImageJ (rayon du filtre = 50 pixels). La *look-up table* (LUT) est présentée par la barre de calibration (à gauche).

B : Quantification de l'intensité moyenne des images brutes correspondant à l'expérience présentée en A. Trois réplicats biologiques sont réalisés pour chaque expérience.

C : Spectres d'excitation d'une solution de PY1 à 5  $\mu$ M après 16 heures d'exposition à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La barre verticale indique le pic d'excitation vers 520 nm. La légende est la même que pour la figure D.

D : Evolution de la fluorescence émise par une solution de PY1 à 5  $\mu$ M en réponse à différents traitements par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

### ÉCOLE DOCTORALE



Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

#### Titre : Maladies neurodégénératives et stress oxydant

Mots clés : protéinopathies, stress oxydant, sondes rédox, biostatistiques, analyse d'images

#### Résumé :

La maladie d'Alzheimer et les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives incurables associées à la transconformation d'un polypeptide : respectivement, le peptide A $\beta$  et la protéine prion (PrP). Ces polypeptides mépliés forment alors différents agrégats dans le cerveau, qui conduisent à la mort neuronale. Chez un individu sain, la PrP a une fonction neuroprotectrice, mais chez les malades, la toxicité de certains agrégats pathologiques passe par cette protéine. De plus, les deux pathologies sont associées à un stress oxydant précoce et toxique, qui peut favoriser et être favorisé par l'agrégation de protéines, sans que les agrégats impliqués dans ce cercle vicieux ne soient précisément identifiés.

Pour étudier le stress oxydant dans ces maladies, j'ai développé des modèles cellulaires innovants pour suivre en temps réel des margueurs d'oxydation, et des outils bioinformatiques d'analyse des résultats. Mes travaux montrent que l'unique expression de la forme saine d'A $\beta$ ou de PrP protège les cellules d'un oxydant exogène. Pour autant, l'ajout au milieu de culture des mêmes cellules d'Aß et de PrP recombinant favorise l'apparition d'un stress oxydant, uniquement pour les cellules exprimant la PrP normale. Cet effet est visible pour Aß sous forme de fibres amyloïdes, et pour PrP sous forme de monomère, d'oligomères et potentiellement de fibres amyloïdes. Ces travaux valident donc le rôle central de la PrP normale dans la physiologie et la pathologie. Mes résultats pourraient suggérer un rôle des glutathion péroxydases dans la médiation de l'effet protecteur de la PrP normale, et une activation des NADPH oxydases via la PrP en présence d'agrégats pathologiques.

#### Title : Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress

Keywords : proteinopathies, oxidative stress, redox probes, biostatistics, image analysis

#### Abstract :

Alzheimer's disease and prion diseases are incurable neurodegenerative diseases associated with the transconformation of a polypeptide: the A $\beta$  peptide and the prion protein (PrP) respectively. These misfolded polypeptides then form different aggregates in the brain, leading to neuronal death. In a healthy individual, PrP has a neuroprotective function, but in patients suffering from Alzheimer or prion diseases, the toxicity of some pathological aggregates is mediated by this protein. Moreover, both pathologies are associated with an early chronic oxidative stress, that is toxic. It can promote and be promoted by protein aggregation, without the aggregates involved in this vicious circle being precisely identified.

To study oxidative stress in these diseases, I developed innovative cellular models to monitor oxidation markers in real time, and bioinformatic tools to analyze the results. My work shows that the unique expression of the healthy form of A $\beta$  or PrP protects cells from an exogenous oxidant. However, the addition to the culture medium of the same cells of recombinant A $\beta$  and PrP promotes the appearance of oxidative stress, only for cells expressing normal PrP. This effect is visible for  $A\beta$  in the form of amyloid fibrils, and for PrP in the form of monomer, oligomers and potentially amyloid fibrils. This work thus validates the central role of normal PrP in physiology and pathology. My results could suggest a role of glutathione peroxidases in mediating the protective effect of normal PrP, and an activation of NADPH oxidases via PrP in the presence of pathological aggregates.